T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Mitokondriyal ve Nüklear DNA Dizileri Kullanılarak Türkiye'de Yayılış Gösteren *Cricetulus migratorius* (Mammalia: Rodentia) Türünün Filogenetik Analizi

Proje No:
FBA-11-3582

Proje Türü

Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Coşkun TEZ
Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü

Araştırmacının Adı Soyadı

Doç. Dr. Servet ÖZCAN
Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü

Dokt. Öğr. Osman İBİŞ
Dokt. Öğr. Metin KILIÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyoloji Ana Bilim Dalı

Haziran 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı maddi olarak “FBA-11-3582” kodlu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz. Ayrıca, arazi çalışmaları sırasında yardımcı olan Doğa Can TEZ'e de teşekkür ederiz.

Proje Ekibi

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET 1

ABSTRACT 2

1. GİRİŞ 3

2. GENEL BİLGİLER 8

2.1.Takım: Rodentia 8

2.2. Familya: Cricetidae 8

2.3. Cins: *Cricetulus* 9

2.4. Tür: *Cricetulus migratorius* 9

3. GEREÇ VE YÖNTEM 10

3.1. *Cricetulus* Örneklerinin Toplanması ve Dokuların Saklanması 10

3.2. Laboratuvarda Yapılan Çalışmalar 12

3.2.1. *Cricetulus* örneklerine ait çeşitli dokulardan total DNA izolasyonu 12

3.2.1.1. Total DNA İzolasyonu İşlemleri 12

3.2.1.2. Total DNA' nın Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi 13

3.2.2. Mitokondriyal ve Nüklear DNA bölgelerinin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması 14

3.2.2.1 Mitokondriyal DNA bölgelerinin PCR ile çoğaltılması 14

3.2.2.1.1.Mitokondriyal 12S rRNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması 14

2.2.2.1.2. Mitokondriyal Sitokrom *b* bölgesinin PCR ile çoğaltılması 15

3.2.2.2. Nüklear DNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması 16

3.2.2.2.1. Nüklear DNA GHR gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması 16

3.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi 17

3.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Çoğaltılan Gen Bölgelerinin DNA Dizi Analizi 17

3.2.5 Mitokondriyal ve Nüklear DNA Bölgelerinin Dizi Analiz Verilerinin Okunması ve Düzenlenmesi 18

3.2.6 *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Genetik Analizleri 18

3.2.7 Genetik Analizlerde Kullanılan ve Gen Bankası'ndan Elde Edilen Diziler 20

4. BULGULAR 21

3.1.1. *Cricetulus migratorius* Örneklerinden Total DNA Elde Edilmesi 21

4.1.2. *Cricetulus migratorius* Örneklerinden Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması 21

4.1.2.1. *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Mitokondriyal 12S rRNA ve Sitokrom *b* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması 22
4.1.2.2. Nüklear GHR Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması 23
4.1.3. *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Mitokondriyal 12S rRNA ve Sitokrom *b* Gen Bölgesinin Genetik Analizi 23
4.1.3.1. Sitokrom *b* Gen Bölgesi 23
4.1.3.2. 12S rRNA Gen Bölgesi 24
4.1.4. *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Nüklear GHR Gen Bölgesinin Genetik Analizi 26
4.2. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Örneklerinin Mitokondriyal DNA 12S rRNA ve Sitokrom *b* Gen Bölgesinden Elde Edilen Verilerin Filogenetik Analizi 27
4.2.1. En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi 27
4.2.2. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Haplotipleri Arasındaki Genetik Uzaklığın Hesaplanması 28
4.2.3. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Haplotiplerinin Neighbor-Joining Analizi 32
4.2.4. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Haplotiplerinin Maksimum Likelihood (Olasılık) Analizi 34
4.2.5. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan Elde Edilen Dizilerin Bayesian Analizi 36
4.2.6. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Haplotiplerin Network Analizi 39
4.2.7. *Cricetulus migratorius* Türüne Ve Diğer Yakın Türlere Ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan Elde Edilen Haplotiplerin Bayesian Analizi 41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 43
5.1. Tartışma 43
5.2. Sonuç 45
6. KAYNAKLAR 46

ÖZET

Gri cüce hamster *Cricetulus migratorius*'un genetik çeşitliliği ve filogenetik durumu daha önceki çalışmalarda değişik lokalitelerden ortaya çıkarılmaya çalışıldı. Bununla beraber mevcut bilgi, gri cüce hamsterlar arasındaki filogenetik ilişkileri aydınlığa kavuşturmak için yeterli değildir. Bu çalışmanın amacı Türkiye populasyonun genetik çeşitliliğini tespit etmek ve bizim veri ile Gen Bankası'ndan elde edilen dizileri kullanarak türün populasyonları arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya çıkarmaktır. Bunu yapmak için Türkiye'den 20 örneği analiz ettik ve Gen Bankası'ndan elde edilen sitokrom *b* ve 12S rRNA genlerine ait dizilerle karşılaştırdık. Filogenetik ağaç oluşturmak için Maksimum Likelihood, Neighbor-Joining Bayesian metotlarını ve ayrıca gri cüce hamster haplotipleri arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak için median-joining network'ü kullandık. Türkiye'den 20 örnekten sitokrom *b* için 15 (1140 bç) ve 12S rRNA için 10 haplotip (901 bç) elde ettik. Ayrıca 14 örneğin nüklear DNA GHR gen bölgesini (828 bç) analiz ettik ve dört farklı GHR aleli bulduk. Bu çalışma, gri cüce hamster populasyonları arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya çıkarmak için Türkiye örneklerinden elde edilen verilerin önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gri cüce hamster, *Cricetulus migratorius*, Sitokrom *b*, 12S rRNA, GHR, Türkiye

ABSTRACT

Genetic diversity and phylogenetic status of the gray dwarf hamster, *Cricetulus migratorius*, have been revealed from different localities in previous studies. However, the current data is not sufficient to elucidate the phylogenetic relationships among gray dwarf hamster populations. The aim of this study was to reveal the phylogenetic relationships between populations of the species with the use of sequences available from the GenBank from various geographic origins and our data, and to determine the genetic diversity of the Turkish population. To accomplish this, we analyzed the 20 Turkish samples, and compared mitochondrial cytochrome *b* and 12S rRNA gene sequences from the GenBank database. To construct the phylogenetic tree, we used the Maximum Likelihood, Neighbor-Joining and Bayesian methods, and also a median-joining network to reveal relationships among haplotypes of the gray dwarf hamster. We obtained the 10 (901 bp) and 15 (1140 bp) haplotypes for mitochondrial 12S rRNA and cytochrome *b*, respectively, from the 20 Turkish samples. Additionally, we analyzed nuclear DNA GHR gene region (828 bp) of the 14 Turkish samples and found four different GHR alleles. This study emphasized the importance of data obtained from the Turkish samples to reveal the phylogenetic relations among gray dwarf hamster populations.

Key words: Gray dwarf hamster, *Cricetulus migratorius*, Cytochrome *b*, 12S rRNA, GHR, Turkey

1. GİRİŞ

Rodentia takımında içerisinde yer alan Cricetidae familyası, günümüzde altı altfamilya içerisinde yaklaşık 130 cins ve 681 tür içermektedir [1]. Cricetidae familyası, yakın zamana kadar Muridae familyasının bir alt familyası (Cricetinae) olarak değerlendirilirken yapılan son çalışmalar ile birlikte familya kategorisine yükseltilmiştir [1, 2].

Moleküler filogenetik analizler, Cricetinae altfamilyasının monofiletikliğini güçlü bir şekilde desteklemiştir [3]. *Cricetulus* cinsi, altı tür içermektedir [1]. Neumann et al. [3] cinsin monofiletikliğinin gerçek olmayabileceğini ve bu altı türden ülkemizde de geniş bir yayılış gösteren, *Tscherskia, Cricetus ve Allocricetulus* ile daha yakın ilişkili olan *Cricetulus migratorius*'un monofiletik bir cins olarak yeniden düzenlenmesinin daha iyi olacağını ifade etmişlerdir. Sıklıkla *Cricetulus* ile ilişkilendirilen *Allocricetulus* ve *Tscherskia*, günümüzde bağımsız cinsler olarak nitelendirilmektedirler [1].

Palaearktik bölge içerisinde yer alan Türkiye'nin, Asya, Avrupa ve Afrika kıtalarını birbirine bağlayan bir zoocoğrafik köprü olması, farklı bölgelerinde farklı iklim koşullarının varlığı ve çeşitli coğrafik bariyerlerin bulunması sebebiyle zengin bir tür çeşitliliğine sahiptir [4].

Cricetidae familyasının altı altfamilyasından Türkiye'de Arvicolinae ve Cricetinae'ye ait taksonlar, geniş bir yayılış göstermektedir [1, 4]. Ülkemizde Cricetinae altfamilyasına ait iki cins içerisinde üç tür (*Cricetulus migratorius, Mesocricetus auratus, M. brandti*) yayılış göstermektedir [4]. Bununla beraber Seçkin ve Coşkun [5], uzun kulaklı baykuş pelletlerine dayanarak Diyarbakır'dan *Cricetus cricetus* türünün yayılış kaydını vermişler. Ancak Kryštufek ve Vohralik [4] ise bunun açık bir şekilde *Cricetulus migratorius* kalıntılarının yanlış tanımlanması olduğunu, 19.yy kayıtlarında *Cricetus* cinsi türlerinden bazılarının yayılış kayıtları verilmesine rağmen Anadolu'da *Cricetus cricetus*'un yayılış göstermediğini belirtmişlerdir.

Cricetulus migratorius, Güneydoğu Avrupa (Yunanistan, Doğu Bulgaristan, Romanya) ve Rusya'nın Güney Avrupa kısmından İran, Moğolistan ve Kuzey Çin'e kadar yayılış göstermektedir. Yayılış alanının güney sınırı da Yakın ve Orta Doğu, Kuzey Pakistan ve Kuzey Hindistan'a uzanmaktadır [1, 2, 4]. Bu tür, Türkiye'de de geniş yayılış göstermektedir [4, 6].

Cricetulus migratorius türünün Güneydoğu Anadolu'daki yayılış sınırı zayıf bir şekilde belirlenmiş, genellikle Ceylanpınar yayılış sınırının güney uç kısmı olarak ifade edilmekte ve Türkiye'ye yakın adalarda bulunmamaktadır [4]. Doğramacı [6], Türkiye'de *C. migratorius'un* iki alttürünün (*C. m. cinerascens* ve *C. m. vernula*) bulunduğunu belirtmiş ve bu alttürlerin daha açık renkli, kısa karın kılları ve daha kısa kuyruğa sahip *C. m. cinerascens* ile daha koyu renkli, büyük ve daha uzun kuyruklu olan *C. m. vernula* olduğunu ifade etmiştir. Doğramacı [6], büyük bir örnekleme setine dayanarak *C. m. vernula* alttürünün yayılış alanının Anadolu'nun kuzey kıyıları ile Trakya bölgesinde sınırlandığını, *C. m. cinerascens* alttürünün ise Türkiye'nin geri kalan kısmında yayılış gösterdiğini belirtmiştir. Kryštufek and Vohralik [4], tür içerisinde kuyruk uzunluğunun oldukça varyasyon gösterdiğini, Ege kıyılarında yayılış gösteren bireylerin ise daha kısa kuyruklu, Anadolu'nun kuzey ve doğu kısımlarındaki bireylerin ise daha uzun kuyruklu olduklarını, buna karşın çakışmaların olduğunu ve Doğramacı'nın [6] belirttiği iki alttürün Türkiye'deki varlığının şüpheli olduğunu vurgulamışlardır. Nechay [7], Türkiye'deki *C. migratorius*'un yayılış alanının zayıf olarak bilindiğini ve türün durumunu belirsiz olarak ifade etmiştir

Türkiye ve yakın çevresinde yayılış gösteren Cricetinae altfamilyası üyeleri ile yapılmış çalışmaların büyük bir kısmı morfolojik ve karyolojik temelli çalışmalardır. Mevcut moleküler çalışmaların sayısı oldukça az ve bu çalışmalarda kullanılan örnek sayısı sınırlı olup Türkiye coğrafyasını temsil etmemektedir. Bu çalışmaların bir kısmı *Mesocricetus* cinsi üyeleri ile ilgilidir [8-14].

Türkiye'de yayılış gösteren *C. migratorius* türüne ait örnekleri ile yapılmış çalışmaların büyük bir kısmı morfolojik ve karyolojik temelli çalışmalardır [6, 15-17].

Türkiye gri cüce hamsterlarıyla (*C. migratorius)* ilgili tespit edilen moleküler çalışma sayısı şimdilik iki çalışma ile sınırlıdır [3, 18]. İbiş et al.'nın [18] çalışması allozim elektroforezine dayanırken Neumann et al.'nın [3] çalışması ise Kayseri'den sadece bir *C. migratorius* örneğinin dahil edildiği Cricetinae altfamilyasının mitokondriyal (sitokrom *b* ve 12S rRNA) ve nüklear (vWF) gen bölgelerinin dizi analizleri ile moleküler filogenisinin araştırıldığı çalışmadır.

Mevcut çalışmalarda kullanılan birey sayısının çok az olması ve oldukça sınırlı bir bölgeyi kapsamasından dolayı Türkiye gri cüce hamsterlarının moleküler filogenisi, tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Ayrıca yapılan çalışma sonucunda *C. migratorius* türünün *Cricetulus* cinsinden bağımsız monotipik bir cins olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtilmesi [3] ile bu türün taksonomisi üzerinde yeni bir tartışma başlatılmıştır. Doğramacı'nın [6] çalışmasında örnek sayısı ve bunların dağılımı nispeten iyi olmakla birlikte tamamen morfolojik karakterlere dayanmakta ve bu sebepten dolayı da elde edilen sonuçlar türün filogenisi üzerine olan tartışmaların çözümünde yetersiz kalmaktadır.

Dünya genelinde *C. migratorius* türü ile ilgili yapılan çalışmalarda nispeten sınırlı bir bölgeyi kapsayan ve yoğun olarak morfolojik karakterlere, genetik çalışmalar olarak da karyoloji ve alloenzim verilerine dayanmaktadır. Mevcut moleküler filogenetik çalışmalarının sayısı az ve genelde *C. migratorius* türünün bir veya iki örneğinin dahil edildiği, türün moleküler filogenisi yerine daha ziyade yüksek taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin araştırıldığı çalışmalardır [3, 19, 20].

Memelilerin evrimi ve sınıflandırılması çalışmalarında moleküler yöntemler, son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [21]. Mitokondriyal DNA (mtDNA), son çeyrek yüzyılda bireyler, populasyonlar ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerin anlaşılmasında etkili

bir molekül olarak kullanılmaktadır [22]. MtDNA'nın sitokrom (Cyt) *b* gen bölgesi, tür tanımlama ve filogeni çalışmalarında yaygın bir şekilde tercih edilmektedir. Sitokrom *b* gen bölgesi, tür altı kategoriler de dahil tüm taksonomik grupların tanımlanmasında çok etkili bir moleküler araçtır [23]. 12S rRNA gen bölgesi de memeliler arasında filogenetik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [24, Bkz. 25, 26]. 12S rRNA gen bölgesi ile ilgili olarak Gen Bankası'nda rodentler ve diğer memeliler için oldukça geniş bir veri tabanını mevcuttur. Bu durumda Türkiye'de yayılış gösteren taksona ilave olarak yayılış göstermeyen taksonların bu gen bölgesi ile ilgili verilere kolaylıkla ulaşma imkanı vardır. Memeli mitokondriyal genomundaki diğer gen bölgeleriyle karşılaştırıldığında dizi farklılaşma oranı, soy hatlarının ayrılma zamanlarının belirlenmesinde nispeten daha uygundur [Bkz. 27]. Ayrıca murid sistematik çalışmaları bu genlerin filogenetik bilgi içeriklerinin ve monofiletik grupları belirleme yetenekleri son derece güçlüdür. Protein kodlayan nüklear gen bölgesi dizileri, memeli filogenisinde daha derin ilişkilerin ortaya çıkarılmasında mtDNA dizilerine göre daha başarılıdır. Ayrıca omurgalılarda nüklear genomun evrimleşme oranı mitokondriyal genoma oranla 10 kat daha yavaştır. Bu sayede nüklear gen dizilerinden elde edilen veriler, mitokondriyal genomdan elde edilen verilerin taksonlar arasındaki daha derin ayrılma süreçlerini açıklamada yetersiz kaldığı yerlerde problemin çözümü için daha kullanışlıdır [Bkz. 28]. Nüklear DNA GHR bölgesi, yaklaşık olarak 190 amino asit içeren bir polipeptidi kodlayan bir gen bölgesidir. Bu bölge, rodentler, primatlar, karnivorlar ve artiyodaktillerin dahil olduğu pek çok memelide bulunmaktadır. Bu bölge ortak olarak ya da atasal olarak kalıtılmaktadır [Bkz. 29]. GHR bölgesi, rodentler arasındaki ilişkilerin güçlü bir şekilde ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, 5' ile 3' uçlarındaki oldukça korunmuş bölgeler sayesinde primer dizayn edilmesi de oldukça kolaydır [30].

