

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Lisansüstü Tez Projesi (Yüksek Lisans)

Proje No : 19L0430002

Proje Yürütücüsü : Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Proje Başlığı : Marmara Bölgesi ve Kuzey Anadolu'da Yayılış Gösteren *Mus* Linneaus, 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsi Türlerinde Mitokondriyal DNA Sitokrom Oksidaz Alt Ünitesi 1 (*COI*) ve Nükleer DNA Apolipoprotein B (*APOB*) Gen Bölgelerinin Analizi

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

GEREKÇESİ:

30/06/2021

Proje Yürütücüsü

Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

İmza

1946

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

Marmara Bölgesi ve Kuzey Anadolu'da Yayılış Gösteren *Mus* Linneaus, 1758 (Mammalia: Rodentia)
Cinsi Türlerinde Mitokondriyal DNA Sitokrom Oksidaz Alt Ünitesi 1 (CO1) ve Nükleer DNA
Apolipoprotein B (APOB) Gen Bölgelerinin Analizi

Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Mahir Can ŞENKUŞ

Proje Numarası: 19L0430002

Başlama Tarihi: 26.03.2019

Bitiş Tarihi: 26.03.2021

Rapor Tarihi: 18.03.2021

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara – 18. 03. 2021

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Proje Adı: Marmara Bölgesi ve Kuzey Anadolu'da Yayılış Gösteren *Mus* Linneaus, 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsi Türlerinde Mitokondriyal DNA Sitokrom Oksidaz Alt Ünitesi 1 (*CO1*) ve Nükleer DNA Apolipoprotein B (*APOB*) Gen Bölgelerinin Analizi

Proje İngilizce Adı: Analysis Of Nuclear Dna Apolipoprotein B (Apob) And Mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase Subunit I (CO1) Gene Regions In Genus *Mus* Linnaeus, 1758 (Mammalia: Rodentia) Species Distributed In Marmara And Northern Anatolia Regions

Özet: Bu proje çalışmasında, Marmara ve Kuzey Anadolu bölgelerinde 44 lokaliteden, 48 adet *Mus domesticus* ve 35 adet *Mus macedonicus* olmak üzere toplamda 83 örnek analiz edildi. Analizlerde, mitokondriyal DNA gen bölgesi olarak Sitokrom Oksidaz alt ünite 1 (CO1) ve nükleer DNA gen bölgesi olarak Apolipoprotein B (APOB) dizileri kullanıldı. Çalışmada, APOB gen bölgesi için 23 haplotip, CO1 gen bölgesi için 33 haplotip elde edilmiştir. Her iki gen bölgesi için oluşturulan filogenetik ağaçlara göre, *M. domesticus* örnekleri dağınık bir kümeleşme gösterirken, *M. macedonicus* örnekleri iki soy hattına ayrıldı. CO1 gen bölgesine göre *M. domesticus*'un Posof (Ardahan) örneği türünün diğer bireylerinden farklılık gösterirken, Trakya-Güney Marmara-Adalar soy hatları birarada kümelendi. *M. macedonicus*'ta, Samsun-Kurupelit örnekleri diğer örneklerden ayrıldı. APOB gen bölgesinde ise, *M. domesticus* örneklerinden Ardahan ve Borçka diğer örneklerden ayrıldı. *M. macedonicus*'ta Gökçeada-Uğurlu örneği diğer soy hatlarından ayrıldı. CO1 gen bölgesi verileriyle oluşturulan evrimsel ayrılma zamanı analizinde iki tür arasındaki farklılaşmanın yaklaşık 4.79 Myö gerçekleştiği tahmin edildi. Bu farklılaşma zamanının Akdeniz Tuzluluk Krizi'nden (5.96-5.33 Myö) sonra iklim değişikliklerinin ve tektonik olayların hüküm sürdüğü erken Pliyosen dönemine karşılık geldiği tespit edildi. *M. domesticus*'un Ardahan soy hattının türün geri kalanından yaklaşık 1.73 Myö ayrıldığı tahmin edildi. Bu ayrılma zamanı da Pleyistosen iklim değişiklikleri dönemine karşılık gelmektedir.

Abstract: Forty-eight specimen of *Mus domesticus* and thirty-five specimen of *Mus macedonicus*, in total 83 specimen which shows distribution at 44 locations of Marmara and North Anatolia Region analyzed in this thesis study. CO1 for mitochondrial DNA gene region and APOB for nuclear DNA gene region are used in analysis. While twenty-three haplotypes were obtained from our specimens for APOB gene region, thirty-three haplotypes were determined for CO1 gene region. At phylogenetic trees which depends on both gene regions, while *M. domesticus* haplotypes shows distracted cumulation, *M. macedonicus* specimens are seperated to two linages. According to CO1 gene region, when Ardahan

specimen of *M. domesticus* seperated from remain of species, Trakya-South Marmara-Adalar lineages clustered together. In *M. macedonicus*, Samsun-Kurupelit specimens splitted from others. For APOB gen region, Ardahan and Borçka specimens shows difference from other *M. domesticus* specimens. In *M. macedonicus*, Gökçeada-Uğurlu specimen seperated from other linages. With Bayesian Interference Analyze which is generated by CO1 gene region sequences estimated that two species divergenced about 4.79 Mya. This divergence time in the genus *Mus* corresponds to early Pliocene, which was prevailed by climatic changes, tectonic and orogenic events, after Mediterranean Salinity Crisis (5.96-5.33 Mya). Ardahan haplotype of *M. domesticus* seperated from remain of species about 1.73 Mya, which come across to period that Pleistocene climatic changes prevails.

II. Amaç ve Kapsam

Türkiye, güneyinde Akdeniz, batısında Ege Denizi, kuzey-batısında Marmara Denizi ve kuzeyinde Karadeniz tarafından sarılan ve kara bütünlüğü Anadolu ile Trakya kara parçaları tarafından sağlanan coğrafya üzerinde yer almaktadır. Akdeniz ve Karadeniz havzalarıyla, Marmara bölgesi ve Kuzey Anadolu bölgesi özellikle Orta Miyosen'den beri tektonik, iklimsel, havza oluşumu, yüzey yükselmeleri olaylarından etkilenmiştir. Bu olaylardan en önemlileri Akdeniz Tuzluluk Krizi (5.91-5.33 Myö), Pliyosen orojenik olayları, iklimdeki soğuma (5.33-1.81 Myö) ve Pleyistosen iklim dalgalanmaları (buzul dönemleri) (1.81 Myö-günümüz) olarak bilinmektedir. Anadolu ile Tarkya arasındaki kara bağlantıları zaman zaman kesintiye uğramış ve geç Pleyistosen'den beri İstanbul Boğazı ve Çanakkale Boğazı Marmara Denizi'ni, Akdeniz ve Karadeniz ile bağlayarak iki kara parçası arasındaki izolasyonu devam ettirmektedir. Bunun dışında Marmara ve Ege, sahip olduğu boğazlar haricinde, *Mus* cinsi türleriyle beraber bazı memeli türlerinin de yaşadığı irili-ufaklı birçok ada oluşumları ile de biyoçeşitlilik alanında önemli bir yer edinmektedir. Hem birbirlerinden hem de ana kara ile izole olan ada popülasyonları evrim bakımından önemli bilgiler sunabilmektedir. Doğal popülasyonlar arasında son derece önemli olan gen akışı, bu oluşumlar tarafından kesilmektedir ve adalara yerleşen küçük ve izole popülasyonlar zamanla farklı genetik soy hatlarını meydana getirmektedir.