Her iki genomun da kendine has özellikleri mevcuttur ve bu yüzden her ikisinden elde edilecek verilerin değerlendirilmesi daha uygun olmakta ve rodent filogenisinde başarıyla

kullanılmaktadır [3, 19, 28-40]. Nüklear DNA'ya ait dizilerden elde edilen veriler, değişik filogenetik seviyelerde mtDNA'dan daha fazla informatif olabilmekte [41-43] ve memeli filogenisinin çeşitli parçalarının çözümlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır [41, Bkz. 44-47]. Birbirinden bağımsız birden fazla gen bölgesinin birlikte değerlendirilmesiyle yapılan filogenetik analizler, genelde gruplar arasındaki filogenetik ilişkileri daha iyi çözümlemekte ve daha destekli ağaçlar üretmektedir [48].

Bu çalışmada seçilen gerek nüklear gerekse mitokondriyal DNA bölgeleri, daha önce Türkiye gri cüce hamsterları için kullanılmamıştır. Farklı kalıtım modellerine ve evrimleşme hızlarına sahip olan mitokondriyal ve nüklear genomun farklı karakterdeki bölgelerinden elde edilen veri seti kullanarak Türkiye'de yayılış gösteren *C. migratorius* türünün genetik analizinin yapılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Takım: Rodentia

Kemiriciler veya kemirgenler takımı olarak bilinen Rodentia, günümüz memeli sınıfının en büyük takımıdır. Bu takım, tanımlanmış 2277 veya daha fazla türü ve 30 civarında familyayı ve beş alttakımı (Anomaluromorpha, Castorimorpha, Hystricomorpha, Myomorpha, and Sciuromorpha) kapsamaktadır. Bu tür sayısı, Dünya'daki yaşayan memeli türlerinin yaklaşık olarak % 40'tan fazlasına tekabül etmektedir. Uzun süre Rodentia ile Lagomorpha'nın kardeş taksonlar olduğu savunuldu. Myomorf, sciuromorf, anomaluromorf ve castorimorf olan taksonlar, sciurognathous çeneye sahipken hystricomorf olanlar ise hystricognathous tipi çene morfolojisine sahiptirler [1].

Kemirgenler, yaklaşık 5 gramdan 50 kilograma kadar değişen ağırlıklara, alt ve üst çenenin her birinde sürekli büyüyen bir çift kesici dişlere sahiptirler. Bu, kemirgenlerin evriminde ilk olarak gelişen bir özelliktir. Bazı kemirgenlerde çiğneme dişleri (azılar) sürekli büyüme özelliğindedirler. Kesici ve küçük azı dişleri arasında daima diastema olarak bilinen bir boşluk vardır [49].

2.2. Familya: Cricetidae

Memelilerin en büyük familyalarından biri olan Cricetidae, muroid kemirgenlerin son derece çeşitlilik gösteren bir familyasıdır. Cricetidae'nin alt familyaları, Arvicolinae (lemmings, voles ve muskrat), Cricetinae (hamsterlar), Lophiomyinae (crested rat) Neotominae (Kuzey Amerika sıçan ve fareleri), Sigmodontinae (Yeni Dünya sıçan ve fareleri) ve Tylomyinae (vesper rats ve tırmanıcı sıçanlar) [1]. Cricetidae familyası üyeleri Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa ve Asya'nın büyük bir kısmı boyunca yayılış gösterirler. Bu familyanın üyelerinin çoğu fare veya sıçan benzeri olup ağırlıkları 8 gram ile 2 kilogram arasında değişmektedir [1, 50].

2.3. Cins: *Cricetulus*

Bu cinsin üyeleri, arka ayaklarından daha uzun bir kuyruğa sahip olan küçük hamsterlardır. Karın kısımları beyazdır. Dorsal kısım aynı derecede gri veya daha koyu spinal bir çizgiye sahiptir. kafatası nispeten dar ve bariz bir şekilde köşeli değildir. Molar dişlerin desenlenmesi hiçbir özellik göstermez [4].

Son bilgilere göre *Cricetulus* cinsi altı tür içermektedir: *C. alticola, C. barabensis,* C. *kamensis, C. longicaudatus, C. migratorius* ve *C. sokolovi* [1]. Türkiye'de bu türlerden sadece gri cüce hamster olarak bilinen *C. migratorius* yayılış göstermektedir [1, 4].

2.4. Tür: *Cricetulus migratorius*

Türkiye'de yayılış gösteren gri cüce hamster için geçmişte değişik isimler kullanılmıştır: *Cricetus accedula* (Pallas, 1779), *Cricetus phaeus (*Pallas, 1779) ve *Cricetulus phaeus* (Miller,1912) . *Cricetulus migratorius* ismi düzenli ve sürekli olarak 1932 yılından beri kullanılmaktadır [4].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

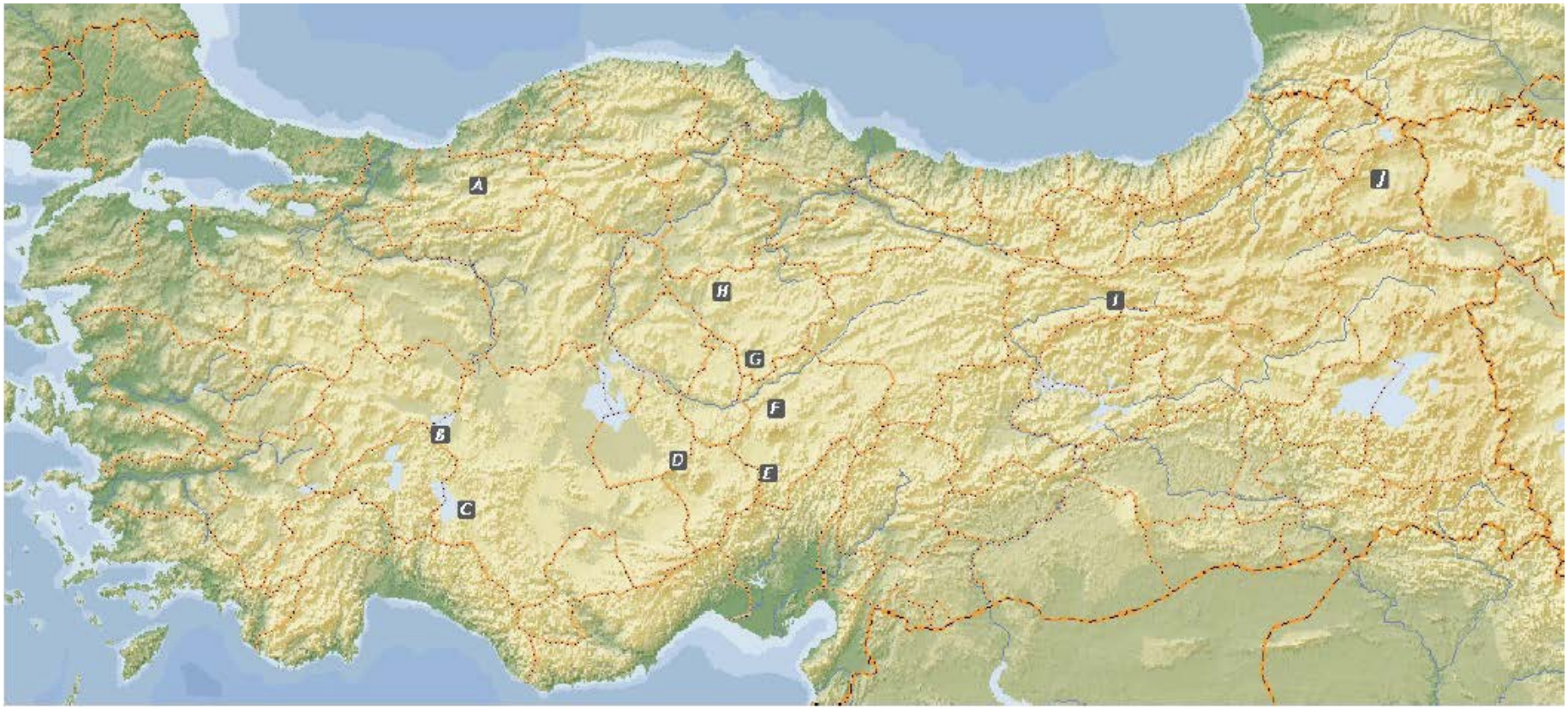
3.1. *Cricetulus* Örneklerinin Toplanması ve Dokuların Saklanması

Bu çalışmada, Cricetidae familyasının Türkiye'de yayılış gösteren *Cricetulus migratorius* türüne ait 20 örnek, canlı küçük memeli yakalama kapanlarıyla (Şekil 3.1) Türkiye'deki 10 farklı lokaliteden toplanmıştır (Şekil 3.2). Her bir örnekten alınan doku örnekleri (kas, kulak, kuyruk, böbrek vb.), absolute etanol içeren vidalı-kapaklı tüpler içerisine steril ve tek kullanımlık bisturi ile alınarak tüpler etiketlendi ve her örneğin alındığı yerin koordinatları tarih ve adres bilgileri arazi defterine kaydedildi. Doku örnekleri, -20°C'de Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde muhafaza edilmektedir.

Bu çalışma sırasında kullanılan metodun hayvan hakları ve hayvan deneyleri etiğine uygunluğu, Erciyes Üniversitesi, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Şekil 3.1. *Cricetulus migratorius* örneklerini elde etmek için kullanılan canlı küçük memeli yakalama kapanları.



Şekil 3.2. *Cricetulus migratorius* türüne ait 20 örneğin toplandığı lokaliteler (A: Rüzgarlar, Bolu; B: Akşehir, Konya; C: Beyşehir, Konya; D: Ihlara, Aksaray; E: Yahyalı, Kayseri; F: Erciyes Üniv. Kampüsü, Kayseri; G: Boğazlıyan, Yozgat; H: Yozgat; I: Ganiefendi, Üzümlü, Erzincan; J: Dereiçi ve Kafkas Üniv. Kampüsü, Kars.

3.2. Laboratuvarda Yapılan Çalışmalar

3.2.1. *Cricetulus* örneklerine ait çeşitli dokulardan total DNA izolasyonu

Total DNA'lar, Türkiye'nin değişik lokalitelerinden elde edilen *Cricetulus* örneklerine ait etil alkolde saklanan dokulardan elde edilmiştir. Total DNA izolasyonu için QIAGEN DNeasy® Blood &Tissue Kit ve üretici firmanın protokolü takip edilmiştir.

3.2.1.1. Total DNA İzolasyonu İşlemleri

*Lizis işlemi için gerekli olan thermal block cihazı önceden 56 oC'ye ayarlandı. Total DNA izolasyonunun tüm santrifüj aşamaları, oda sıcaklığında (15-25°C) gerçekleştirildi. Vorteks işlemleri 5 ile 10 saniye arasında yapıldı. DNeasy kit ile birlikte gelen AW1 ve AW2 tamponlarına % 99.9 etil alkol eklendi

*DNA izolasyon kiti ile birlikte gelen DNeasy Mini spin column, 2 ml'lik koleksiyon tüpleri ve 1.5 ml ve 2 ml' lik steril eppendorf tüpleri, stok doku tüplerindeki numaralarla aynı olacak şekilde etiketlendi.

*Total DNA elde edilen doku örnekleri, böbrek için 20 - 25 mg olacak şekilde analitik terazide tartılarak daha önceden etiketlenen 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine konuldu.

*Eppendorf tüplerine konulan dokuların üzerine 180 µl ATL tamponu ilave dilip vortekslendi. Daha sonra 20 µl Proteinaz K eklendikten sonra tekrar vorteks işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemler her bir doku örneği için gerçekleştirildi ve dokular daha önceden 56 oC' ye ayarlanmış thermal block cihazına yerleştirildi.

*Dokular tamamen lizis oluncaya kadar (6-7 saat) belli aralıklarla vortekslenerek tekrar cihaza yerleştirildi.

*Tamamen lizis olan örnekler thermal block cihazından alınarak vortekslenip 200 µl AL tampon ilave edildi. AL tamponu eklenmiş örnekler hızlı bir şekilde vortekslenerek üzerine 200 µl % 99.9'luk etil alkol ekleyerek tekrar vortekslendi.

*Elde edilen karışım daha önceden etiketlenen spin columnlara pipetlendi ve koleksiyon tüplerinin içine yerleştirildi.

*Hazırlanan spin columnlar santrifüj cihazına dengeli bir şekilde yerleştirildi ve 6000 rcf' de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta koleksiyon tüpünde biriken sıvı atılarak spin column' lar yeni bir 2 ml' lik koleksiyon tüplerine alındı.

*Sıradaki işlemde ise 500 µl AW1 tamponu eklenerek 6000 rcf' de 1dk. santrifüj edildi.

*Koleksiyon tüpleri tekrar atılarak spin column' lar yeni bir koleksiyon tüplerine alınıp 500 µl AW2 tamponu eklendi. AW2 tamponu eklendikten sonra 20000 rcf de 3 dk. santrifüj edildi.

*Spin column' lar daha önceden etiketlenen 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı ve spin column' lara 200 µl AE tamponu eklendi ve 1 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 6000 rcf' de 1 dk. santrifüj edildi. İstenildiği takdirde bu işlem tekrarlanabilmektedir.

*DNeasy Mini spin columnlar atılarak eppendorf tüplerindeki sıvı kısım, sonraki işlemlerde kalıp DNA olarak kullanılmak üzere +4 oC'de saklanmıştır. Uzun süreli saklama -20 °C'de yapıldı.

3.2.1.2. Total DNA' nın Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Cricetulus örneklerinden elde edilen dokulardan total DNA elde edilip edilmediğini anlamak için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır.

*Elde edilen total DNA'lar, % 0.8'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. % 0.8'lik agaroz jel hazırlanması için bir erlen içerisine 1.2 gram agaroz ve üzerine 150 ml 1X TAE (Trisma Base, Glacial Asetic Acid, EDTA) çözeltisi eklenmiştir. Karışım mikrodalga fırında ısıtılarak manyetik karıştırıcıda balık yardımıyla karıştırılıp karışım sıcaklığının 40-42 oC'ye düşmesi beklenmiştir. Sıcaklığın uygun değerleri düşmesi beklenirken çözeltiye 10 mg/ml Etidyum Bromid' den 8 µl eklenmiştir.

*Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilerek çözelti kabarcık oluşmayacak şekilde dökülmüş donması beklenmiştir. Donduğu anlaşılan jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılarak

elektorforez tepsisi elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin üzerini tamamen kaplayacak şekilde 1X' lik TAE tamponu tanka doldurulmuştur.

*Kuyucuklara 10 µl total DNA ve 2 µl 6X Loading Dye (% 40'lık sükroz, xylene cyanol FF ve Bromophenol Blue) karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir.

*Kuyucuklara yüklenen karışım 80 V doğrusal akımda 1 saat yürütüldü. Yürütülmesi tamamlanan jelin görüntüsü, jel görüntüleme cihazında (KODAK Gel Logic 1500 jel görüntüleme sistemi) UV yardımıyla alındı (Şekil 2).

3.2.2. Mitokondriyal ve Nüklear DNA bölgelerinin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması

Elde edilen total DNA'lar, çoğaltılacak mitokondriyal ve nüklear DNA bölgeleri için kaynak olarak kullanılmıştır.

3.2.2.1 Mitokondriyal DNA bölgelerinin PCR ile çoğaltılması

Elde edilen total DNA'lar, çoğaltılan mitokondriyal DNA bölgeleri için kaynak olarak kullanılmıştır. Her bir bireyin mtDNA'sının diğer mitokondriyal gen bölgelerine oranla oldukça korunmuş olan sitokrom *b* bölgesi (~1.140 bç) ve 12S rRNA bölgesi (~900 bç), PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılmıştır. Bunun için toplam spesifik primer çiftleri kullanılmıştır.

3.2.2.1.1.Mitokondriyal 12S rRNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Total DNA'lar, mitokondriyal DNA'nın 12S rRNA bölgesini çoğaltmak için kullanıldı. 12S rRNA bölgesinin (~900 bç) çoğaltma işlemi, bir çift primer kullanılarak PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile yapıldı. İstenilen bölgenin çoğaltılması için gradient özelliğine sahip thermocycler (SENSOQEST) kullanıldı.

Kullanılan primer çifti:

L651 Forward 5' CATAGACACAGAGGTTTGGTCC 3' [30]

12GH Reverse 5' TTTCATCTTTTCCTTGCGGTAC 3' [30].

Çoğaltılan 12s rRNA bölgesinin PCR döngü şartları:

1. basamak, 95 oC.....3 dk

2. basamak, 94 oC.....45 sn. (35 döngü)

3. basamak, 55 oC.....45 sn. (35 döngü)

4. basamak, 72 oC.....75 sn. (35 döngü)

5. basamak, 72 oC.....7 dk.

PCR bileşenleri ve miktarları:

5X Taq Buffer (MgCl2'lu)	10 µl
L primer	4 µl
H primer	4 µl
dNTPmix	1 µl
TotalDNA	1 µl
Taq DNA Pol.	1 µl
dH2O:	29 µl
Total	50 µl

Çoğaltılan PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jelde 80 V. da 75 dk yürütülerek dizi analizi yapılacak olan hedef bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı gözlendi ve yürütülmesi tamamlanan jel, jel görüntüleme cihazında (KODAK Gel Logic 1500 jel görüntüleme sistemi) UV yardımıyla görüntüsü alındı.

2.2.2.1.2. Mitokondriyal Sitokrom *b* bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Total DNA'lar, mitokondriyal sitokrom *b* gen bölgesini çoğaltmak için kullanıldı. Sitokrom *b* gen bölgesinin (~1140 bç) çoğaltma işlemi, iki çift primer kullanılarak PCR ile yapıldı. Sitokrom *b* gen bölgesinin çoğaltılması için gradient özelliğine sahip thermocycler (SENSOQEST) kullanıldı.

Kullanılan primer çiftleri:

MVZ05 Forward 5' CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3' [51].
MVZ14 Reverse 5' GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC 3' [51]
MVZ16 Forward 5' AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT 3' [53].
H8 Reverse 5' CCTCAGAATGATATTTGTCCTC 3' [39].

PCR bileşenleri ve miktarları:

10X Taq buffer	6 µl
L primer	4.8 µl
H primer	4.8 µl
dNTPmix	1.2 µl
MgCl2	3.6 µl
Total DNA	1.2 µl
BSA	4.8 µl
Taq DNA Pol	0.3 µl
dH2O	33.24 µl
Total	60 µl

Çoğaltılan sitokrom *b* gen bölgesinin PCR döngü şartları:

1. basamak, 95 oC..... 5 dk
2. basamak, 95 oC.....50 sn (30 döngü)
3. basamak, 49 oC.....50 sn (30 döngü)
4. basamak, 72 oC.....1.5 dk (30 döngü)
5. basamak, 72 oC.....7 dk

Çoğaltılan PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jelde 80 V. da 75 dk yürütülerek dizi analizi yapılacak olan hedef bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı gözlendi ve yürütülmesi tamamlanan jel, jel görüntüleme cihazında (KODAK Gel Logic 1500 jel görüntüleme sistemi) UV yardımıyla görüntüsü alındı.

3.2.2.2. Nüklear DNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Elde edilen total DNA'lar, nüklear DNA için kaynak olarak kullanılacaktır.

3.2.2.2.1. Nüklear DNA GHR gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Total DNA'lar, nüklear DNA'nın GHR (growth hormone receptor gene, exon 10, 921 bç) bölgesi, PCR ile çoğaltıldı. Bu işlem için iki spesifik primer çifti ve gradient özelliğine sahip thermocycler (SENSOQEST) kullanıldı.

Kullanılan primer çiftleri:

GHR5 Forward 5' GGCRTTCATGAYAACTACAAACCTGACYTC 3' [40]
GHR6 Reverse 5' GAGGAGAGGAACCTTCTTTTTWTCAGGC 3' [40]
GHR3 Forward 5' GACTTTATGCYCARGTRAG 3' [40]
GHR4 Reverse 5' CTYACYTGRGCATAAAAGTC 3' [40]

PCR bileşenleri ve miktarları:

10X Taq buffer	5 µl
L primer	4 µl
H primer	4 µl
dNTPmix	1 µl
MgCl2	3 µl
Total DNA	1 µl
BSA	4 µl
Taq DNA Pol	0.3 µl
dH2O	27.7 µl
Total	50 µl

Çoğaltılan GHR gen bölgesinin PCR döngü şartları:

1. basamak, 95 oC..... 5 dk
2. basamak, 95 oC.....50 sn (30 döngü)
3. basamak, 53 oC.....50 sn (30 döngü)
4. basamak, 72 oC.....1 dk (30 döngü)
5. basamak, 72 oC.....5 dk

3.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi

Çoğaltılan PCR ürünleri, Ethidium Bromide çözeltisi kullanılarak oluşturulan % 2'lik agaroz jelde 80 V.'da 75 dk yürütülerek dizi analizi yapılacak olan hedef bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı gözlendi ve yürütülmesi tamamlanan jel, jel görüntüleme cihazında (KODAK Gel Logic 1500 jel görüntüleme sistemi) UV yardımıyla görüntüsü alındı. % 2'lik agaroz jelin hazırlanması, total DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi ve görüntülenmesi kısmında tarif edilen yöntemle aynıdır. Bununla beraber farklılık, çoğaltılan PCR ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jel % 2'lik konsantrasyonuna sahip olup ilk kuyucuğa 5 µl 100 bp DNA Ladder konulmasıdır.

3.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Çoğaltılan Gen Bölgelerinin DNA Dizi Analizi

Cricetulus migratorius türüne ait her bir örnek için spesifik primer çiftleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin saflaştırma işlemi, hizmet alımı ile yapıldı.. PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri, hem ileri hem de geri yönde hizmet alımı ile yapıldı. Dizi analizi işlemleri, RefGen (ODTÜ-Teknopark/Ankara) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji

laboratuarında ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Mitokondriyal ve Nüklear DNA Bölgelerinin Dizi Analiz Verilerinin Okunması ve Düzenlenmesi

Cricetulus migratorius türüne ait her bir örnek için elde edilen tüm ham DNA dizi verileri, dizilerin düzenlenmesi ve hizalanması için Geneious® version 6.1.6 [52] programı kullanıldı. Her örneğe ait her bir DNA dizisi, ayrı ayrı değerlendirildi. Her bir örneğe ait ileri ve geri (Forward ve Revers) yöndeki DNA baz dizileri ve kromatogramları en uygun şekilde alt alta gelecek şekilde birleştirildi ve ilgili bölgenin en ortak (consensus) dizisi oluşturulmuştur.

Nüklear DNA GHR gen bölgesindeki heterozigotik bölgeleri bulmak için Geneious® version 6.1.6 [52] programındaki "Find Heterozygotes" komutu seçilerek potansiyel heterozigotik bölgeler tespit edildi ve bu bölgelerdeki bazlara ait kromatogramlar gözle kontrol edilerek heterozigotik bölge olup olmadığına karar verilmiştir. Heterozigotik bölge olarak karar verilen bölgedeki bazlar, IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)'ın belirlemiş olduğu kritere göre düzeltilmiştir.

Aynı uzunluğa getirilen ve birleştirilen tüm diziler diğer programlar tarafından da okunabilmesi ve diğer formlara dönüştürülebilmesi için FASTA ve NEXUS dosya formatlarında kaydedilmiştir.

3.2.6 *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Genetik Analizleri

Cricetulus migratorius türünün Türkiye örneklerinden elde edilen mitokondriyal DNA (sitokrom *b* ve 12S rRNA) ve nüklear DNA (GHR) gen bölgelerine ait DNA dizileri, genetik analizler için ilk önce bir araya getirilerek DNA veri setleri oluşturuldu. Oluşturulan veri setleri içerisindeki haplotip sayısını (farklı baz dizisine sahip diziler) ve her bir haplotipe

sahip kaç örneğin olduğunu tespit etmek için DnaSP version 5.00.04 [53] programı kullanılmıştır. Haplotiplerden oluşturulan her bir veri seti, genetik analizlerde kullanılmıştır.

DnaSP [53] programı ile Gen Bankası'ndan ve Türkiye örneklerinden elde edilen dizileri içeren daha geniş ikinci bir veri seti de genetik analizlerde kullanılmıştır.

Filogenetik ağaç ve network inşa etmek için mitokondriyal DNA gen bölgelerinden elde edilen veri setleri kullanılmıştır. Filogenetik ağaçları oluşturmak için MEGA5 [54] programı ile Neighbor Joining (NJ) (Komşu birleştirme) ve Maksimum Likelihood (ML) (Maksimum olasılık) metotları, MrBayes [55] programı ile de Bayesian metodu (Bayesian Inference) kullanılmıştır.

Neighbor Joining analizinde Kimura-2-Parametre (K2P) baz değişim modeli kullanılırken Maksimum Likelihood ve Bayesian analizlerinde jModelTest2 [56] programı ile önerilen en iyi baz değişim modeli kullanıldı. ML ve NJ ağaçlarında oluşan ana haplotip kümelerinin desteklenme derecesini tespit etmek için 10.000 tekrarlı (replikasyon) bootstrap analizi yapıldı.

Bayesian analizi, farklı sayıda nesilden oluşmuş olan 4-MCMC (Markov Chain Monte Carlo) kullanılarak ve ağaçların örneklemesi her 1000 basamak için 100 nesile göre yapıldı. Ayrılma frekanslarının ortalama standart sapması,<0,01 olduğu zaman örneklerin ilk % 25'i burn-in olarak çıkarıldı. Burn-in ağaçlarının çıkarılması ve konvergens değerlendirmesinden sonra kalan örnekler, % 95 Bayesian güven aralıkları ve posterior olasılıkları hesaplanmak suretiyle konsensus ağaçları (50% majority rule) üretmek için tutuldular. Bayesian ağaçlarının çizimi ve düzenlenmesinde FigTree v1.3.1 [57] programı kullanıldı.

Mitokondriyal DNA haplotiplerinden oluşturulan veri setlerinden tür içi ilişkiyi göstermek için Network 4.6.1.1 software [58, http://www.fluxus-engineering.com] ile median-joining metodu kullanarak haplotip networkü oluşturuldu.

3.2.7 Genetik Analizlerde Kullanılan ve Gen Bankası'ndan Elde Edilen Diziler

AJ973378, AJ973384, AJ973386, AJ973387, AJ973388, AJ973392, AY997828, AY997830, AY997832, AY997833, AY997834, AY997835, AY997836, AY997837, AY997838 [3], AY288508 [20], DQ973104 ([59], X99463 [60], X84389 [61], AJ250356 [62], NC_007936 [63], NC_013276 [64], FJ881389 [65].

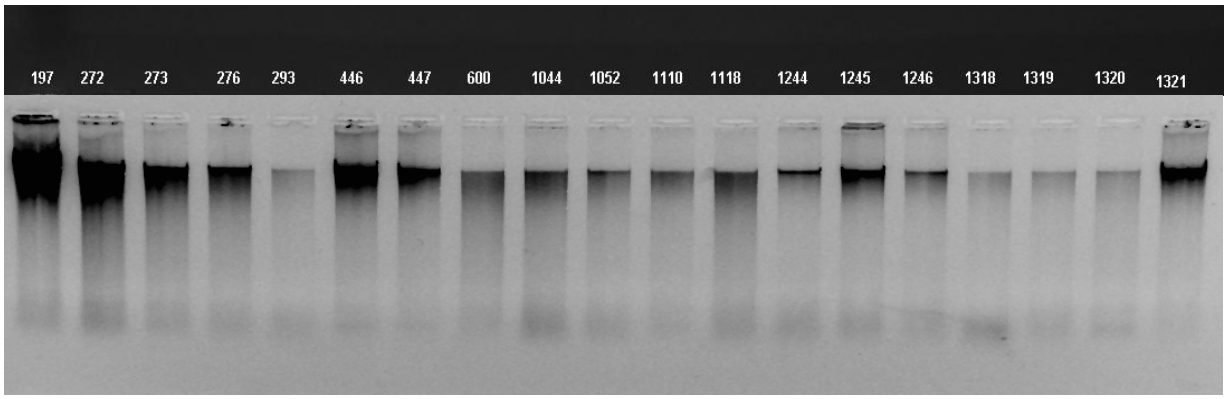
4. BULGULAR

4.1. *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Mitokondriyal ve Nüklear DNA Dizi Analizleri

Türkiye'nin değişik lokalitelerinden toplanmış *Cricetulus* örneklerinden alınan dokulardan mitokondriyal ve nüklear DNA dizi analizlerinde kullanılacak total DNA izole edildi. 20 *Cricetulus* örneğinden elde edilen total DNA'lar kullanılarak hedeflenen gen bölgelerinin (mitokondriyal 12S rRNA ile sitokrom *b* ve nüklear GHR), PCR işlemleri ile çoğaltıldı.

3.1.1. *Cricetulus migratorius* Örneklerinden Total DNA Elde Edilmesi

Cricetulus migratorius türüne ait Türkiye örneklerinin dokularından elde edilen total DNA'lar, % 0.8'lik agaroz jelde yürütüldü ve daha sonra UV altında görüntüsü alındı (Şekil 4.1).



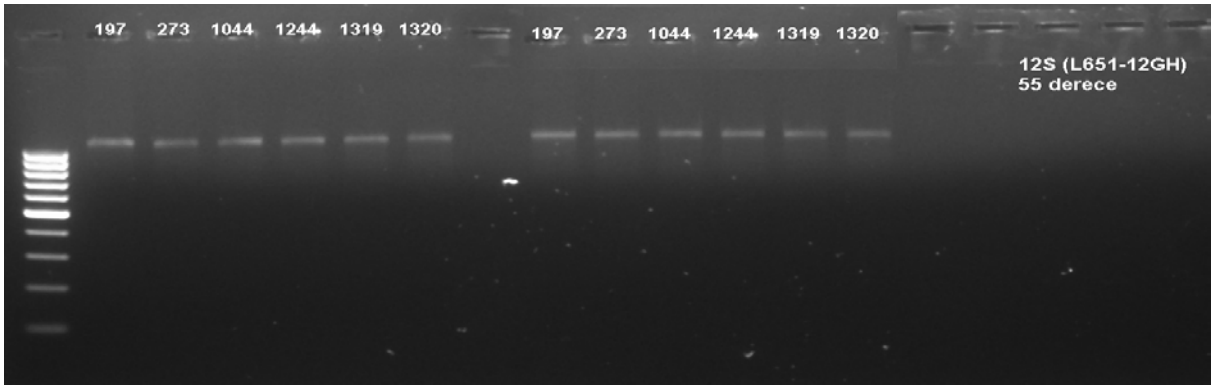
Şekil 4.1. *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerin total DNA'ların agaroz jel görüntüsü.