Ülkemizde yayılış gösteren memeli hayvanlardan olan kemiriciler (Rodentia) takımı, ülkemizde 11 familya, 67 tür ile temsil edilmektedir (Yiğit vd. 2006). Bu takım içerisinde yer alan Muridae familyasına ait, *Mus* cinsi ülkemizde *Mus macedonicus* ve *Mus domesticus* türlerine sahiptir. Ancak, *M. domesticus*'un taksonomik statüsü tartışmalıdır. Literatürde hem tür olarak (*M. domesticus*) hem de alt tür (*Mus musculus domesticus*) olarak yer almaktadır (Wilson ve Reeder 2005). Bu tartışma, taksonun

İlk olarak morfolojik incelemede tür statüsünde değerlendirilmesinin ardından, ilerleyen süreçte morfoloji ve genetik analizler ışığında alt tür statüsüne düşürülmesinden süregelenmektedir. *Mus* cinsinin dünyada dört alt cinse ait 38 türü yaşamaktadır (Wilson ve Reeder 2005).

Schwarz E. ve Schwarz (1943) ile Ellerman ve Morrison-Scott (1951) *M. musculus* L., 1758 türünün Türkiye’de yayılış gösterdiğini kaydederek dünyada bu türün 15 alttüre sahip olduğunu belirtmişlerdir. Waterhouse (1837), Trabzon’dan *Mus abbotti*’yi tanımlamıştır. Vinogradov ve Argyropulo (1941) *M. m. abbotti*’nin Türkiye’de yayılış gösterdiğini kaydetmişlerdir. Ayrıca Yugoslavya’dan Petrov ve Ruzic (1983) tarafından tanımlanan *M. macedonicus*’un Türkiye’de de yayılış gösterdiği kaydedilmiştir (Yiğit vd. 2006).

Morfolojik özelliklere dayanarak yapılan çalışmalarda; Kryštufek ve Macholán (1998) *M. macedonicus*’un İç Anadolu Bölgesinde, Gözcelioğlu vd. (2005) ve Çolak vd. (2006) ise *M. domesticus* ile *M. macedonicus*’un ülkemizdeki yayılışını kaydetmişlerdir. Slabova ve Frynta (2007) Suriye, Türkiye’nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nden ve Avrupa’dan *M. m. domesticus*’un kökeni üzerinde araştırma yapmışlar ve *M. m. domesticus*’un Yakın Doğu’daki herhangi bir yerden köken aldığını ortaya koymuşlardır. Macholán vd. (2008) *M. macedonicus*’un Asya ve Avrupa popülasyonları arasındaki morfometrik farklılığın kıta içine göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmaların yanında moleküler metotlar kullanılarak *Mus* cinsinin evrimi ve sistematiği üzerinde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Rajabi-Maham vd. (2008) İran, Türkiye, Balkanlar ve Avrupa’dan *M. m. domesticus*’un mtDNA’nın kontrol bölgesinin 321 dizisini inceleyerek yayılış alanında bu taksonda çoklu yerleşme ve çoklu taşınmanın yaşandığını, takson içinde iki tane iyi ayrılmış soy hattının olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar hem Avrupa’ya hem de Anadolu’ya doğru en az iki yayılma rotasının olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar Akdeniz ve İstanbul Boğazı/Karadeniz rotalarını tanımlamışlardır.

Macholán vd. (2007) mtDNA kontrol bölgesi dizi analizine dayanarak hem Orta Doğu hem de Balkanlar’da yaşayan *Mus* cinsi türlerinin genetik varyasyonları üzerinde yapmış oldukları çalışmada İsrail’de yaşayan *M. macedonicus* popülasyonlarının farklı olduğunu ortaya koymuşlar ve bu popülasyonu *M. macedonicus speltoides* ismiyle yeni bir alttür olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar *M. macedonicus macedonicus*’un Avrupa ve Asya popülasyonları arasında genetik boşluğun olmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar *M. macedonicus* ile *M. specilegus* mtDNA farklılaşmasının %7.3 olduğu ve iki türün 700 000 ile 1 milyon yıl önce ayrıldığını tahmin etmişlerdir.

Suzuki vd. (2004) mtDNA ve çekirdek DNA dizi analizlerine dayanarak *Mus* cinsine ait 17 türün filogenetik ilişkilerini ortaya koymuşlar ve *M. macedonicus*'un *Mus musculus* tür grubu içinde yer aldığını belirtmişlerdir.

Orth vd. (2002) Gürcistan'dan Yunanistan'a kadar geniş alanda yayılış gösteren *M. macedonicus*'un hem mtDNA hem de çekirdek DNA gen bölgelerini analiz ederek bu türün kompleks bir filocoğrafik geçmişe sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Auffray vd. (1990), paleontolojik ve arkeozoolojik olarak yaptığı çalışmalar ile ev faresi *M. musculus*'un Batı Avrasya ve Kuzey Afrika'daki kolonizasyonunu araştırmışlardır. *Mus* cinsinin bu bölgelere, Pliyosen'den üst Pleyistosen'e kadar olan göç dalgalarının ardından *M. m. domesticus* olarak ortaya çıkmış olduğunu ve türün üst Pleyistosen'de en doğudaki Akdeniz Havzası'nda kaldığını öne sürmüşlerdir. Bu türün Akdeniz havzasına ilerlemeden önce ilk olarak, Epi-paleolitik Dönem'den Neolitik Çağ'a kadar Ortadoğu'da yaşamış ve Tunç Çağları boyunca Batı Akdeniz Havzasına ilerleyerek, en sonunda Demir Çağı'nda kuzeybatı Avrupa'da yaşadığını tespit etmişlerdir. Son bölgeye kıyasla, Kuzey-Orta Avrupa'nın, Neolitik Çağ'dan Tunç Çağı'na kadar nispeten erken kolonileşmiş olduğunu, ancak Avrupa'nın sadece *M. m. musculus* tarafından işgal edilmediğini, *M. m. domesticus*'un da Akdeniz'de bulunduğu zamanlarda bugün olduğundan çok daha fazla batıya yayıldığını göstermiştir. Bu arkeolojik araştırmanın, Batı Avrasya'daki ev faresi popülasyonlarının hızını, adımlarını ve ilerlemesini gösteren genetik verilerle de uyumlu olduğunu ifade etmişlerdir.

Bonhomme vd. (1989), Japon yabancı farelerden elde edilen nükleer genleri ve daha önceki çalışmalarda incelenen mtDNA dizilerini kullanarak 20 bölgeden alınan örnekleri karakterize etmek ve onları çevre ülkelerden gelen örneklerle karşılaştırmak için 16 farklı polimorfik lokusa protein elektroforezi uygulayarak bir araştırma yapmışlardır. Çalışmalar, ana Japon Adaları'nda *M. m. musculus* alt türünün baskın nükleer gen yapısını ortaya koymuşlardır. Ayrıca, Kuzey Honshu'da *M. m. castaneus* mtDNA'sı gözlemlenmiştir, ancak diğer taraftan Güney Kyushu'da *M. m. castaneus* varlığı tespit edilememiştir. Bununla birlikte, türlerin homojen bir gen dağılımına izin vermeyen evrim sürecinin, Avrupa hibrit bölgesinde gözlemlenen durumdan çok daha farklı olduğu sonucuna varmışlardır.

Alibert vd. (1994) yaptıkları çalışmada; Danimarka'daki ev faresinin iki Avrupa alt türü (*M. m. domesticus* ve *M. m. musculus*) arasındaki hibrit bölge boyunca yayılışlarındaki asimetriyi karşılaştırmışlardır. Karışık genomlu popülasyonlarda ilk kez, herhangi bir doğal hibrit bölgede artış gösteren gelişimsel bir istikrar gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, *M. musculus*'un hibrit bölgesinde meydana gelen gen akışının önündeki engelin, gen sistemlerinin çok azının dahi bozulmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Boursot vd. (1996), nükleer genlerdeki alel frekansı farklılaşma modellerine bakarak, Kuzey Hindistan'da yaşayan *M. musculus*'un birkaç farklı doğrultuda yayıldıktan sonra bu bölgede alttürler (*M. m. castaneus*, *M. m. domesticus* ve *M. m. musculus*) meydana getirdiğini öne sürmüşlerdir. Bu hipotezi test etmek ve bu farklılaşmaya eşlik eden tarihsel ve demografik olayları analiz etmek için mitokondriyal DNA RFLP yöntemi kullanarak filogenisini ortaya koymuşlardır. Hindistan ve Orta Doğu'dan örneklerin polimorfizminin yanı sıra Avrasya ve Kuzey Afrika'nın geri kalanından örnekler de çalışmışlardır. *M. m. domesticus*'un ve *M. m. musculus*'un, mtDNA'sının monofiletik olduğunu ve daha önce tanımlanan alttürlerle özgülü mtDNA soy hattında yer aldığını belirtmişlerdir. Sonuçlara göre, bu iki soy hattının daha önce tanımlanmamış kollardan oluşan, Kuzey Hindistan'daki ve İran'dan gelen tüm bireyleri içeren, filogenetik ağacın dallarından bir parça olduğu tespit edilmiştir.

Prager vd. (1996) türle ilgili yaptıkları çalışmada mtDNA'nın kontrol bölgesi (*d-loop*) ve flanking tRNA'yı kullanmışlardır. Almanya'dan Japonya'ya kadar 44 bölgeden topladıkları 139 *M. musculus* örneği elde ederek mitokondriyal DNA'dan dizileme işlemi gerçekleştirmişlerdir. Analiz edilen 36 *M. musculus* örneği arasından beşinin mtDNA'da 75-baz çiftlik doğrudan bir tekrarı olduğu 90 *M. domesticus* örneğinin mtDNA arasında 12 yeni tip bulunmuştur. Ayrıca, *M. castaneus*, *M. macedonicus*, *M. spicilegus* ve *M. spretus*'un mtDNA gen bölgelerini de dizilemişlerdir. *D-loop* verilerine göre, *M. musculus*'un ve *M. castaneus*'un birleşerek oluşturduğu soy hattının, *M. domesticus*'un soy hattı ile olan bağlarının yarısı kadar geçmişe sahip olduğunu belirtmişlerdir. *M. macedonicus* ve *M. spicilegus*'un ise, geçmişte birbirlerinin en yakın akrabaları olduğunu ve bu *d-loop* sonuçları da *M. spretus*'un diğer beş türün kardeş grubu olduğu görüşünü desteklemektedir.

Prager vd. (1998)'nin yaptıkları bir başka çalışmada ise, Mısır'dan, Türkiye, Yemen, İran, Afganistan, Pakistan ve Nepal'e, oradan da Doğu Asya'ya kadar uzanan toplam 60 bölgeden toplanan 76 örnek üzerinde yine mtDNA kontrol bölgesi ve flanking tRNA kullanılarak çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada tespit edilen 54 tane yeni tipin de dahil olduğu 251 mtDNA tipi, ev farelerinin (*Mus musculus* grubu), dizileme işlemiyle tanımlanan dört ana türden (*M. domesticus*, *M. musculus*, *M. castaneus* ve *M. spretus*) meydana geldiğini göstermiştir. Analiz sonuçları ile, *M. domesticus* mtDNA'larının kardeş grup olarak diğer üç ortak mtDNA soy hattı ile beraber olduğunu ve Yemen'de bulunan soy hattının ise bunlar içerisinde bir sonraki en eski soy hattı olduğunu keşfetmişlerdir. Filogenik ve filocoğrafik yaklaşımlar kullanılarak, Batı-Orta Asya'da bulunan ev farelerinin ilk önce Güney Arap Yarımadası'na, oradan doğuya ve kuzeye, sonrasında Güneyorta Asya'ya, daha sonra da Güney orta Asya'dan kuzey orta Asya'ya ve Güneydoğu Asya'ya yayılışlarını göstermek için yeni bir model elde etmişlerdir. *Zfy-2* geninde 18 baz delesyonu olan ve olmayan Y kromozomlarına İran ve Afganistan'dan gelen örneklerde rastlanırken, delesyona uğramamış Y kromozomlarının sadece Türkiye, Yemen, Pakistan ve Nepal'de olduğunu

bulmuşlardır. *p53* için polimorfizm Gürcistan, İran, Türkmenistan, Afganistan ve Pakistan'da gözlenmiştir. 79 kommensal fareden 128 baz çiftlik bir *p53* dizilenmesi, 12 değişken bölgeyi ortaya çıkarmış ve 14 alel vermiştir.

Jones vd. (2011) Kuzey Fransa ve Britanya Adaları'ndaki ev farelerinin filocoğrafyasını mikrosatellit verileri, canlı yakalanan örnekler ve müze materyallerinden kontrol bölgesi dizileri kullanarak Avrupa çapında ele almışlardır. Kuzey Fransa'dan gelen mtDNA sekanslarının çoğunluğu, İngiltere'nin ana karası ve Almanya'da yaygın olarak bulunan bir klada yakın olup, bu dağılımın Demir Çağı'ndaki farelerin kolonizasyonunu temsil ettiği doğrultusundaki önermeyi savunmaktadır. Güneybatı İrlanda'da kladın varlığı, orada da Demir Çağı kolonizasyonunun mümkün olduğunu göstermiş ve bununla birlikte İrlanda ile alakalı sonuçların çoğunluğu, Norveç-Viking aktivitesi ile ilişkili başka bir bölgeye ait bulunmuş ve muhtemelen Viking döneminde İskoç adalarından gelen ve kentleşme ile bağlantılı olan İrlanda'nın ev faresi kolonizasyonunun ana hattını temsil ettiğini ortaya koymuşlardır. Mikrosatellit verileriyle gösterilen populasyonların dağılımı, muhtemelen ikincil kolonizasyonun genetik etkilerini yansıtan, coğrafi yakınlığa göre gruplanan populasyonlarla, mtDNA filogenisinden belirgin bir şekilde farklı olduğu tespit edilmiştir. MtDNA sekans verileri Avrupa çapında konumlandırıldığında, iki yaygın kladın İngiliz Adaları çevresinden dağılımının esasen Kuzey-Batı Avrupa ile sınırlı olduğu belirgin şekilde gözlenmiştir.

Türkiye'de ise Gündüz vd. (2000) üç bölgeden elde ettikleri 20 *Mus* örneği ve GenBank'tan aldıkları 7 adet İran örneğinin *D-loop* (kontrol bölgesi) dizileri ile çalışma yapmışlardır. Bu ülkelerin *Mus musculus domesticus* alt türünün kökenlerine yakın olduğu düşünülmektedir. Çalışma sonucunda 14 haplotip elde edilmiş ve bu haplotiplerden dördünün, Nachman vd. (1994) tarafından tanımlanan Batı Avrupa *M. m. domesticus*'una ait *D-loop* dizisiyle oldukça benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde ve İran'ın kuzeyinde farklı bir soy hattından Batı Avrupa'ya yayılmıştır. Ancak diğer Avrupa soy hatları Türkiye'de ya da İran'da bulunamamıştır. *Mus* cinsine ait diğer *D-loop* dizileri, *M. m. castaneus* ve *Mus macedonicus*'a ait iken, veriler *M. macedonicus*'u düşük nükleotit çeşitliliğine sahip monotipik bir tür olarak tanımlamıştır.

Gündüz vd. (2005), Türkiye'de 45 bölgeden topladıkları 92 fare üzerinde mitokondriyal kontrol bölgesini (*D-loop*) ve daha önce diğer ülkeler içerisinde üç bölgeden alınan altı farenin hazır dizilerini kullanarak çalışma yapmışlardır. Sonuçlar, Türkiye'de yaşayan *M. m. domesticus*'un asıl köken aldığı alana yakın olmasıyla tutarlı olduğu bulunmuştur. Belirlenen haplotipler arasından 54 Türkiye haplotipi, daha önce tanımlanmış hazır dizileri içeren filogenetik bir ağaç boyunca dağıtılmış ve ülkemiz farelerinde yüksek nükleotit çeşitliliği gözlemlenmiştir. Türkiye'de "Ana Türkiye Kladi"nın haplotiplerine Güney Anadolu'da rastlanmamıştır. Ancak, Ana Türkiye Kladi'nin haplotiplerinin Batı Avrupa'dakilere benzer

bulunması nedeniyle, ülkemizin, *M. m. domesticus*'un batıya doğru genişlemesi için ana yollarından biri olduğunu öne sürmüşlerdir.