4.1.2. *Cricetulus migratorius* Örneklerinden Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

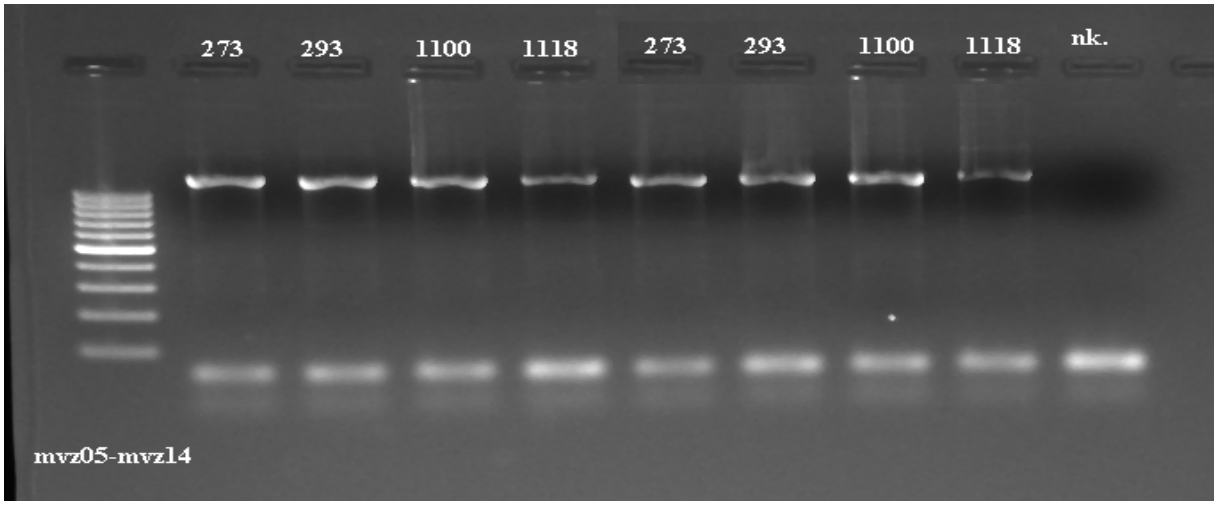
20 *Cricetulus migratorius* örneğinden elde edilen total DNA'lar, mitokondriyal (12S rRNA ile Sitokrom *b*) ve nüklear gen (GHR) bölgelerinin spesifik primer çiftleri ile çoğaltılması için kullanıldı. PCR işlemleri sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin varlığını, büyüklüğünü ve kalitesini kontrol etmek için PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında UV yardımıyla görüntüsü alındı.

4.1.2.1. *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Mitokondriyal 12S rRNA ve Sitokrom *b* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Cricetulus migratorius türüne ait 20 örneğin 12S rRNA gen bölgesinin 901 baz çifti uzunluğundaki kısmı, L651-12GH spesifik primer çifti kullanılarak, sitokrom *b* gen bölgesinin 1140 baz çifti uzunluğundaki kısmı, MVZ05-MVZ14 ve MVZ16-H8 primer çiftleri kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



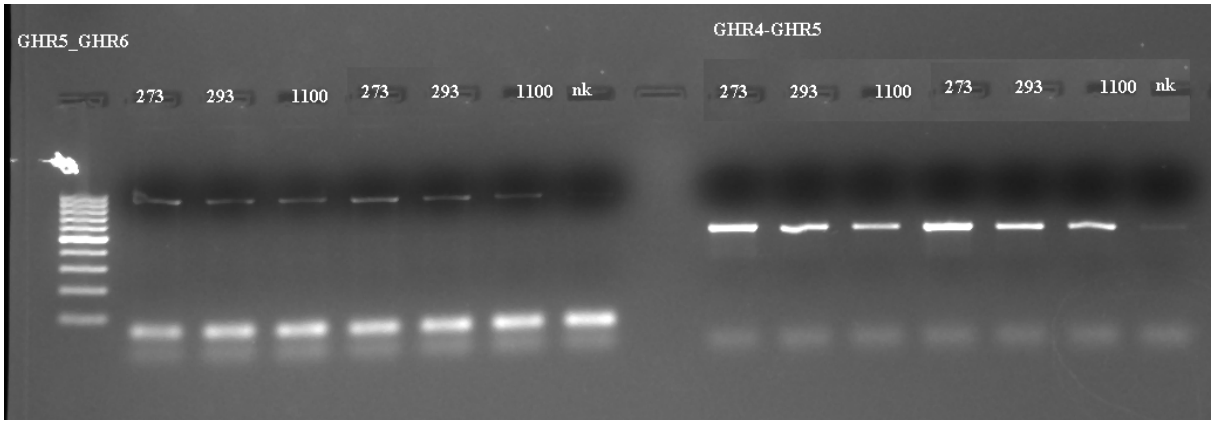
Şekil 4.2. Elde edilen total DNA'lardan *Cricetulus migratorius* örneklerine ait 12S rRNA gen bölgesinin L651 ve 12GH primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.



Şekil 4.3. Elde edilen total DNA'lardan *Cricetulus migratorius* örneklerine ait sitokrom *b* gen bölgesinin MVZ05 ve MVZ14 primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.

4.1.2.2. Nüklear GHR Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Cricetulus migratorius türüne ait 20 örnekten 14'ünün nüklear GHR (Growth Hormone Receptor) geninin exon 10 bölgesinin yaklaşık 828 baz çifti uzunluğundaki kısmı, GHR3- GHR4 ve GHR5- GHR6 spesifik primer çifti kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Elde edilen total DNA'lardan *Cricetulus migratorius* örneklerine ait nüklear GHR gen bölgesinin GHR4-GHR5 ve GHR5-GHR6 primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.

4.1.3. *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Mitokondriyal 12S rRNA ve Sitokrom *b* Gen Bölgesinin Genetik Analizi

4.1.3.1. Sitokrom *b* Gen Bölgesi

Bu çalışmada 20 örneğin mitokondriyal sitokrom *b* gen bölgesi (1140 bç.) spesifik primerlerle kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. 20 örneğe ait sitokrom *b* gen bölgesi dizisinin Geneious programı [52] yardımıyla Gen Bankası veri tabanında BLAST analizi yapıldı ve bu örneklerin *Cricetulus migratorius* türüne ait olduğu belirlendi. Türkiye'den *Cricetulus migratorius* türüne ait 20 örneğin sitokrom *b* dizisinin DnaSP [53] programı ile yapılan analizi sonucunda 15 adet haplotip tespit edildi (Tablo 4.1). Türkiye'den *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerin dizi analizleri sonucunda haplotip çeşitliliğinin (Haplotype diversity, Hd), 0.9684 ve nükleotid çeşitliliğinin ise (nucleotide diversity, Pi, π), 0.00758 olduğu tespit edildi.

Tablo 4.1. Mitokondriyal Sitokrom *b* Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi sonucunda *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerde belirlenen haplotipler (925 bç, 1140 bç).

Haplotip	Koleksiyon No	Lokalite
C1.Cytb	197	Ihlara, Aksaray
C2.Cytb	272	Yozgat
C2.Cytb	276	Yozgat
C3.Cytb	273	Yozgat
C4.Cytb	293	Yahyalı, Kayseri
C5.Cytb	446	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C5.Cytb	1321	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C6.Cytb	447	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C6.Cytb	1320	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C7.Cytb	600	Bolu, Rüzgarlar (
C8.Cytb	1044	Ganiefendi, Üzümlü, Erzincan
C9.Cytb	1052	Dereiçi, Kars
C10.Cytb	1110	Akşehir, Konya
C11.Cytb	1118	Beyşehir, Konya
C12.Cytb	1244	Boğazlıyan, Yozgat
C12.Cytb	1245	Boğazlıyan, Yozgat
C12.Cytb	1246	Boğazlıyan, Yozgat
C13.Cytb	1318	Boğazlıyan, Yozgat
C14.Cytb	1319	Boğazlıyan, Yozgat
C15.Cytb	1505	Kafkas Üniv. Kampüsü, Kars

4.1.3.2. 12S rRNA Gen Bölgesi

20 örneğin mitokondriyal 12S rRNA gen bölgesi (901 bç.) de spesifik primerlerle kullanılarak PCR ile çoğaltıldı ve bu örneklerin 12S rRNA gen bölgesi dizileri, Geneious programı [52] yardımıyla Gen Bankası veri tabanında BLAST analizi yapıldı ve bu örneklerin *Cricetulus migratorius* türüne ait olduğu belirlendi. 20 örneğin 12S rRNA gen bölgesi dizileri, DnaSP [53] programı ile yapılan analizi sonucunda 10 adet haplotip tespit edildi (Tablo 4.2). *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerin 12S rRNA gen bölgesi dizilerinin analizleri sonucunda haplotip çeşitliliğinin (Haplotype diversity, Hd), 0,8579 ve nükleotid çeşitliliğinin ise (nucleotide diversity, Pi, π), 0,00190 olduğu tespit edildi.

Tablo 4.2. Mitokondriyal 12S rRNA Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi sonucunda *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerde belirlenen haplotipler (901 bç).

Haplotip	Koleksiyon No	Lokalite
C1.12S	197	Ihlara, Aksaray
C1.12S	293	Yahyalı, Kayseri
C1.12S	1318	Boğazlıyan, Yozgat
C2.12S	272	Yozgat
C2.12S	276	Yozgat
C2.12S	446	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C2.12S	1044	Ganiefendi, Üzümlü, Erzincan
C2.12S	1118	Beyşehir, Konya
C2.12S	1319	Boğazlıyan, Yozgat
C2.12S	1321	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C3.12S	273	Yozgat
C4.12S	447	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C5.12S	600	Rüzgarlar, Bolu
C6.12S	1052	Dereiçi, Kars
C7.12S	1110	Akşehir, Konya
C8.12S	1244	Boğazlıyan, Yozgat
C8.12S	1245	Boğazlıyan, Yozgat
C8.12S	1246	Boğazlıyan, Yozgat
C9.12S	1320	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C10.12S	1505	Kafkas Üniv. Kampüsü, Kars

Türkiye'den elde edilen 20 örneğe ait mitokondriyal sitokrom *b* ve 12S rRNA gen bölgesinin DNA dizilerinin birleştirilmesi ile 2041 bç uzunluğunda 16 haplotip tespit edildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Mitokondriyal sitokrom *b* ve 12S rRNA gen bölgesinin DNA dizilerinin birleştirilmesi ile *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerde belirlenen haplotipler (2041 bç).

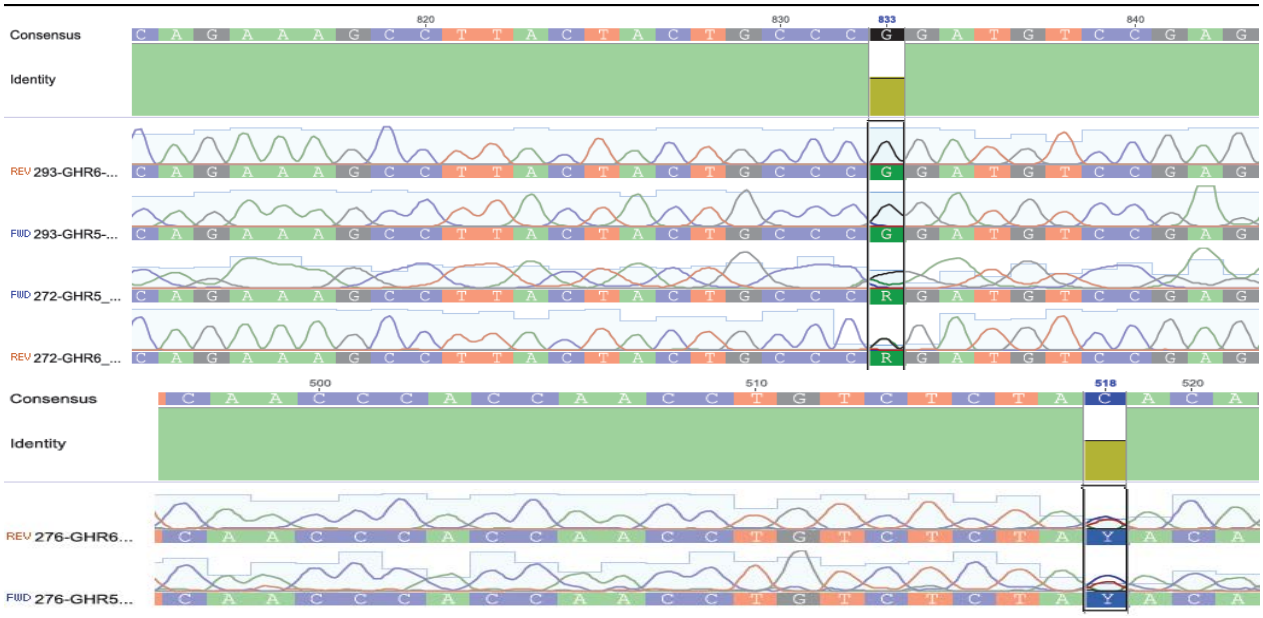
Haplotip	Koleksiyon No	Lokalite
C1. Cytb.12S	197	Ihlara, Aksaray
C2. Cytb.12S	272	Yozgat
C2. Cytb.12S	276	Yozgat
C3. Cytb.12S	273	Yozgat
C4. Cytb.12S	293	Yahyalı, Kayseri
C5. Cytb.12S	446	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C5. Cytb.12S	1321	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C6. Cytb.12S	447	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C7. Cytb.12S	600	Rüzgarlar, Bolu
C8. Cytb.12S	1044	Ganiefendi, Üzümlü, Erzincan
C9. Cytb.12S	1052	Dereiçi, Kars
C10. Cytb.12S	1110	Akşehir, Konya
C11. Cytb.12S	1118	Beyşehir, Konya
C12. Cytb.12S	1244	Boğazlıyan, Yozgat
C12. Cytb.12S	1245	Boğazlıyan, Yozgat
C12. Cytb.12S	1246	Boğazlıyan, Yozgat
C13. Cytb.12S	1318	Boğazlıyan, Yozgat
C14. Cytb.12S	1319	Boğazlıyan, Yozgat
C15. Cytb.12S	1320	Erciyes Univ. Kampusü, Kayseri
C16. Cytb.12S	1505	Kafkas Üniv. Kampüsü, Kars

4.1.4. *Cricetulus migratorius* Örneklerinin Nüklear GHR Gen Bölgesinin Genetik Analizi

Cricetulus migratorius türüne ait 20 örnekten 14'ünün nüklear DNA GHR gen bölgesinin exon 10 kısmı (828 bç.), PCR ile spesifik primer çiftleri kullanılarak çoğaltıldı. 14 adet GHR gen bölgesi dizisinin Geneious programı [52] yardımıyla Gen Bankası veri tabanında BLAST analizi yapıldı ve BLAST analizi sonucunda bu GHR gen bölgesi dizilerinin *Cricetulus migratorius* türüne ait oldukları tespit edildi.

Elde edilen 14 *Cricetulus migratorius* örneğine ait GHR gen bölgesi dizilerinin analizi sonucunda Yozgat'tan elde edilen 272 kolleksiyon numaralı örneğin 725. bölgesinin (R), 273 kolleksiyon numaralı örneğin 410. (Y) ile 725. bölgelerinin (R) ve 276 kolleksiyon numaralı

örneğin 410. (Y) ve 725. bölgelerinin (R), Erzincan-Üzümlü-Ganiefendi'den elde edilen 1044 kolleksiyon numaralı örneğin 582. bölgesinin (Y) polimorfik bölge olduğu ve bu bölgelerin heterozigotik bölge (elektroferogramda eşit pik uzunluğuna sahip) olduğu belirlendi (Şekil 4.5). Geri kalan örneklerin ise homozigot oldukları ve aynı baz dizisine sahip oldukları tespit edildi. *Cricetulus migratorius* türüne ait 14 örneğin yapılan analizinde dört farklı GHR alleli belirlendi.



Şekil 4.5. Türkiye'nin yayılış gösteren *Cricetulus migratorius* türünün bazı örneklerinde tespit edilen heterozigotik bölgeler.

4.2. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Örneklerinin Mitokondriyal DNA 12S rRNA ve Sitokrom *b* Gen Bölgesinden Elde Edilen Verilerin Filogenetik Analizi

4.2.1. En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Cricetulus migratorius türüne ait mitokondriyal 12S rRNA ve sitokrom *b* dizilerinden oluşan veri setlerinin filogenetik analizi için en uygun baz değişim modeli, jModelTest2 [56] programı ile belirlendi.