Ev ve ev dışında yaşayan *Mus* cinsine ait türlerin yaşadığı Marmara ve Ege denizlerinde yer alan adalarda yapılan çalışmalar azdır.

Özkan (1999)'ın yaptığı çalışmada, Kuzey Ege Bölgesi'nde yer alan Gökçeada ve Bozcaada'ya 1990-1992 yıllarında toplam 449 adet kemirici örneği (*Sciurus anomalus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus hermonensis*, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Mus macedonicus*, *Mus domesticus*, *Spalax leucodon* türlerine ait) yakalanmıştır. Bu türlere ait ekolojik bilgileri değerlendirerek, her iki adada yaşayan kemirici türlerine ait örnekleri, Trakya ve Kuzeybatı Anadolu'dan daha önce elde edilmiş örnekler ile aynı yaş grupları arasında morfolojik olarak karşılaştırmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda Gökçeada'daki *Sciurus* örnekleri ile Bozcaada'daki *Apodemus* ve *Spalax* örneklerinin Kuzeybatı Anadolu örneklerine benzer olduğu, Gökçeada'da yaşayan *Apodemus* ve *Spalax* örneklerinin de Trakya örneklerine benzer olduğu bulunmuştur. Her iki adadaki *Rattus* ve *Mus* örneklerinin Kuzeybatı Anadolu ve Trakya örneklerine benzer olduğu tespit edilmiştir.

Şeker vd. (2017)'nin yaptıkları çalışmada ise, kemirici populasyonlarında gözlenen karyolojik değişimler belirlenmiştir. Ege Denizi'nde Gökçeada ve Bozcaada; Marmara Denizi'nde ise Marmara Adası olmak üzere üç adadan beş farklı kemirici türüne ait karyolojik bilgiler bu çalışma ile ortaya koyulmuştur. Ege Denizi ve Marmara Denizi'nin adalar ve ana kara arasında uzun süredir coğrafik bariyer olarak görev yapmasına rağmen, kemirici türlerinin ada ve ana kara populasyonlarının karyolojik değerleri arasında farklılığa etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Marmara Adası'ndan *A. flavicollis*, *R. rattus*, *M. domesticus* ve *M. macedonicus* türlerinin yayılış kayıtları ile beraber karyotipleri belirlenmiştir.

Cucchi vd. (2005) yaptıkları çalışmada, zooarkeolojik kriterlerle ev faresinin varlığını doğrulamak için, Akdeniz bölgesindeki geç buzul çağından, milattan sonraki ilk çağlara kadar uzanan fosil küçük memeli populasyonlarını analiz etmişlerdir. Sonuçlar kronolojik aşamaları, sosyoekonomik ve kültürel insan evrimi ile ilgili olan bir tarihsel harita aracılığıyla gösterilmiştir. Akdeniz'deki ev faresinin (*M. m. domesticus*) yayılmasının, Doğu Akdeniz havzasında yaklaşık M.Ö 8000'de gerçekleşerek, hızlı ancak sınırlı bir yayılma ile başladığını, M.Ö 1000 yılına kadar ulaşım imkanlarının artmasına rağmen, bölgedeki işgallerinin durmuş ya da büyük ölçüde yavaşlamış görüldüğünü öne sürmüşlerdir. M.Ö 1000 yıl boyunca, tüm Batı Akdeniz Havzası ve Kuzey Avrupa ev faresi tarafından istilaya uğramış ve tür bu coğrafyada kolonileşmeye başlamıştır. Batı coğrafyasının M.Ö ilk bin yıla kadar alçaldığını düşünerek, Doğu ve Batı Akdeniz kolonileşmesindeki bu kronolojik boşluğu kapatmaya çalışmışlardır. Batı

Akdeniz'in tamamen Doğu Akdeniz'in etkileri ile göçe açıldığını ve çevre üzerindeki insan baskısının büyük ölçüde arttığını, ev faresinin ilerleyen dönemlerde insan yanında kalarak kommensal nişlerine yol açtığını ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada *Mus* cinsine ait iki tür (*M. domesticus* ve *M. macedonicus*) için Balkanlar'a muhtemel geçiş yolu olan Kuzey Anadolu ve Marmara Bölgeleri seçilmiştir. Bu bölgelerde yayılış gösteren iki türün populasyonları mitokondriyal DNA *COI* ve nükleer DNA *APOB* gen bölgeleri analiz edilerek farklı populasyonlar arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymak, İstanbul ve Çanakkale boğazlarının populasyonlar arasındaki gen akışını üzerindeki etkisini belirlemek, iki türün populasyonları üzerinde adaların etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca coğrafi değişimlere sebep olan jeolojik, tektonik olaylar ve iklim değişikliklerinin cinsin filocoğrafyasının şekillenmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

III. Materyal ve Yöntem

Materyal ve Yöntem: Bu proje çalışması için daha önceki projelerde (BAP proje no: 20050705104) yapılan arazi çalışmalarında toplanan *Mus* örnekleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Halihazırdaki dokular (karaciğer, kalp, böbrek, kas, akciğer) gerekli koşullarda (-86 °C'de) saklanmakta olup, çalışmalarda problem yaşadığımız durumlarda, benzer bölgeden dokular çalışmaya dahil edilmiştir. Bu proje çalışması süresince gerçekleştirilen moleküler analizler, dokulardan DNA izolasyonu, izole edilen DNA'dan hedef gen bölgelerinin (*APOB* ve *COI*) uygun primerlerin kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile çoğaltılarak, sonra çoğaltılan ilgili gen bölgeleri için hizmet alımı yoluyla dizi verileri alınarak ve biyoistatistik uygulamalarda analiz edilerek gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Projede kullanılan *Mus* örneklerine ait tür, müze no ve lokasyon bilgileri

Sıra No	Örnek No	Tür	Lokasyon
1	3484	<i>Mus domesticus</i>	Ardahan - Posof
2	4772	<i>Mus macedonicus</i>	Amasya - Suluova
3	3438	<i>Mus macedonicus</i>	Çorum
4	3444	<i>Mus macedonicus</i>	Çorum
5	3441	<i>Mus macedonicus</i>	Çorum
6	3429	<i>Mus macedonicus</i>	Ordu - Efirli
7	3470	<i>Mus macedonicus</i>	Ordu - Efirli
8	3781	<i>Mus domesticus</i>	Ordu - Fatsa
9	3782	<i>Mus domesticus</i>	Ordu - Fatsa
10	3784	<i>Mus domesticus</i>	Ordu - Fatsa
11	3853	<i>Mus domesticus</i>	Ordu - Fatsa
12	2804	<i>Mus macedonicus</i>	Samsun - Kurupelit
13	2805	<i>Mus macedonicus</i>	Samsun - Kurupelit

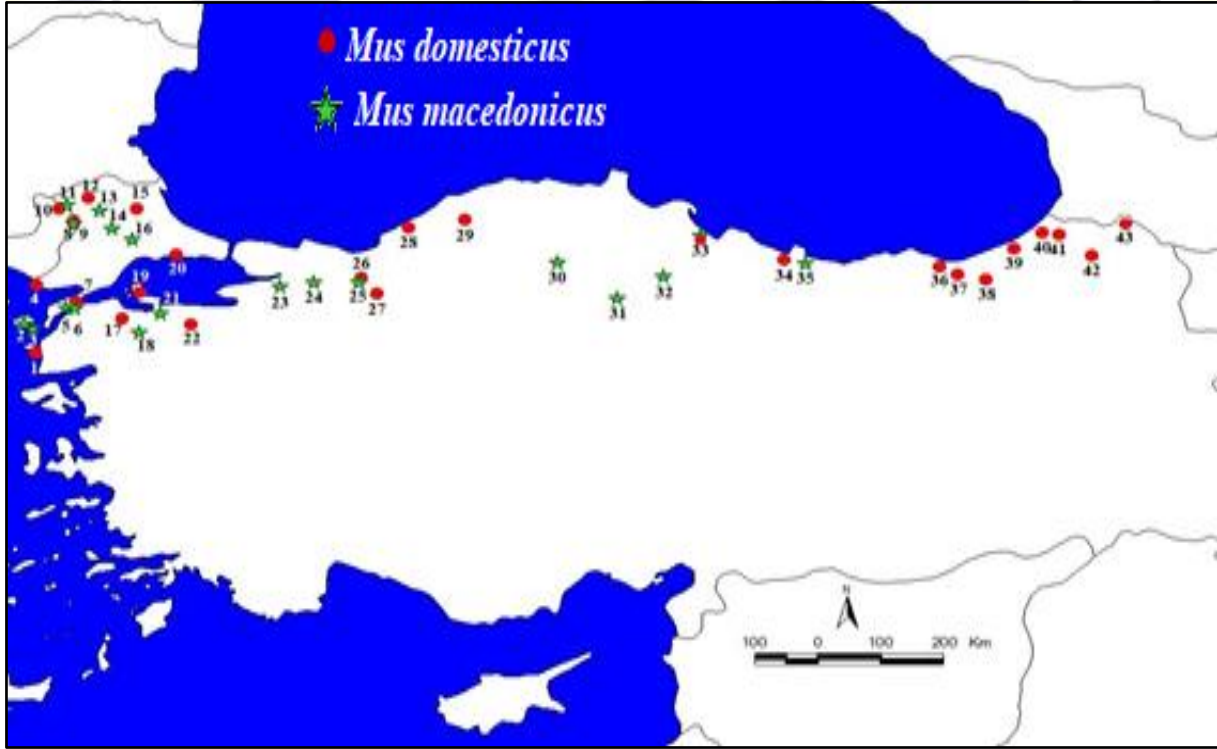
EK-11 Sonuç Raporu Formatı

14	2806	<i>Mus macedonicus</i>	Samsun - Kurupelit
15	2812	<i>Mus macedonicus</i>	Samsun - Kurupelit
16	2881	<i>Mus domesticus</i>	Samsun - Kurupelit
17	3376	<i>Mus domesticus</i>	Artvin - Ardanuç
18	3767	<i>Mus domesticus</i>	Artvin - Borçka
19	3768	<i>Mus domesticus</i>	Artvin - Borçka
20	3823	<i>Mus domesticus</i>	Artvin - Borçka
21	3803	<i>Mus domesticus</i>	Artvin - Hopa
22	3804	<i>Mus domesticus</i>	Artvin - Hopa
23	3772	<i>Mus domesticus</i>	Rize - İkizdere
24	3819	<i>Mus domesticus</i>	Rize - İkizdere
25	3793	<i>Mus domesticus</i>	Rize - Ardeşen
26	3794	<i>Mus domesticus</i>	Rize - Ardeşen
27	3836	<i>Mus domesticus</i>	Trabzon - Sürmene
28	3837	<i>Mus domesticus</i>	Trabzon - Sürmene
29	3859	<i>Mus domesticus</i>	Trabzon - Yomra
30	3860	<i>Mus domesticus</i>	Trabzon - Yomra
31	4091	<i>Mus domesticus</i>	Bartın - Ulus
32	4092	<i>Mus domesticus</i>	Bartın - Ulus
33	3939	<i>Mus domesticus</i>	Bolu - Abant
34	4224	<i>Mus macedonicus</i>	Düzce - Hacıyakup
35	4225	<i>Mus macedonicus</i>	Düzce - Hacıyakup
36	3940	<i>Mus domesticus</i>	Düzce - Köprübaşı
37	3949	<i>Mus domesticus</i>	Düzce - Köprübaşı
38	5627	<i>Mus macedonicus</i>	Kastamonu - Tosya
39	3894	<i>Mus domesticus</i>	Zonguldak - Bülent Ecevit Üni.
40	3896	<i>Mus domesticus</i>	Zonguldak - Bülent Ecevit Üni.
41	7005	<i>Mus macedonicus</i>	Çanakkale - Fındıklı
42	7006	<i>Mus macedonicus</i>	Çanakkale - Fındıklı
43	6890	<i>Mus domesticus</i>	Çanakkale - Gelibolu
44	6891	<i>Mus domesticus</i>	Çanakkale - Gelibolu
45	6921	<i>Mus macedonicus</i>	Çanakkale - Güneyli
46	6922	<i>Mus macedonicus</i>	Çanakkale - Güneyli
47	7001	<i>Mus macedonicus</i>	Çanakkale - Sinekçi - Biga
48	5465	<i>Mus macedonicus</i>	Edirne - Değirmenyanı Köyü
49	7124	<i>Mus domesticus</i>	Edirne - Enez
50	7118	<i>Mus macedonicus</i>	Edirne - Orhaniye - Bağlık
51	6800	<i>Mus domesticus</i>	Edirne - Sazlıdere Köyü
52	4366	<i>Mus domesticus</i>	Edirne - Tatarlar Köyü
53	6803	<i>Mus domesticus</i>	Edirne - Üyükütatar Köyü
54	6805	<i>Mus domesticus</i>	Edirne - Üyükütatar Köyü
55	6795	<i>Mus domesticus</i>	Edirne - Yenikadın Köyü
56	6978	<i>Mus domesticus</i>	İstanbul - Alipaşa Köyü - Silivri
57	6991	<i>Mus domesticus</i>	İstanbul - Alipaşa Köyü - Silivri
58	6467	<i>Mus macedonicus</i>	Kırklareli - İnce
59	5457	<i>Mus macedonicus</i>	Kırklareli- Lüleburgaz - Büyükkarıştıran
60	6753	<i>Mus macedonicus</i>	Kırklareli - Lüleburgaz - Kırıkköy
61	6762	<i>Mus macedonicus</i>	Kırklareli - Lüleburgaz - Kırıkköy
62	4365	<i>Mus domesticus</i>	Kırklareli - Pınarhisar - Evciler
63	4360	<i>Mus macedonicus</i>	Kırklareli - Pınarhisar - İslambeyli
64	6806	<i>Mus domesticus</i>	Marmara Adası - Topağaç Köyü
65	6807	<i>Mus domesticus</i>	Marmara Adası - Topağaç Köyü
66	6817	<i>Mus domesticus</i>	Marmara Adası - Topağaç Köyü
67	6818	<i>Mus domesticus</i>	Marmara Adası - Topağaç Köyü

Çizelge 3.1 Projede kullanılan *Mus* örneklerine ait tür, müze no ve lokasyon bilgileri
(devamı)

68	6833	<i>Mus domesticus</i>	Bozcaada
69	6835	<i>Mus domesticus</i>	Bozcaada
70	6840	<i>Mus domesticus</i>	Bozcaada
71	6844	<i>Mus domesticus</i>	Bozcaada
72	6877	<i>Mus macedonicus</i>	Gökçeada - Bademli
73	6878	<i>Mus macedonicus</i>	Gökçeada - Bademli
74	6869	<i>Mus macedonicus</i>	Gökçeada - Uğurlu
75	6870	<i>Mus macedonicus</i>	Gökçeada - Uğurlu
76	6863	<i>Mus macedonicus</i>	Gökçeada - Uğurlu
77	6852	<i>Mus macedonicus</i>	Balıkesir - Bandırma
78	6857	<i>Mus macedonicus</i>	Balıkesir - Bandırma
79	2958	<i>Mus macedonicus</i>	Balıkesir - Gönen
80	6997	<i>Mus domesticus</i>	Bursa - Ulubat
81	6999	<i>Mus domesticus</i>	Bursa - Ulubat
82	3205	<i>Mus macedonicus</i>	Kocaeli - Gölcük
83	6544	<i>Mus macedonicus</i>	Kocaeli - Maşukiye