Mitokondriyal sitokrom *b* gen bölgesi dizilerinden oluşan veri seti için dış gruplu olarak jModelTest2 [56] programı ile hem AIC (Akaike Information Criterion) hem de BIC seçim taslağına göre GTR+G belirlendi.

Mitokondriyal 12S rRNA gen bölgesi dizilerinden oluşan veri seti için dış gruplu olarak jModelTest2 [56] programı ile hem AIC (Akaike Information Criterion) seçim taslağına göre GTR+I ve BIC seçim taslağına göre HKY+I belirlendi.

4.2.2. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Haplotipleri Arasındaki Genetik Uzaklığın Hesaplanması

Cricetulus migratorius türüne ait sitokrom *b*, 12S rRNA ve 12S rRNA+sitokrom *b* dizilerinden elde edilen Türkiye haplotipleri arasındaki genetik uzaklık değerleri, MEGA5 programı [54] ve K2P baz değişim modeli kullanılarak hesaplandı.

Mitokondriyal 12S rRNA gen bölgesinden elde edilen haplotipler arasındaki genetik uzaklık değerleri incelendiğinde en büyük genetik uzaklık değeri 0.0067, Cr6.12S ve Cr1.12S, Cr6.12S ve Cr3.12S, Cr6.12S ve Cr5.12S, Cr6.12S ve Cr7.12S, Cr6.12S ve Cr8.12S, Cr6.12S ve Cr9.12S, Cr6.12S ve Cr10.12S haplotipleri arasında gözlendi. En küçük genetik uzaklık değeri ise 0.0011 olarak Cr2.12S ile Cr1.12S, Cr3.12S, Cr5.12S, Cr7.12S, Cr8.12S, Cr9.12S, Cr10.12S ve Cr4.12S ile Cr9.12S haplotipleri arasında bulundu (Tablo 4.4).

Mitokondriyal sitokron *b* gen bölgesinden elde edilen haplotipler arasındaki genetik uzaklık değerleri incelendiğinde en büyük genetik uzaklık değeri 0.0160, Cr2.cytb ve Cr9.cytb haplotipleri arasında gözlendi. En küçük genetik uzaklık değeri ise 0.0009, olarak Cr5.cytb ve Cr14.cytb haplotipleri arasında bulundu (Tablo 4.5).

Mitokondriyal sitokrom *b*+12S rRNA gen bölgelerinden elde edilen dizilerin birleştirilmesi ile elde edilen haplotipler arasındaki genetik uzaklık değerleri incelendiğinde en büyük genetik uzaklık değeri 0.0114, Cr9.cytb.12S ve Cr2.cytb.12S haplotipleri arasında gözlendi. En küçük genetik uzaklık değeri ise 0.0015, olarak Cr1.cytb.12S ile Cr4.cytb.12S, ve Cr1.cytb.12S ile Cr13.cytb.12S haplotipleri arasında bulundu (Tablo 4.6).

Üç farklı veri setine ait genetik uzaklık değerleri incelendiğinde *C. migratorius*'un Türkiye haplotipleri arasında nispeten yüksek bir genetik çeşitlilik olduğu görülmektedir.

Tablo 4.4. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak 12S rRNA gen bölgesine ait haplotipler (901 bç) arasındaki genetik uzaklık değerleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cr1.12S	******									
Cr2.12S	0.0011	******								
Cr3.12S	0.0022	0.0011	******							
Cr4.12S	0.0033	0.0022	0.0033	******						
Cr5.12S	0.0022	0.0011	0.0022	0.0033	******					
Cr6.12S	0.0067	0.0056	0.0067	0.0056	0.0067	******				
Cr7.12S	0.0022	0.0011	0.0022	0.0033	0.0022	0.0067	******			
Cr8.12S	0.0022	0.0011	0.0022	0.0033	0.0022	0.0067	0.0022	******		
Cr9.12S	0.0022	0.0011	0.0022	0.0011	0.0022	0.0067	0.0022	0.0022	******	
Cr10.12S	0.0022	0.0011	0.0022	0.0033	0.0022	0.0067	0.0022	0.0022	0.0022	******

Tablo 4.5. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak sitokrom *b* gen bölgesine ait haplotipler (1140 bç) arasındaki genetik uzaklık değerleri.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Cr1.cytb	******														
Cr2.cytb	0.0115	******													
Cr3.cytb	0.0044	0.0124	******												
Cr4.cytb	0.0026	0.0106	0.0035	******											
Cr5.cytb	0.0097	0.0071	0.0106	0.0088	******										
Cr6.cytb	0.0044	0.0106	0.0053	0.0035	0.0088	******									
Cr7.cytb	0.0026	0.0106	0.0035	0.0018	0.0088	0.0035	******								
Cr8.cytb	0.0053	0.0133	0.0062	0.0044	0.0115	0.0044	0.0044	******							
Cr9.cytb	0.0115	0.0160	0.0124	0.0106	0.0142	0.0124	0.0106	0.0133	******						
Cr10.cytb	0.0062	0.0124	0.0071	0.0053	0.0106	0.0071	0.0053	0.0080	0.0124	******					
Cr11.cytb	0.0035	0.0115	0.0044	0.0026	0.0097	0.0044	0.0026	0.0053	0.0115	0.0062	******				
Cr12.cytb	0.0044	0.0124	0.0053	0.0035	0.0106	0.0035	0.0035	0.0044	0.0124	0.0071	0.0044	******			
Cr13.cytb	0.0026	0.0142	0.0071	0.0053	0.0124	0.0053	0.0053	0.0080	0.0142	0.0088	0.0062	0.0071	******		
Cr14.cytb	0.0088	0.0062	0.0097	0.0080	0.0009	0.0080	0.0080	0.0106	0.0133	0.0097	0.0088	0.0097	0.0115	******	
Cr15.cytb	0.0053	0.0097	0.0062	0.0044	0.0080	0.0044	0.0044	0.0071	0.0115	0.0062	0.0053	0.0062	0.0080	0.0071	******

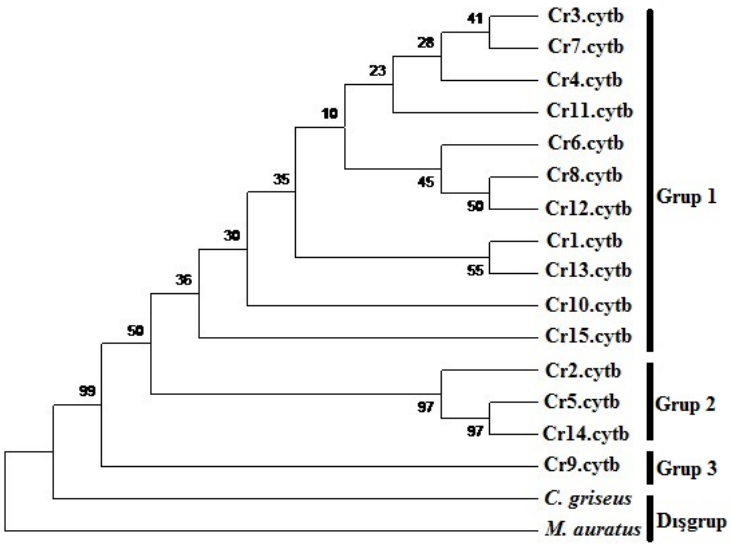
Tablo 4.6. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak sitokrom *b* +12S rRNA gen bölgelerine ait dizilerin birleştirilmesi ile elde edilen haplotipler (2041 bç) arasındaki genetik uzaklık değerler.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Cr1.cytb+12S	******															
Cr2.cytb+12S	0.0069	******														
Cr3.cytb+12S	0.0034	0.0074	******													
Cr4.cytb+12S	0.0015	0.0064	0.0029	******												
Cr5.cytb+12S	0.0059	0.0039	0.0064	0.0054	******											
Cr6.cytb+12S	0.0039	0.0069	0.0044	0.0034	0.0059	******										
Cr7.cytb+12S	0.0025	0.0064	0.0029	0.0020	0.0054	0.0034	******									
Cr8.cytb+12S	0.0034	0.0074	0.0039	0.0029	0.0064	0.0034	0.0029	******								
Cr9.cytb+12S	0.0094	0.0114	0.0099	0.0089	0.0104	0.0094	0.0089	0.0099	******							
Cr10.cytb+12S	0.0044	0.0074	0.0049	0.0039	0.0064	0.0054	0.0039	0.0049	0.0099	******						
Cr11.cytb+12S	0.0025	0.0064	0.0029	0.0020	0.0054	0.0034	0.0020	0.0029	0.0089	0.0039	******					
Cr12.cytb+12S	0.0034	0.0074	0.0039	0.0029	0.0064	0.0034	0.0029	0.0029	0.0099	0.0049	0.0029	******				
Cr13.cytb+12S	0.0015	0.0084	0.0049	0.0029	0.0074	0.0044	0.0039	0.0049	0.0109	0.0059	0.0039	0.0049	******			
Cr14.cytb+12S	0.0054	0.0034	0.0059	0.0049	0.0005	0.0054	0.0049	0.0059	0.0099	0.0059	0.0049	0.0059	0.0069	******		
Cr15.cytb+12S	0.0034	0.0064	0.0039	0.0029	0.0054	0.0005	0.0029	0.0029	0.0099	0.0049	0.0029	0.0029	0.0039	0.0049	******	
Cr16.cytb+12S	0.0039	0.0059	0.0044	0.0034	0.0049	0.0039	0.0034	0.0044	0.0094	0.0044	0.0034	0.0044	0.0054	0.0044	0.0034	0.0000******

4.2.3. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Haplotiplerinin Neighbor-Joining Analizi

Neighbor Joining metodu ile *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerden tespit edilen 15 sitokrom *b* haplotipi (1.140 bç), 10 12S rRNA haplotipi (901 bç) ve 12S rRNA+sitokrom *b* haplotipi arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için 10.000 tekrarlı (replikasyon) K2P baz değişim modeli ve *C. griseus* ve *M. auratus*'un dış grup olarak kullanılarak MEGA5 programında [54] NJ ağaçları (Şekil 4.6, Şekil 4.7), elde edildi.

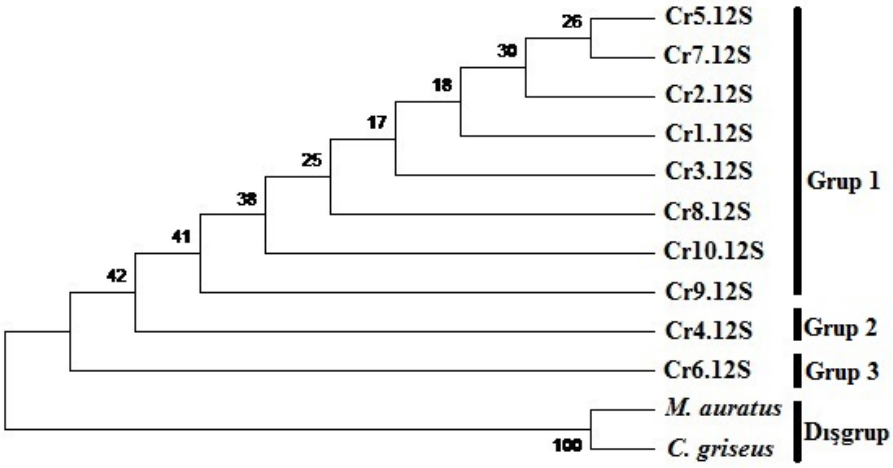
C. migratorius türüne ait Türkiye'den tespit edilen 15 mitokondriyal sitokrom *b* haplotipinin (1.140 bç) NJ analizi sonucunda üç ana grupta (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3) kümelendiği görüldü. Grup 3'te yer alan tek haplotip (Cr9.cytb), diğer iki gruptan belirgin bir şekilde ayrılmaktadır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye sitokrom *b* haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ve K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (10 000 tekrarlı).

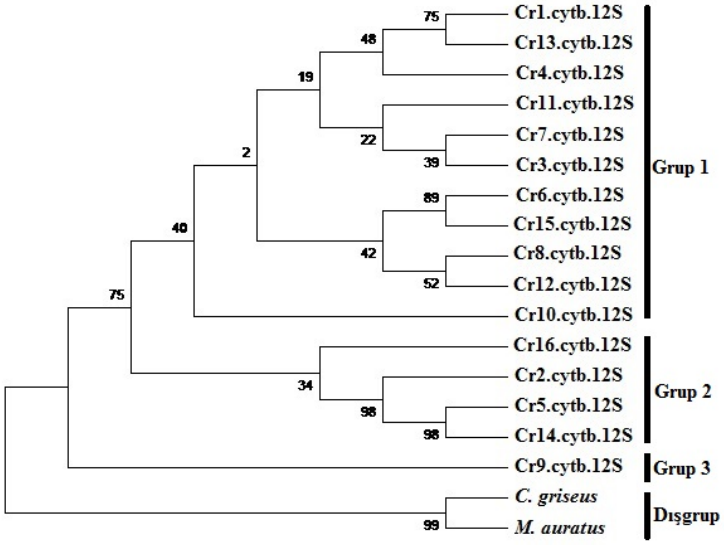
C. migratorius türüne ait Türkiye'den tespit edilen 10 mitokondriyal 12S rRNA haplotipinin (901 bç) NJ analizi sonucunda üç ana grupta (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3) kümelendiği görüldü (Şekil 4.7). Mitokondriyal 12S rRNA haplotiplerinin kullanıldığı NJ

ağacı (Şekil 4.7), sitokrom *b* haplotiplerinden elde edilen NJ ağacının (Şekil 4.6) topolojisine benzerlik göstermemektedir



Şekil 4.7. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye 12S rRNA haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ve K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (10 000 tekrarlı).

C. migratorius türüne ait Türkiye'den tespit edilen mitokondriyal sitokrom *b* ve 12S rRNA gen bölgelerinden elde edilen dizilerin birleştirilmesi ile elde edilen 16 haplotipin (2041 bç), NJ analizi sonucunda üç ana grupta (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3) kümelendiği görüldü. Grup 1'de 11 haplotip kümelenirken Grup 2 dört haplotipten oluşmuştur. Grup 3'te ise tek haplotip yer almıştır (Şekil 4.8). Birleştirilmiş dizilerden elde edilen NJ ağacının topolojisi (Şekil 4.8), sitokrom *b* haplotiplerden elde edilen NJ ağacının topolojisi (Şekil 4.6) ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.8. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye sitokrom *b*+12S rRNA (birleştirilmiş) haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ve K2P baz değişim modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı (10 000 tekrarlı).

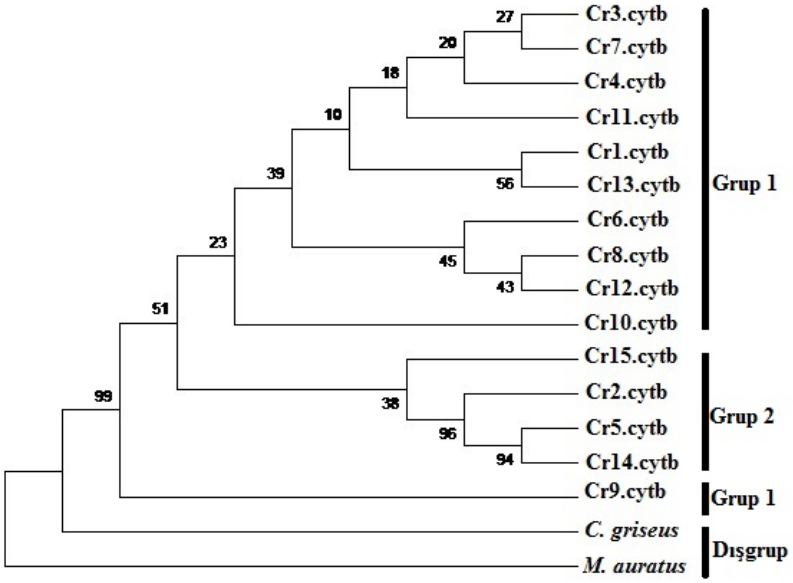
4.2.4. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye Haplotiplerinin Maksimum Likelihood (Olasılık) Analizi

Maksimum Likelihood (olasılık) metodu ile *Cricetulus migratorius* türüne ait örneklerden tespit edilen mitokondriyal DNA haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için 10.000 tekrarlı (replikasyon) GTR+G ve HKY+I baz değişim modelleri ile dış grup olarak *C. griseus* ve *M. auratus* kullanılarak MEGA5 [54] programında ML ağaçları (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11) elde edildi.