Kullanılan tüm örneklerin konumları harita oluşturularak, üzerinde gösterildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Mus* örneklerinin Türkiye haritası üzerindeki dağılımı

Haritadaki lokasyonlar şu şekildedir; 1) Bozcaada 2) Gökçeada – Uğurlu 3) Gökçeada – Bademli 4) Edirne – Enez 5) Çanakkale – Fındıklı 6) Çanakkale – Gelibolu 7) Çanakkale – Güneyli 8) Edirne – Orhaniye 9) Edirne – Üyüklütatar 10) Edirne – Yenikadın 11) Edirne – Değirmenyeni 12) Edirne – Tatarlar 13) Kırklareli – İnece 14) Kırklareli – Kırıkköy 15) Kırklareli - İslambeyli 16) Kırklareli – Büyükkarıştıran 17) Çanakkale - Sinekçi 18) Balıkesir – Gönen 19) Marmara Adası 20) Balıkesir – Bandırma 21) İstanbul – Silivri 22) Bursa – Ulubat 23) Kocaeli – Gölcük 24) Kocaeli – Maşukiye 25) Düzce – Hacıyakup 26) Düzce – Köprübaşı 27) Bolu - Abant 28) Zonguldak – Üniversite 29) Bartın – Ulus 30) Kastamonu – Tosya 31) Çorum 32) Amasya – Suluova 33) Samsun – Kurupelit 34) Ordu – Fatsa 35) Ordu – Efirli 36) Trabzon – Yomra 37) Trabzon – Sürmene 38) Rize – İkizdere 39) Rize – Ardeşen 40) Artvin – Hopa 41) Artvin – Borçka 42) Artvin – Ardanuç 43) Ardahan - Posof

Örneklemden ayrı olarak, dış grup oluşturmada yakın grupların GenBank dizileri kullanıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Projede kullanılan dış grup örneklerinin bilgileri

Gen Bölgesi	GenBank Erişim No	Tür İsmi
<i>APOB</i>	MF947503.1	<i>Mus spretus</i>
<i>APOB</i>	AB285437.1	<i>Mus macedonicus</i>
<i>APOB</i>	NM019287.2	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>COI</i>	GQ905754.1	<i>Mus musculus domesticus</i>
<i>COI</i>	KY018921.1:5329-6873	<i>Mus spretus</i>
<i>COI</i>	AB451019.1	<i>Rattus norvegicus</i>

3.1 DNA İzolasyonu

Bu çalışmada *Mus* örneklerinden elde edilen dokulardan Doyle (1991)'un CTAB-DNA izolasyonu protokolü ile DNA izole edilmiştir. Bu izolasyon yöntemi aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır;

Örneklere ait dokular 2-3 g ağırlığında küçük parçalar alınarak buz kalıplar içerisinde bekletilen ependorf tüplere konuldu. Üzerlerine 100 µl CTAB lizis tamponu ilave edildi.

Homojenizasyon çubukları yardımıyla mekanik parçalama gerçekleştirildi. Dokular biraz ezildikten sonra her tüpe 200 µl CTAB lizis tamponu daha ilave edilerek dokular iyice ezilerek, homojen sıvı elde edildi.

Elde edilen bu homojenata sırasıyla 300 µl CTAB ve 50 µl BME (2-beta-merkaptoetanol) eklendi ve iyice karıştırıldı.

Karışım 65 °C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında tüplere 500 µl C: IAA (Kloroform-izoamilalkol) ilave edilir ve tüplerin içeriği süt kıvamına gelinceye kadar iyice karıştırıldı. Daha sonra tüpler 13000 rpm'de +4 °C'de 15 dk. santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra ependorf tüpler içerisinde iki faz gözlemlendi. Bu gözlenen fazları karıştırmadan, tüpler hassas bir şekilde buz içerisinde yerleştirildi. DNA'yı içeren sulu üst faz, DNA moleküllerinin kırılmasını önlemek için 1000 µl'lik geniş uçlu pipetle önceden numaralandırılmış yeni ependorf tüplere alındı.

DNA'yı içeren bu ependorf tüpleri içerisinde DNA'yı çöktürmek için -20 °C'de soğutulmuş 500 µl izopropanol eklendi ve tüpler iyice karıştırıldı. Bu karıştırma sırasında tüpler içerisinde bulut şeklinde nükleik asit ipliği gözlemlendi.

Sonra tüpler -80 °C'de 30 dk. inkübe edilir. Donmuş haldeki tüpleri eritmeden +4 °C'de 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Sonunda ise tüplerin dibinde DNA moleküllerinin çöktüğü gözlemlendi.

Bu tüplerin dibine yapışmış olan DNA moleküllerinin düşmesine izin vermeden tüpler içerisindeki süpernatant döküldü.

Süpernatantı dökülen DNA pelletlerini (Şekil 3.2) çöktürmek için -20 °C'de bekletilen %70'lik ve %100'lük etanol ile sırasıyla ikişer üçer kere yıkama işlemi dikkatlice gerçekleştirildi. Bu işlem pelletleri düşürmemek için dikkatlice yapıldı.

Yıkama işlemlerinden sonra DNA pelletlerini içeren tüpler kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilerek 60 dakika kadar kurumaya bırakıldı.

Kurutma işlemi sonrasında tüpler içerisine 100 µl Tris-EDTA tamponu ilave edilerek DNA pelletleri çözdürüldü.

Çözdürülen DNA pelletlerini RNA'dan arındırmak için her bir tüpe 2 µl RNase (10 mg/ml) ilave edildikten sonra, 30 dakika, 37 °C'deki etüvde inkübasyona bırakıldı.

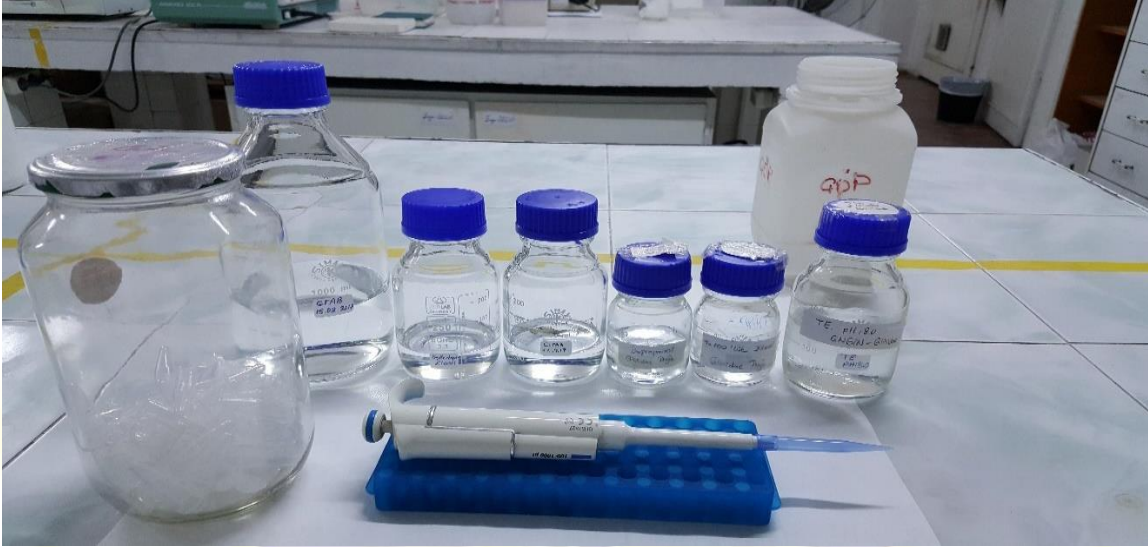
DNA barındıran ependorf tüpleri (Şekil 3.3), çalışılmak üzere -20°C 'de saklandı.