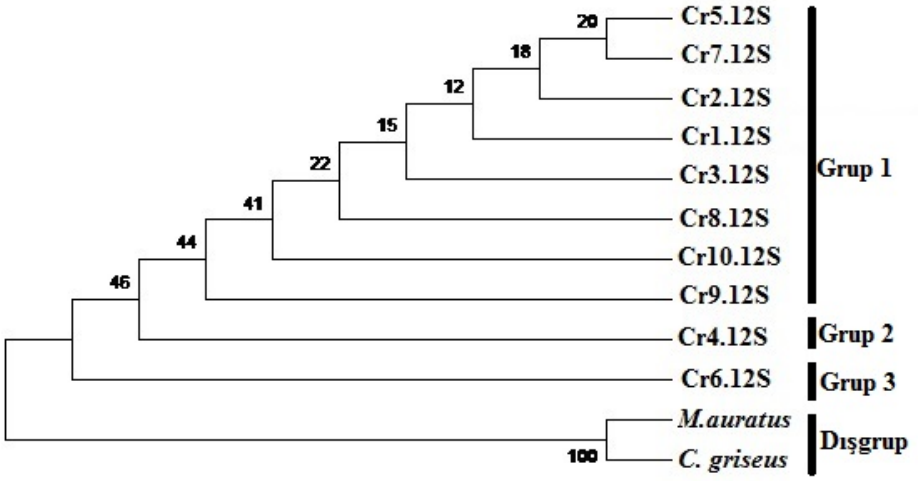
C. migratorius türüne ait Türkiye'den tespit edilen 15 mitokondriyal sitokrom *b* haplotipinin (1.140 bç) 10.000 tekrarlı (replikasyon) GTR+G baz değişim modeli kullanılarak yapılan ML analizi sonucunda üç ana grupta (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3) kümelendikleri görüldü (Şekil 4.9). Mitokondriyal sitokrom *b* haplotiplerinden elde edile ML ağacının topolojisi (Şekil 4.9), sitokrom *b* haplotiplerinden elde edile NJ ağacının (Şekil 4.6), topolojisi ile benzerlik göstermektedir.

C. migratorius türüne ait Türkiye'den tespit edilen 10 mitokondriyal 12S rRNA haplotipinin (901 bç) 10.000 tekrarlı (replikasyon) HKY+I baz değişim modeli kullanılarak

yapılan ML analizi sonucunda üç ana grupta (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3) kümelendiği görüldü (Şekil 4.10). Mitokondriyal 12S rRNA haplotiplerinden elde edilen ML ağacının topolojisi (Şekil 4.10), 12S rRNA haplotiplerinden elde edilen NJ ağacının (Şekil 4.7) topolojisi ile benzerlik göstermektedir.



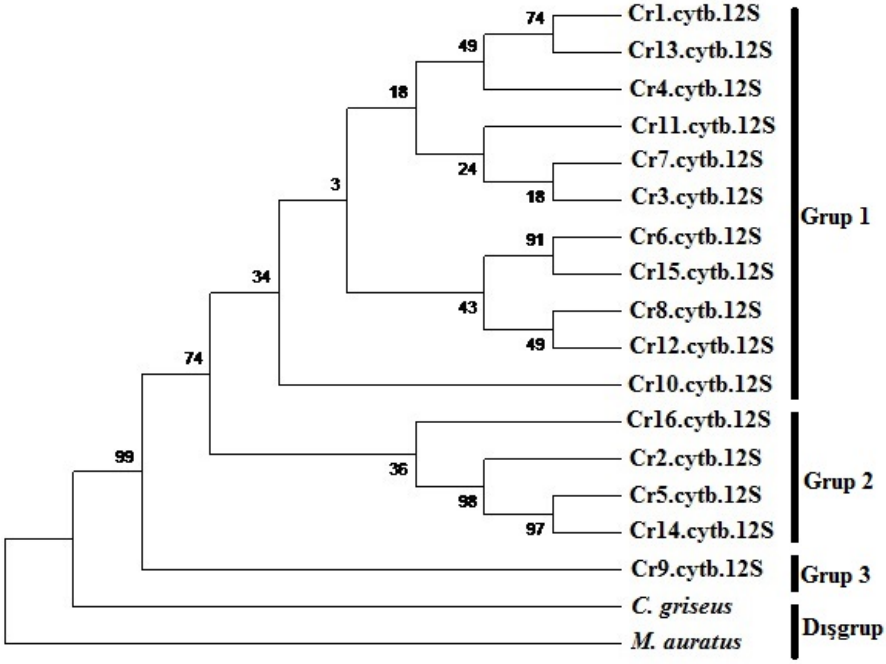
Şekil 4.9. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye sitokrom *b* haplotipleri (1140 bç) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ML ağacı (10 000 tekrarlı).



Şekil 4.10. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye 12S rRNA haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ML ağacı (10 000 tekrarlı).

Türkiye'den *C. migratorius* türüne ait mitokondriyal sitokrom *b* ve 12S rRNA gen bölgelerinden elde edilen dizilerin birleştirilmesi ile elde edilen 16 haplotipin (2041 bç)

10.000 tekrarlı (replikasyon) HKY+I baz değişim modeli kullanılarak yapılan ML analizi sonucunda üç ana grupta (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3) kümelendikleri görüldü (Şekil 4.11). Birleştirilmiş dizilerden elde edilen ML ağacının topolojisi (Şekil 4.11), sitokrom *b* haplotiplerden elde edilen ML ağacının topolojisi (Şekil 4.9) ile benzerlik göstermektedir.



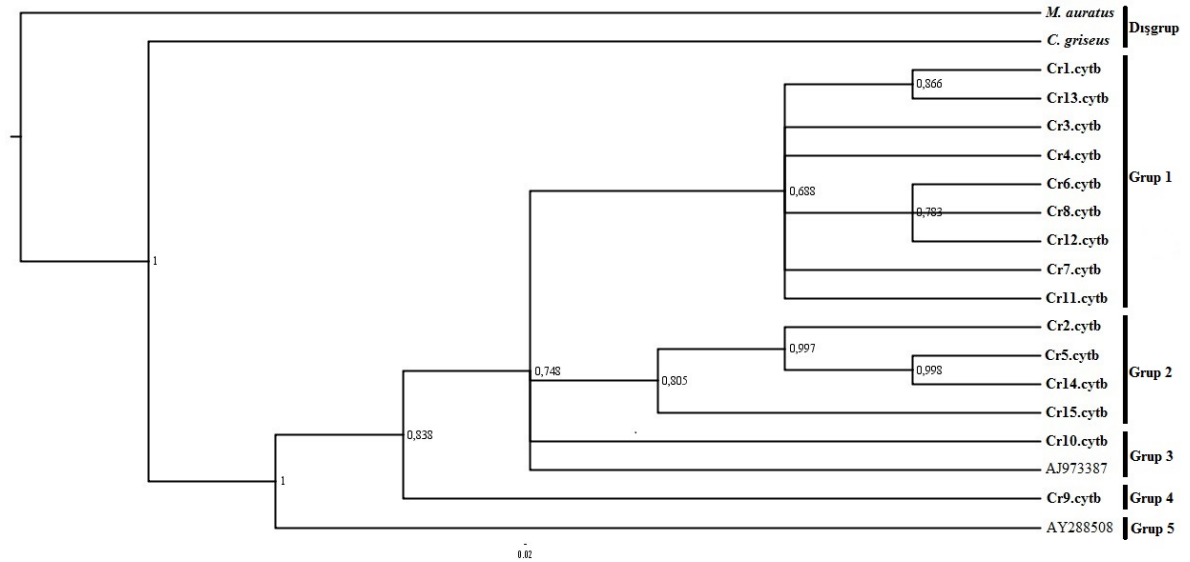
Şekil 4.11. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye sitokrom *b*+12S rRNA (birleştirilmiş) haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ML ağacı (10 000 tekrarlı).

4.2.5. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan Elde Edilen Dizilerin Bayesian Analizi

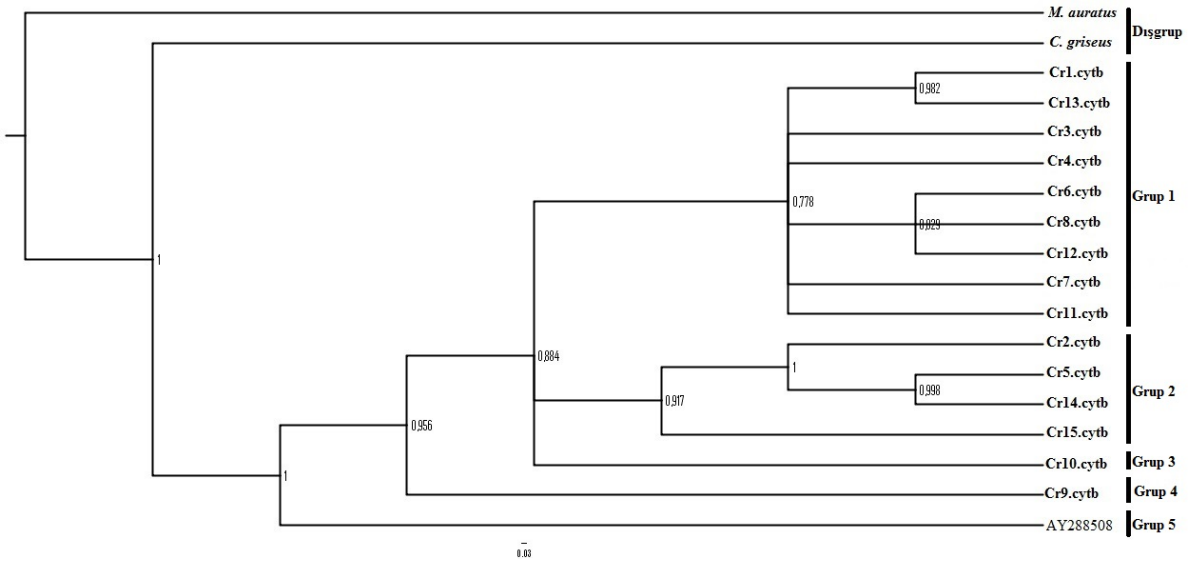
Bayesian metodu [55] ile *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan örneklerden tespit edilen mitokondriyal sitokrom *b* gen bölgesinin iki farklı dizi uzunluğuna (925 bç ve 1.140 bç) sahip haplotipler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için GTR+G baz değişim modeli kullanılarak Bayesian ağaçları (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15), elde edildi.

Mitokondriyal sitokrom *b* gen bölgesinin 925 bç ve 1140 bç'lik uzunluktaki haplotiplerin sırasıyla 400 bin ve 200 bin jenerasyonlu Bayesian analizi sonucunda elde edilen

iki Bayesian ağacı incelendiğinde benzer topoloji gösterdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13).



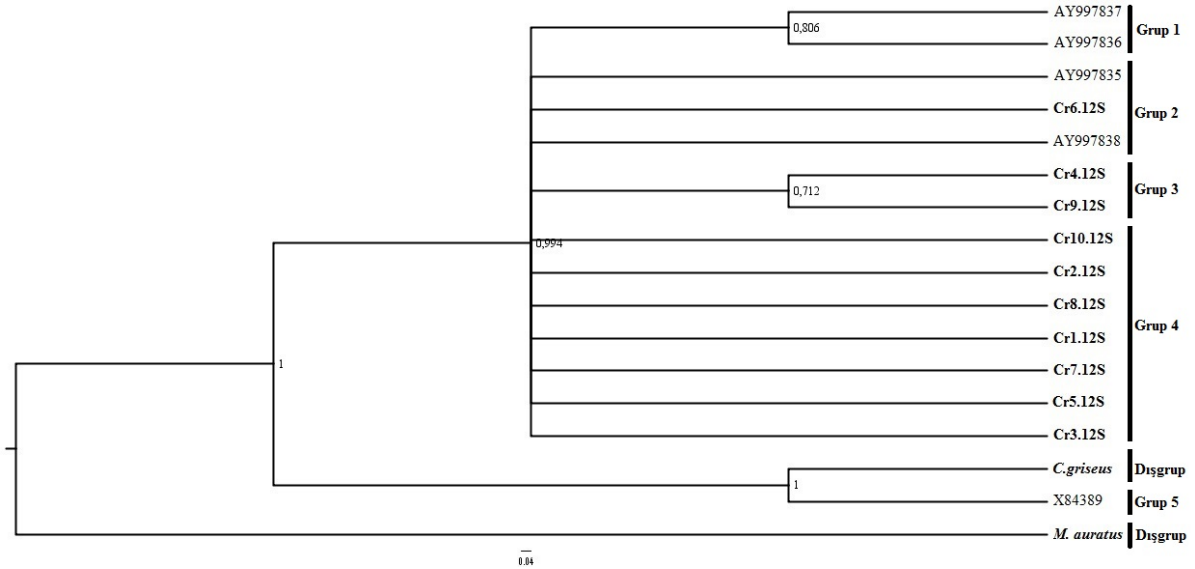
Şekil 4.12. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen sitokrom *b* haplotipleri (925 bç) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Bayesian ağacı.



Şekil 4.13. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen sitokrom *b* haplotipleri (1140 bç) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Bayesian ağacı.

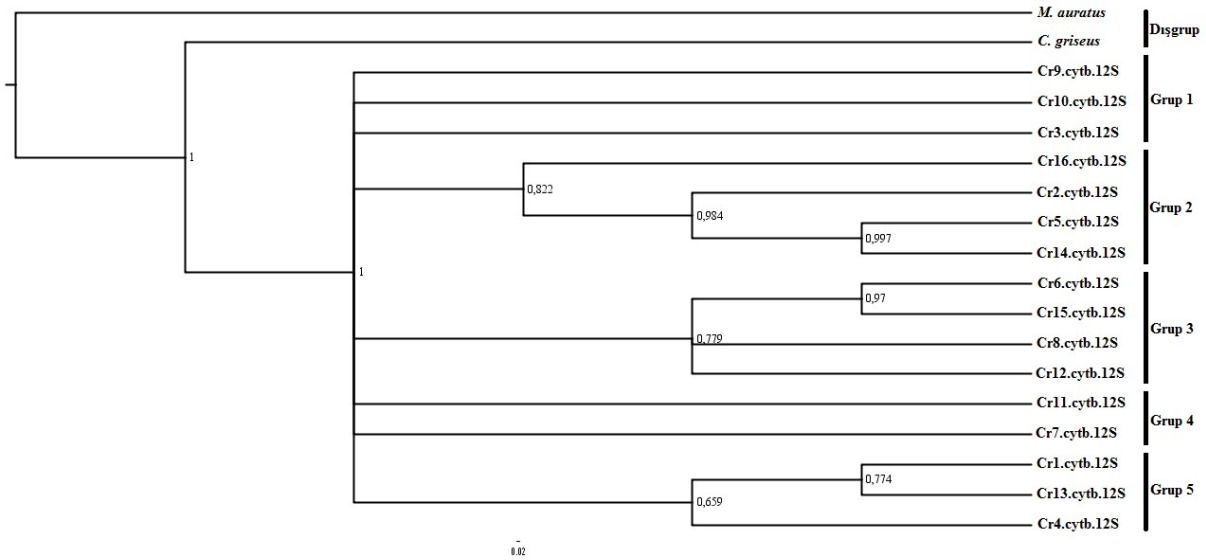
Mitokondriyal 12S rRNA gen bölgesine ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen dizilerden oluşturulan veri matrisinde yer alan 15 haplotip (851 bç) arasındaki filogenetik

ilişkileri belirlemek için HKY+I baz değişim modeli kullanılarak yapılan 250 bin jenerasyonlu Bayesian analizi sonucunda elde edilen Bayesian ağacı incelendiğinde X84389 numaralı Gen Bankası'ndan elde edilen örneğin dış grup olarak kullanılan *C. griseus* dizisi ile kümelendiği görülmüştür (Şekil 4.14). Bu sonuç, X84389 numaralı dizinin *C. migratorius*'a değil bilakis *C griseus*'a ait olduğunu önermektedir. Geri kalan haplotipler ise belirgin bir kümelenme göstermeyip politomi göstermektedir (Şekil 4.14). Politomi durumu, *C. migratorius* türünün populasyonları arasında ya da içerisinden analiz edilen örnek azlığından veya ortak ata ilişkisini belirlemede kullanılan temel karakterlerin (Sinapomorfi) az olmasından kaynaklanmış olabilir.



Şekil 4.14. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen 12S rRNA haplotipleri (854 bç) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Bayesian ağacı.

C. migratorius türüne ait mitokondriyal sitokrom *b* ve 12S rRNA gen bölgelerinden elde edilen dizilerin birleştirilmesi ile elde edilen 16 haplotipin (2041 bç) Bayesian analizi, Gen Bankası'nda veri olmadığından sadece Türkiye örneklerini kapsamaktadır. 400000 jenerasyonlu GTR+I+G baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi sonucunda politomi durumunu da kapsayan beş ana küme gözlenmiştir (Şekil 4.15).



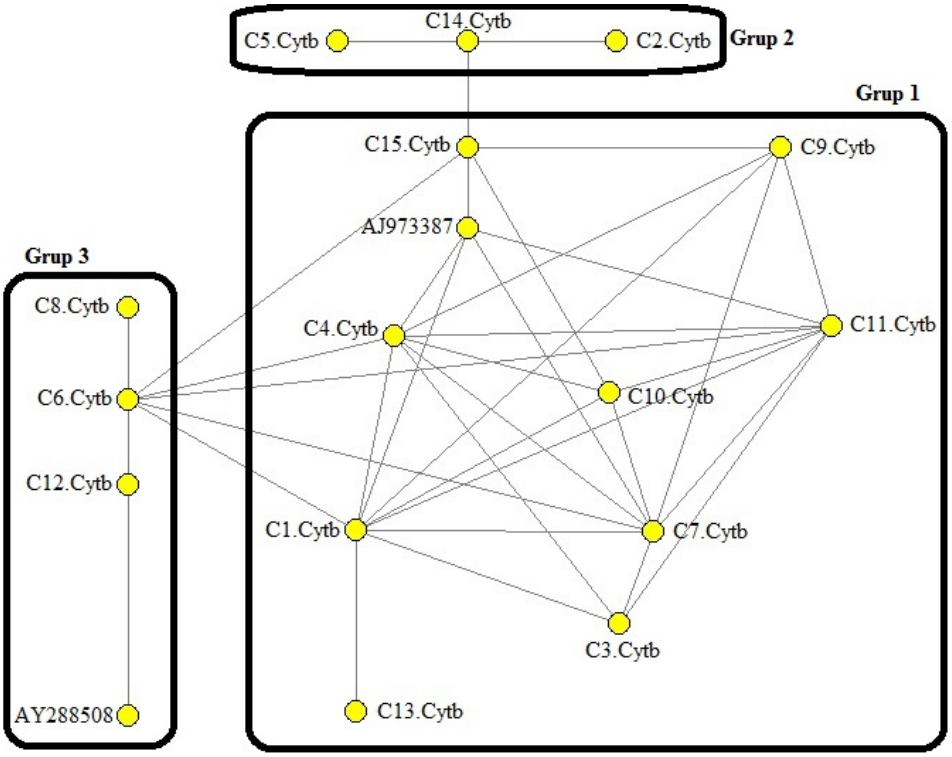
Şekil 4.15. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye elde edilen sitokrom *b*+12S rRNA (birleştirilmiş) haplotipleri (2054 bç) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Bayesian ağacı.

4.2.6. *Cricetulus migratorius* Türüne ait Haplotiplerin Network Analizi

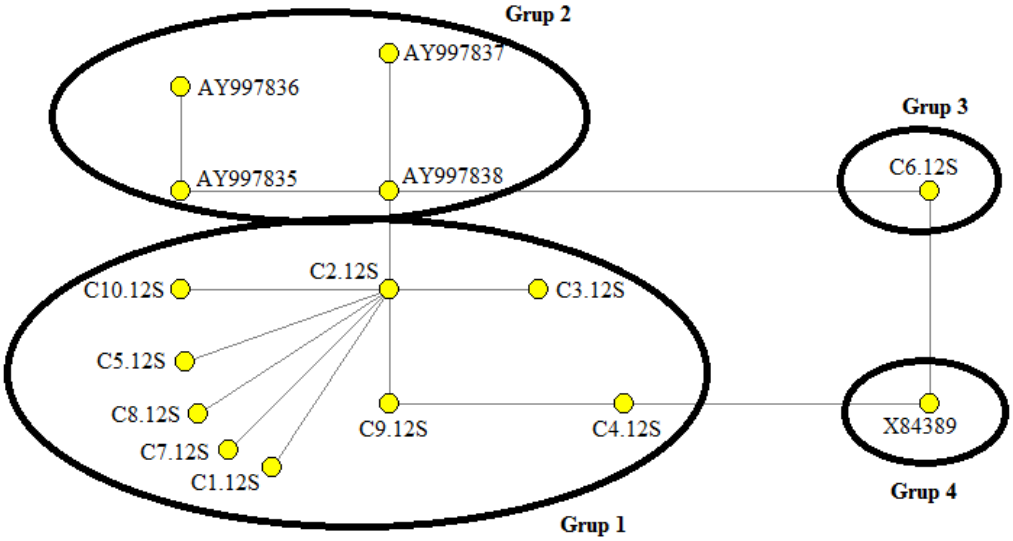
Cricetulus migratorius türüne ait haplotiplerin birbirleriyle olan ilişkileri daha iyi göstermek için Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen mitokondriyal haplotiplerin median-joining metodu [58] ile network analizi yapıldı.

Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen mitokondriyal sitokrom *b* haplotiplerinden (925 bç) oluşan network incelendiğinde Türkiye den elde edilen haplotiplerin, NJ, ML ve BI filogenetik ağaçlarında olduğu gibi benzer bir kümelenme eğilimi gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.16).

Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen mitokondriyal 12S rRNA haplotiplerinden (851 bç) oluşan network incelendiğinde Türkiye haplotiplerinin büyük oranda birlikte kümelendiği görülmektedir. Bununla birlikte X84389 numaralı Gen Bank haplotipi belirgin bir şekilde farklı görülmektedir (Şekil 4.17).

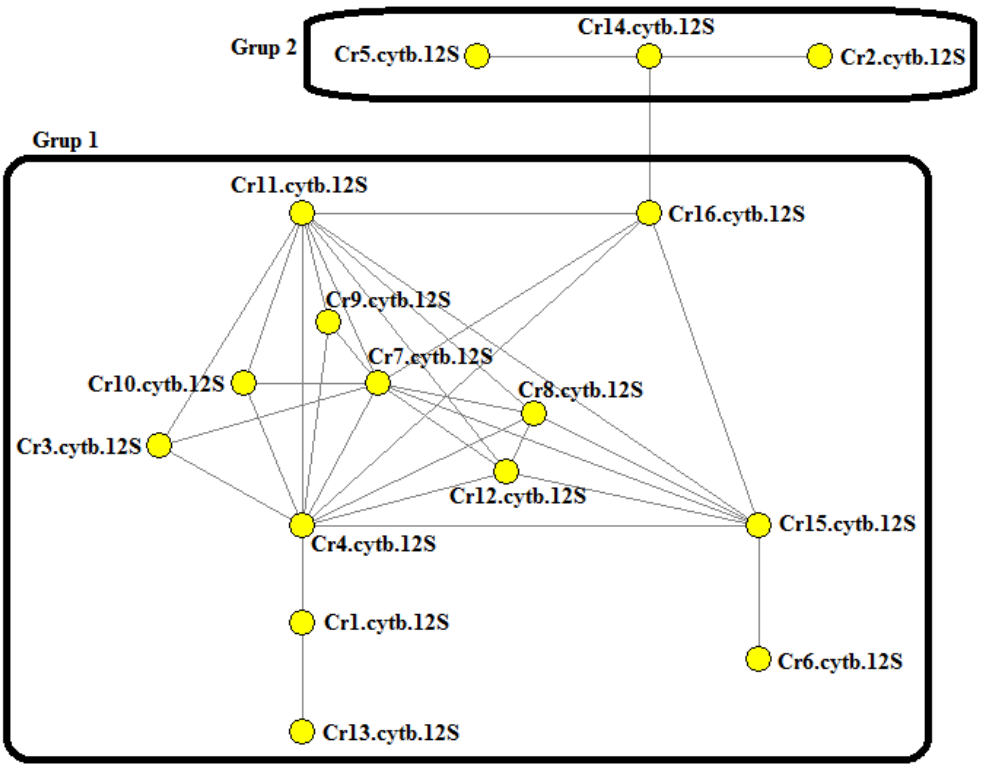


Şekil 4.16. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen sitokrom *b* haplotiplerinin (925 bç) Median-joining networkü.



Şekil 4.17. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen 12S rRNA haplotiplerinin (851 bç) Median-joining networkü.

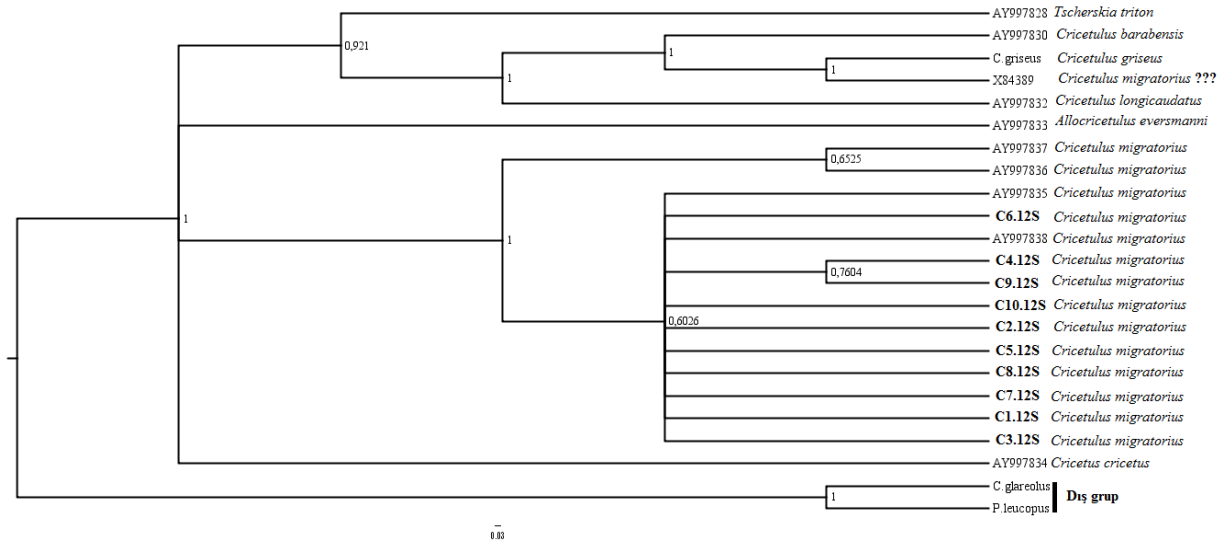
Türkiye'den elde edilen mitokondriyal sitokrom *b* ve 12S rRNA dizilerinin birleştirilmesi ile elde edilen haplotiplerden (2041 bç) oluşan network incelendiğinde iki ana grup görülmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. *Cricetulus migratorius* türüne ait Türkiye'den elde edilen sitokrom *b*+12S rRNA (birleştirilmiş) haplotiplerinin (2041 bç) Median-joining networkü.

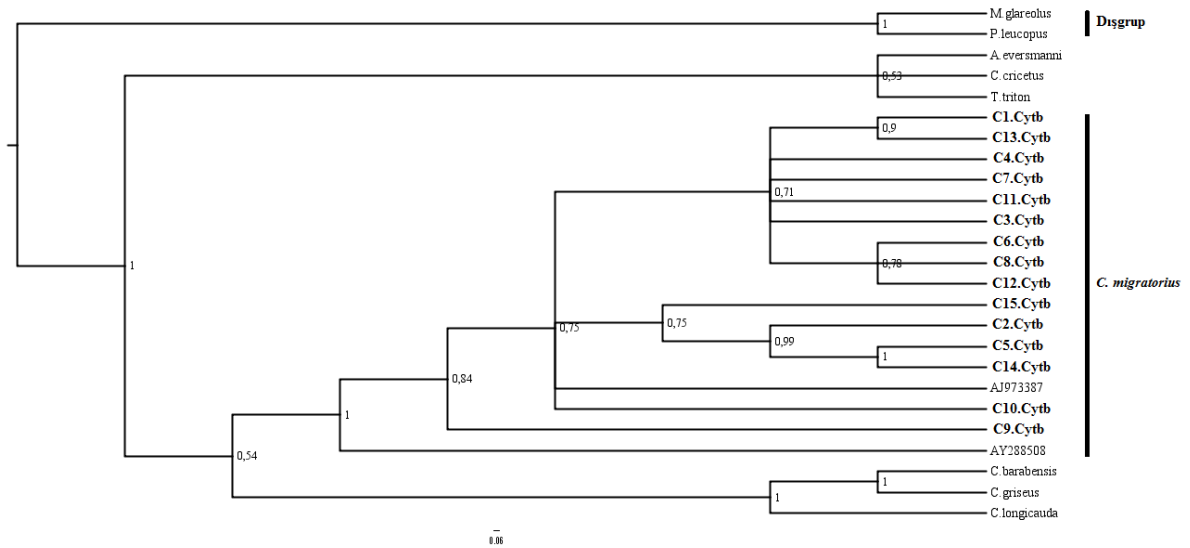
4.2.7. *Cricetulus migratorius* Türüne Ve Diğer Yakın Türlere Ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan Elde Edilen Haplotiplerin Bayesian Analizi

C. migratorius türüne ve *Cricetulus* cinsine yakın olduğu kabul edilen cinslere ait türlerin haplotipleri arasındaki filogenetik ilişkiler, GTR+I+G baz değişim modeli kullanılarak Bayesian analizi ile belirlenmeye çalışıldı. *Cricetulus migratorius* türüne ait 12S rRNA (852 bç) haplotiplerinin 280000 jenerasyonlu GTR+I+G baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi sonucunda bir haplotip hariç (X84389) bilinen ve bu çalışmada tespit edilen tüm haplotipler bir arada kümelendi. X84389 Gen Bankası numaralı haplotip büyük ihtimalle *Cricetulus griseus* türüne ait olabilir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *Cricetulus migratorius* türüne ve diğer yakın türlere ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen 12S rRNA haplotipleri (852 bç) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Bayesian ağacı.

Cricetulus migratorius türüne ait sitokrom *b* (925 bç) haplotiplerinin 320000 jenerasyonlu GTR+I+G baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi sonucunda bilinen ve bu çalışmada tespit edilen tüm haplotipler bir arada kümelendi. (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *Cricetulus migratorius* türüne ve diğer yakın türlere ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen sitokrom *b* haplotipleri (925 bç) arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Bayesian ağacı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Cricetulus cinsi, Cricetinae altfamilyası içerisindeki en büyük cinslerden biridir [1] ve altı tür içermektedir [1, 2]. Bu türlerden biri olan *C. migratorius* ile ilgili mevcut moleküler filogenetik çalışmalar sayıca az olup genellikle bu türün filogenetik durumu yerine daha çok yüksek taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin araştırıldığı çalışmalardır [3, 19, 20]. Neumann et al. [3], cinsin monofiletikliğinin gerçek olmayabileceğini belirtmişler ve geniş bir yayılış gösteren *C. migratorius* türünün gerçekte *Cricetulus* grubunun dışında kaldığı ve *Tscherskia, Cricetus* ve *Allocricetulus* ile daha yakın ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca bu yazarlar [3], *C. migratorius* türünün yeni bir monotipik cins içerisinde yer almasını önerdiler.