İzolasyonda kullanılan kimyasallar (Şekil 3.4) ve hazırlanışları aşağıdaki gibidir;



Şekil 3.2 Görülebilir iplik halinde DNA

Şekil 3.3 Ependorflardaki izole DNA'lar



Şekil 3.4 CTAB DNA izolasyonu yönteminde kullanılan kimyasallar

CTAB Tamponu Hazırlanması (100 ml için)

CTAB : 2 gr

Tris-HCl : 1 M 10 ml pH: 8.0

EDTA : 0.5 M 4 ml pH: 8.0

NaCl : 5 M 28 ml

dH_2O ile 100 ml'ye tamamlanır. CTAB'ın çözülmesi için gerekirse sıcaklık uygulanabilir.

Tris Base (1M) pH: 8.0 (MW: 121.1)

12.11 g Tris Base dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

EDTA (0.5M) pH: 8.0 (MW: 372.2 gr)

18.61 g EDTA dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

NaCl (5M) (MW: 58.44 gr)

29.22 g NaCl dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

RNase A (10mg/ml, Fermentas) : 2 µl

TE Tamponu pH: 8.0

Tris Base çözeltisi (1M) : 1 ml

EDTA : 20 µl

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

BME STOK (β- Merkaptoethanol) (MW: 78.13 gr) (250 ml)

1000 ml 78.13 g 1 ml 1.14 g

250 ml X X 19.45 g

X= 19.45 g

X= 17.5 ml

17.5 ml BME, 232.5 ml dH₂O ile 250 ml'ye tamamlanır.

İzolasyon sonrasında, *Mus* örneklerinin DNA'larının, NanoDrop 2000 spektrofotometre cihazı aracılığıyla konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Kullanılan *Mus* örneklerinin DNA miktar ve saflık ölçümleri

#	Örnek No	Nükleik Asit Konsantrasyonu	Birim	260/280	260/230	Örnek Tipi
1	3484	1764	ng/μl	1,86	1,99	DNA
2	4772	1878,4	ng/μl	1,89	1,93	DNA
3	3438	2863,5	ng/μl	1,84	1,96	DNA
4	3444	2460,7	ng/μl	1,85	1,97	DNA
5	3441	4729,1	ng/μl	1,86	2,04	DNA
6	3429	4392,1	ng/μl	1,88	2	DNA
7	3470	1502,4	ng/μl	1,86	1,92	DNA
8	3781	4977,1	ng/μl	1,86	1,94	DNA
9	3782	3070,7	ng/μl	1,84	1,93	DNA
10	3784	499,8	ng/μl	1,86	1,56	DNA
11	3853	4528	ng/μl	1,85	2,03	DNA
12	2804	4566,9	ng/μl	1,9	1,99	DNA
13	2805	2094,5	ng/μl	1,88	2,02	DNA
14	2806	6007,4	ng/μl	1,86	2,01	DNA
15	2812	4224,6	ng/μl	1,88	2,07	DNA
16	2881	3785	ng/μl	1,88	2,04	DNA
17	3376	3661,9	ng/μl	1,89	2,08	DNA
18	3767	2271,5	ng/μl	1,87	2,01	DNA
19	3768	2123,2	ng/μl	1,86	2,02	DNA
20	3823	3219,4	ng/μl	1,82	1,93	DNA
21	3803	2197,9	ng/μl	1,84	1,93	DNA
22	3804	2204,6	ng/μl	1,84	1,92	DNA
23	3793	2504,3	ng/μl	1,87	1,99	DNA
24	3794	3290,1	ng/μl	1,86	1,99	DNA
25	3836	2166,1	ng/μl	1,89	1,97	DNA
26	3837	2425,4	ng/μl	1,89	2,01	DNA
27	3859	2215,5	ng/μl	1,51	1,56	DNA
28	3860	3034,7	ng/μl	1,87	1,97	DNA
29	4091	1375	ng/μl	1,87	2,01	DNA
30	4092	1255,5	ng/μl	1,88	1,81	DNA

EK-11 Sonuç Raporu Formatı

Çizelge 3.3 Kullanılan *Mus* örneklerinin DNA miktar ve saflık ölçümleri (devamı)

31	3939	2276,4	ng/μl	1,88	2,05	DNA
32	4224	798,2	ng/μl	1,87	1,83	DNA
33	4225	368,5	ng/μl	1,88	1,42	DNA
34	3940	1311,2	ng/μl	1,87	1,9	DNA
35	3949	1340,7	ng/μl	1,9	1,98	DNA
36	5627	1754,4	ng/μl	1,9	2,01	DNA
37	3894	1139,5	ng/μl	1,87	1,95	DNA
38	3896	1733,7	ng/μl	1,9	1,99	DNA
39	7005	1587,4	ng/μl	1,91	1,97	DNA
40	7006	1590,8	ng/μl	1,91	1,99	DNA
41	6890	1132,2	ng/μl	1,87	1,86	DNA
42	6891	2806,8	ng/μl	1,88	1,92	DNA
43	6921	1427,3	ng/μl	1,91	1,96	DNA
44	6922	1139,9	ng/μl	1,89	1,95	DNA
45	7001	734,3	ng/μl	1,87	1,88	DNA
46	7002	1576,3	ng/μl	1,88	1,95	DNA
47	5465	2053,7	ng/μl	1,91	2,07	DNA
48	7124	1965,1	ng/μl	1,93	2	DNA
49	7118	1135,1	ng/μl	1,91	2,02	DNA
50	6800	1567,1	ng/μl	1,92	2,07	DNA
51	4366	1508,5	ng/μl	1,92	1,89	DNA
52	6803	2603,2	ng/μl	1,91	1,97	DNA
53	6805	1328,4	ng/μl	1,91	2,02	DNA
54	6795	1923,8	ng/μl	1,89	1,99	DNA
55	6798	1702	ng/μl	1,91	2,06	DNA
56	6991	1580	ng/μl	1,91	1,97	DNA
57	6467	2358,2	ng/μl	1,89	1,8	DNA
58	5457	2755,3	ng/μl	1,88	1,94	DNA
59	6753	3054,4	ng/μl	1,87	1,93	DNA
60	6762	3027	ng/μl	1,9	1,89	DNA
61	4365	2720,5	ng/μl	1,88	1,91	DNA
62	4360	2124,5	ng/μl	1,88	1,85	DNA

Çizelge 3.3 Kullanılan *Mus* örneklerinin DNA miktar ve saflık ölçümleri (devamı)

63	6806	2157	ng/μl	1,91	2,04	DNA
64	6807	2980,2	ng/μl	1,88	1,81	DNA
65	6817	2725,2	ng/μl	1,87	1,92	DNA
66	6818	2240,6	ng/μl	1,91	2,03	DNA
67	6833	2277	ng/μl	1,9	2,02	DNA
68	6835	2112,6	ng/μl	1,9	1,99	DNA
69	6840	2070,3	ng/μl	1,88	1,86	DNA
70	6844	3648,4	ng/μl	1,91	2,01	DNA
71	6877	1790,8	ng/μl	1,9	1,99	DNA
72	6878	1469,8	ng/μl	1,91	1,93	DNA
73	6869	1536,9	ng/μl	1,94	2,14	DNA
74	6870	2557,3	ng/μl	1,88	1,94	DNA
75	6863	1776,9	ng/μl	1,9	2	DNA
76	6852	844,8	ng/μl	1,9	1,96	DNA
77	6857	682,1	ng/μl	1,84	1,79	DNA
78	2958	1420,3	ng/μl	1,91	2,01	DNA
79	6997	1427,5	ng/μl	1,9	1,97	DNA
80	6999	1540	ng/μl	1,9	2	DNA
81	3205	2581,8	ng/μl	1,88	1,85	DNA
82	6544	1118,3	ng/μl	1,91	1,95	DNA