C. migratorius (gri cüce hamster) türüne ait Türkiye'den elde edilen örnekleri ile yapılmış çalışmalarda genel olarak morfolojik ve karyolojik temelli çalışmalar yapılmıştır [6, 15-17]. Türkiye gri cüce hamsterlarını kapsayan moleküler çalışma sayısı çok azdır [3, 18]. İbiş et al. [18], allozim elektroforezinden elde edilen verileri analiz ederek genetik varyasyonları tespit etmişler ve Neumann et al. [3] ise Kayseri'den sadece bir *C. migratorius* örneğinden elde edilen mitokondriyal (sitokrom *b* ve 12S rRNA) ve nüklear (vWF) gen bölgelerinin dizilerini kullanarak Cricetinae altfamilyasının moleküler filogenisini ortaya koymaya çalışmışlardır.

Bu çalışmada mitokondriyal 12S rRNA gen bölgesine ait Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen diziler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için yapılan Bayesian analizi sonucunda elde edilen Bayesian ağacı incelendiğinde Gen Bankası'ndan elde edilen X84389 [61] numaralı örneğin dış grup olarak kullanılan *C. griseus* ile kümelendiği görülmüştür. Bu analiz, X84389 [61] numaralı örneğin *C. migratorius*'a değil bilakis *C griseus*'a ait olduğunu önermektedir. Geri kalan haplotipler ise belirgin bir kümelenme

göstermeyip politomi göstermiştir. Buna ilave olarak Türkiye ve Gen Bankası'ndan elde edilen mitokondriyal 12S rRNA haplotiplerinden (851 bç) oluşan network incelendiğinde ise dört grubun oluştuğu ve Türkiye haplotiplerinin büyük oranda birlikte kümelendiği görülmektedir. Bununla birlikte X84389 numaralı Gen Bankası haplotipi [61], Bayesian analizinde olduğu gibi belirgin bir şekilde farklı görülmektedir. Gen Bankası'nda yayınlanan ve lokalitesi bilinmeyen bu dizi [61], belirgin bir şekilde farklı olup Türkiye, Ermenistan, Özbekistan ve Rusya haplotiplerinden ayrılmaktadır. Hanni et al. [61] tarafından kaydedilen bu haplotip dışındaki *C. migratorius* haplotipleri, coğrafik olarak nispeten birlikte kümelenirken lokalitesi bilinmeyen bu haplotipin ayrı dallanma göstermiş olması, bu haplotipin farklı bir türe ait olabileceği izlenimi vermektedir.

C. migratorius'un mitokondriyal sitokrom *b* gen bölgesiyle ilgili olarak Gen Bankası'nda çok fazla veri bulunmamaktadır. Mitokondriyal sitokrom *b* (925 bç) ve 12S rRNA (852 bç) gen bölgelerine ait haplotiplerin Bayesian analizi sonucunda elde edilen iki Bayesian ağacı (Şekil 4.19, Şekil 4.20) incelendiğinde benzer topoloji gösterdikleri gözlenmiştir. Şekil 4.19 ve Şekil 4.20 incelendiğinde Neumann et al. [3] tarafından verilenin aksine bir sonuç vardır. Bu çalışmadaki analizlere göre tüm *Cricetulus migratorius* haplotiplerinin diğer *Cricetulus* türleriyle yakın kümelenmiştir.

Bu çalışmada *C. migratorius* türüne ait Türkiye'den elde edilen örneklerin mitokondriyal DNA Cyt *b* ile 12S rRNA ve nüklear DNA GHR gen bölgelerinin dizi analizi yapılarak Türkiye'de yayılış gösteren *C. migratorius* türünün genetik çeşitliliği ve soy hatları belirlenmeye çalışıldı. Genetik analiz sonuçlarına göre mtDNA haplotip çeşitliliğinin 1'e yakın olması, GHR dizilerinde heterozigotik bölgelerin bulunması ve mtDNA haplotiplerine göre hesaplanmış genetik uzaklık değerleri değerlendirildiğinde, genetik çeşitliliğin nispeten yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca Network analizine göre haplotiplerin iki haplogrup içerisinde yer aldığı görülmektedir.

5.2. Sonuç

Bu çalışmada Türkiye'nin Anadolu kısmından daha önce elde edilmiş 20 *Cricetulus migratorius* örneği kullanıldı. 20 örneğin mitokondriyal sitokrom *b* (1140 bç) ve 12S rRNA (901 bç) dizi analizleri yapılırken 14 örneğin ise nüklear gen (GHR) bölgesinin (828 bç) dizi analizi yapıldı. 2011 ve 2012 yıllarında yapılan arazi çalışmalarında daha fazla örnek elde edilemedi. Bütçeden 2013 yılı için talep edilen bütçeden harcama kalemleri arası aktarma yapılmadığından arazi çalışması yapılamadı ve mevcut örnekler çalışıldı.

C. migratorius türünün genetik çeşitliliğinin ve soy hatlarının detaylı bir şekilde tespit edilebilmesi için Türkiye'deki ve türün yayılış alanı içerisinde yer alan diğer coğrafyalardaki örnekleme yapılmamış bölgelerden de örnek temin edilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1-Wilson, D.E., Reeder, D.M., Mammal species of the World. Smithsonian Instution press, Washington, USA, (2005).

2-Nowak, R.M., Paradiso, J.L., Walker's mammals of the World. Baltimore, Johns Hopkins University Press, Baltimore / London, (1983).

3-Neumann, K, et al., Molecular phylogeny of the Cricetinae subfamily based on the mitochondrial cytochrome *b* and 12S rRNA genes and the nuclear vWF gene. Mol. Phylogenet. Evol., 39, 135–148, (2006).

4-Kryštufek, B., Vohralik, V., Mammals of Turkey and Cyprus. Knjiznica Annales Majora, Koper, (2009).

5- Seçkin, S., Coşkun, Y., Mammalian remains in the pellets of long-eared owls (*Asio otus*) in Diyarbakır Province. Turk. J. Zool., 30, 271-278, (2006).

6-Doğramacı, S., Geographic variations of *Cricetulus migratorius* (Mammalia: Rodentia) in Turkey. Ondokuz Mayıs Üniv. Fen Der., 1(3), 1-24 (Türkçe), (1989).

7-Nechay, G., Status of Hamsters: *Cricetus cricetus, Cricetus migratorius, Mesocricetus newtoni* and other hamster species in Europe. Nature and Environment Series, No. 106, Council of Europe Publishing, May, (2000).

8-Gattermann, R., et al., Notes on the current distribution and the ecology of wild golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). J. Zool., Lond., 254, 359-365, (2001).

9-Yiğit, N., et al., Türkiye'deki *Mesociricetus brandti* (Nehring, 1898) (Mammalia: Rodentia)'nın biyoloji üzerine araştırma. Turk. J. Zool., 21, 343-348, (1997).

10-Yiğit, N., et al., The distribution, morphology, and karyology of the genus *Mesocricetus* (Mammalia: Rodentia) in Turkey. Folia Zool., 49(3), 167-174, (2000).

11-Yiğit, N., Age-dependent cranial variations in *Mesocricetus brandti* (Mammalia: Rodentia) distributed in Turkey. Turk. J. Zool., 27, 65-71, (2003).

12-Yiğit, N., et al., Morphological and biometrical comparisons of *Mesocricetus* Nehring, 1898 (Mammalia: Rodentia) species Distributed in the Palaearctic Region. Turk. J. Zool., 30, 291-299, (2006).

13-Yiğit, N., et al., Allozyme variations and genetic differentiation in *Mesocricetus brandti* Nehring, 1898 and *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) (Mammalia: Rodentia). Turk. J. Zool., 31, 219-227, (2007).

14-Yiğit, N., et al., Hibernation pattern and importance of superoxide dismutase for the Turkish hamster, *Mesocricetus brandti* (Mammalia: Rodentia). Turk. J. Zool., 32, 421-425, (2008).

15-Doğramacı, S., Kefelioğlu, H., The karyotype of *Cricetulus migratorius* (Mammalia: Rodentia) from Turkey. Doğa-Turk. J. Zool., 15, 59-63, (1991).

16-Arslan, A., Akan, S., G- and C-banded karyotype of *Cricetulus migratorius* Pallas, 1773 (Mammalia: Rodentia) in Central Anatolia. Turk. J. Zool., 32, 453-456, (2008).

17-Aşan, N., et al., Nucleolar organizer regions (NORs) in *Cricetulus migratorius* (Pallas, 1773) and *Meriones tristrami* Thomas, 1892 (Mammalia: Rodentia) from Central Anatolia. Turk. J. Zool.,34, 231-236, (2010).

18-İbiş, O., et al., A preliminary study of the allozyme variation in the grey hamster, *Cricetulus migratorius* (Mammalia: Rodentia), from the Asian part of Turkey. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 63 (2), 381-391, (2011).

19-Michaux, J., et al., Evolutionary history of the most speciose Mammals: molecular phylogeny of muroid rodents. Mol. Biol. Evol., 18(11), 2017–2031, (2001).

20-Norris, R.W., et al., The phylogenetic position of the zokors (Myospalacinae) and comments on the families of muroids (Rodentia). Mol. Phylogenet. Evol., 31, 972–978, (2004).

21-Wilson, A.C., Restriction mapping in the molecular systematics of mammals: a restrospective salute. Elsevier Science Publisher Biomedical Division, 29, 407-419, (1989).

22-Irwin, D.M., et al., Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. J. Mol. Evol., 32, 128-44, (1991).

23-Tobe, S.S., Linacre, A.M.T., A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome *b* gene. Electrophoresis, 29, 340–347, (2008).

24-Flynn, J.J., et al., Molecular phylogeny of the Carnivora (Mammalia): assessing the impact of increased sampling on resolving enigmatic relationships. Syst. Biol. 54(2), 317–337, (2005).

25-Ledje, C., Arnason, U., Phylogenetic analyses of complete cytochrome *b* genes of the order Carnivora with particular emphasis on the Caniformia. J Mol Evol., 42, 135-144, (1996a).

26-Ledje, C., Arnason, U., Phylogenetic relationships within caniform carnivores based on analyses of the mitochondrial 12S rRNA gene. J. Mol. Evol., 43, 641-649, (1996b).

27-Dragoo, J.W., Honeycutt, R.L., Systematics of mustelid-like carnivores. J. Mammal., 78, 426–443, (1997).

28-Debry, W.R., Seshadri, S., Nuclear intron sequences for phylogenetics of closely related mammals: an example using the phylogeny of *Mus*. J.Mammal., 82(2), 280–288, (2001).

29-Adkins, R.M., et al., Bushbaby growth hormone is much more similar to nonprimate growth hormones than to rhesus monkey and human growth hormones. Mol. Biol. Evol., 18(1), 55-60, (2001a).

30-Adkins, R.M., et al., Molecular phylogeny and divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes. Mol. Biol. Evol., 18(5), 777–791, (2001b).

31-Huchon, D., et al., Molecular evolution of the nuclear von Willebrand Factor Gene in mammals and the phylogeny of rodents. Mol. Biol. Evol., 16(5), 577–589, (1999).

32-Debry, R.W., Segal RM., Phylogeny of Rodentia (Mammalia) inferred from the nuclear-encoded gene IRBP. Mol. Phylogenet. Evol., Vol. 19, No. 2, May, pp. 290–301, (2001).

33-Steppan, S.J., et al., Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1. Mol. Phylogenet. Evol., 30, 703–719, (2004).

34-Jansa, S.A., Weksler, M., Phylogeny of muroid rodents: relationships within and among major lineages as determined by IRBP gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 31, 256–276, (2004).

35-Norris, R.W., et al., The Phylogenetic Position of the Zokors (Myospalacinae) and Comments on the Families of Muroids (Rodentia). Mol. Phylogenet. Evol., 31, 972–978, (2004).

36-Suziki, H., et al., Temporal, spatial, and ecological modes of evolution of Eurasian *Mus* based on mitochondrial and nuclear gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 33, 626–646, (2004).

37-Steppan, S.J., et al., Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents Based on Multiple Nuclear Genes. Syst. Biol. 53(4), 533–553, (2004).

38-Steppan, S.J., et al., Multigene phylogeny of the old world mice, Murina reveals distinct geographic lineages and the declining utility of mitochondrial genes compared to nuclear genes. Mol. Phylogenet. Evol., 37, 370–388, (2005).

39-Veyrunes, F., et al., Molecular phylogeny of the African pygmy mice, subgenus *Nannomys* (Rodentia, Murinae, *Mus*): implications for chromosomal evolution. Mol. Phylogenet. Evol., 36, 358–369, (2005).

40-Galewski, T., et al., The evolutionary radiation of Arvicolinae rodents (voles and lemmings): relative contribution of nuclear and mitochondrial DNA phylogenies. BMC Evol. Biol., 6, 80, (2006).

41-Koepfli, K.P., Wayne, R.K., Type I STS markers are more informative than cytochrome *b* in phylogenetic reconstruction of the Mustelidae (Mammalia: Carnivora). Syst. Biol. 52(5):571–593, (2003).

42-Springer, M.S., et al., Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deeplevel mammalian phylogeny reconstruction. Mol. Biol. Evol., 18, 132–143, (2001).

43-Eizirik, E., et al., Pattern and timing of diversification of the mammalian order Carnivora inferred from multiple nuclear gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 56, 49–63, (2010).

44-Amrine-Madsen, H., et al., A new phylogenetic marker, Apolipoprotein B, provides compelling evidence for eutherian relationships. Mol Phylogenet Evol., 28, 225-240, (2003).

45-Koepfli, K.P., et al., Multigene phylogeny of the Mustelidae: resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation. BMC Biol., 6, 10, (2008).

46-Sato, J.J., et al., Evidence from nuclear DNA sequences sheds light on the phylogenetic relationships of Pinnipedia: single origin with affinity to Musteloidea. Zool. Sci., 23, 125–146, (2006).

47-Yu, L., et al., Phylogenetic relationships within mammalian order Carnivora indicated by sequences of two nuclear DNA genes. Mol. Phylogenet. Evol.,33, 694–705, 2004.

48-Rokas, A., et al., Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. Nature, 425, 798–804, (2003).

49-Vaughan, T.A., Ryan, J.M., Czaplewski, N.J., Mammalogy. Foruth edition, Brooks/Cole, USA, (2000).

50-Nowak, R.M., Walker's mammals of the World. Baltimore and London, Johns Hopkins University Press, (1999).

51-Smith MF., Patton JL., The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine Tribe. Biol. J. Linn. Soc., 50, 149-177, (1993).

52-Geneious version (R6.1.6) created by Biomatters. Available from http://www.geneious.com/

53-Rozas, J., Librado, P., DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25, 1451-1452, (2009).

54-Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. Mol. Biol. Evol., 28(10), 2731–2739, (2011).

55-Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19, 1572-1574, (2003).

56-Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods, 9(8), 772, (2012).

57-Rambaut, A., FigTree: Tree figure drawing tool, version 1.3.1. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/ (2009):

58-Bandelt, H.J., et al., Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Phylogenet. Evol., 16, 37-48, (1999).

59-Bradley, R.D., et al., Toward a molecular phylogeny for evidence from mitochondrial cytochrome-*b* sequences. J. Mammal. 88 (5), 1146-1159, (2007).

60-Dubois, J.Y., et al., Molecular relationships of three genera of Nesomyinae, endemic rodent taxa from Madagascar, as deduced from mitochondria. J. Mammal. Evol., 3, 239-260, (1999).

61-Hanni, C., et al., Evolutionary relationships of Acomys and other murids. Isr. J. Zool., 41, 131-146, (1999).

62-Norris, R.W., et al., The phylogenetic position of the zokors (Myospalacinae) and comments on the families of muroids (Rodentia). Mol. Phylogenet. Evol., 31 (3), 972-978, (2004).

63-O'Brien, K.P., et al., Characterization of five novel human genes in the 11q13-q22 region. Biochem. Biophys. Res. Commun., 273 (1), 90-94, (2000).

64-Partridge, M.A., et al., The complete nucleotide sequence of Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) mitochondrial DNA. DNA Seq., 18 (5), 341-346, (2007).

65-Song, G.H., et al., Analysis of two hamster mitochondrial genomes. Unpublished, (2009).

66-Wojcik,J.M., et al., Phylogeographic signatures of northward post-glacial colonization from high-latitude refugia: a case study of bank voles using museum specimens. J. Zool., 281 (4), 249-262, (2010).