3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA izolasyonundan sonra mtDNA'nın *COI* (Sitokrom oksidaz alt ünite 1) ve nDNA'nın *APOB* (Apolipoprotein B) olmak üzere iki gen bölgesi uygun primerlerin kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılmıştır. PZR ile, saflaştırılmış olan DNA molekülünün seçilen bir bölgesinin hücre dışı koşullarda çoğaltılması sağlanır. PZR işleminde, distile su (dH₂O), özgün oligonükleotidler (primerler), deoksिनükleotid trifosfatlar (dNTP), *Taq* DNA polimeraz enzimi, MgCl₂, tampon çözelti (Tris-HCl) ve çalışılacak örneğin kalıp DNA'sı gibi bileşenler kullanılır. Denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere 3 basamaktan oluşan bir döngüsel reaksiyonun 25-40 defa tekrar etmesi ile kalıp DNA dizisinden milyonlarca yeni kopya meydana gelir.

İlk basamak olan denatürasyon aşamasında DNA molekülünün iki ipliğini bir arada tutan hidrojen bağları kırılır. Bu olay sıcaklık 92-95 °C'ye yükseltip 1-2 dakika tutularak gerçekleşir. Eğer gerekli görülürse 5-10 dakikalık bir ön denatürasyon aşaması uygulanabilir. Bağlanma aşamasında ise, primerlerin bağlanması için uygun sıcaklık olan 37-56 °C'ye kadar azaltılır ve primerlerin denatüre olmuş DNA ipliklerine bağlanması sağlanır. Uzama aşamasında sıcaklık *Taq* polimeraz enziminin çalışması için en uygun sıcaklığa 72 °C'ye yükselttilerek ortamda serbest halde bulunan deoksिनükleotid trifosfatların kalıp DNA ipliklerine bağlanması sağlanır ve bu döngü 25-30 kez tekrarlanır. Ayrıca, daha fazla DNA kopyası elde edebilmek için döngü süreci bitince yine uzama ile aynı sıcaklıkta son uzama gerçekleştirilebilir.

Sonuçta istenilen başlangıç DNA molekülünün çok sayıda kopyası elde edilmiş olur. Bu aşamalardaki sıcaklık değerleri, kullanılan primer ve malzemelere bağlı olarak optimize edilebilir.

3.2.1 PZR bileşenleri

PZR işleminde karışım ortamını oluşturmak için distile su kullanılmıştır. MgCl₂ ise denatürasyon aşamasında açılan zinciri primerlerle doldurmada, PZR ile elde edilen DNA'nın spesifikliğini, primer ile dimerleşmeyi, enzimin aktifliğini etkilemektedir. MgCl₂ derişiminin az olduğu PZR karışımında, *Taq* DNA Polimeraz'dan alınan verimi düşürebilirken, yüksek olduğu durumlarda ise spesifik olmayan bölgelerin çoğalmasına sebebiyet verebilir (Innis ve Gelfand 1990, Hadidi vd. 1995).

Tris-HCl / KCl tamponu, karışıma ilave edildiğinde, bağlanma işleminin daha rahat gerçekleştirilmesine olanak sağlayan kimyasal görevi görmektedir (Innis ve Gelfand 1990, Demeke ve Adams 1992, Henson ve French 1993).

Deoksिनükleotittrifosfat (dNTP) bileşenleri (Adenin, Guanin, Sitozin, Timin) ise, karışımında homojen miktarlarda dağılış gösterdiği durumlarda başarılı sonuçlar almak mümkün olabilmektedir. Bir PZR karışımında, yüksek dNTP derişimi, elde edilen PZR ürünlerdeki DNA dizilerinin istenmeyen bölgelerde çoğalmasına sebebiyet verebilmektedir. Bahsedilen durum itibariyle, mümkün olduğunca düşük derişime sahip dNTP karışımı kullanmak, PZR'nin özgüllüğü ile doğru bölge çoğaltılma hassasiyetini artırır. Primerler, çoğaltılacak bölgeye özgü sentezlenen veya var olan nükleotit dizilerinden oluşan kimyasal materyallerdir. Primerlerin, reaksiyona hazır olan DNA zincirlerine yapışması için ihtiyaç duyduğu sıcaklık ve zaman aralığı, primerlerin derişimi, elde edilmesi beklenen DNA'nın uzunluğu ve kullanılan bazların dizilimine göre farklılıklar gösterir. Primerlerin açılan DNA'ya bağlanma işlemi sırasında sıcaklığın artırılması DNA'nın seçiciliğini artırmaktadır. Böylece, primerlerin istenmeyen bölgelere bağlanması ve yanlış DNA dizilerinin elde edilmesinin önüne geçilmektedir. Sıcaklığın azaltılması,

primerlerin yanlış bölgeleri çoğaltmasına ve çoğaltılan DNA dizilerinde hatalı baz bağlanmalarının artmasına neden olmaktadır (Innis ve Gelfand 1990, Dieffenbach vd. 1993, Kwok vd. 1994).

Taq Polimeraz enzimi, jeotermal bölgelerde bulunan, termofil bir bakteri türü olan *Thermus aquaticus*'tan elde edilmiştir. Yüksek dereceli sıcaklıklarda dahi aktivitesini sürdürebilir yapıda bir enzim olması sebebiyle, PZR işlemlerinde farklı karışımlar halinde ya da saf halde bulunabilmektedir. PZR'de ihtiyaç duyulan enzim miktarı, örneklerden izole edilen kalıp DNA veya çoğaltılmak istenen bölge primerine göre farklılıklar gösterebilmektedir (Innis ve Gelfand 1990, Erlich vd. 1991, Yang vd. 1992).

Bu çalışmada sitokrom oksidaz alt ünite 1 ve apolipoprotein b bölgesini dizilemek için oluşturulan klasik PZR reaksiyonunda kullanılacak primerler Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan gen bölgesine ait primer listesi

<i>APOB</i> 187F	5' GTGCCAGGTTCAATCAGTATAAGT 3'	Amrine-Madsen vd. 2003
<i>APOB</i> J1R	5' CCAGCAAAATTTTCTTTTACTTCAA 3'	Jiang vd. 1998
<i>COI</i> LCO1490	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'	Vrijenhoek 1994
<i>COI</i> HCO2198	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3'	Vrijenhoek 1994

3.2.2 Klasik PZR Uygulaması

Örneklerden izole edilen DNA'nın çoğaltılarak, sekans cihazları tarafından dizileme yapılmasıyla, örneğin veri setinin elde edilmesi için kullanılan yöntemlerden biridir.

İlk olarak, kalıp DNA içeren -20°C'lik dolapta bekleyen örnekler çözülmesi için ependorf raklarına alınarak laminar flow kabine koyulur. Daha sonra PZR bileşenleri olan, dH₂O (Distile su), MgCl₂, *Taq* tampon çözeltisi, dNTP, primerler (ileri ve geri), *Taq* polimeraz enzimi laminar flow kabine çözülmeye bırakılır. PZR tüpleri tek tek, kalıp DNA örneklerine ait olan numaralarla numaralandırılır.

PZR bileşenleri, gerekli hacimde bir karışım oluşturmak için sırayla mikropipet ile ependorf tüpüne boşaltılmış ve pipetaj yapılarak, homojen karışımları sağlanmıştır. Karışım hazırlandıktan sonra vortex cihazı vasıtasıyla bir süre hafifçe döndürülmüştür. Ependorf tüpteki karışım, eşit miktarda olacak şekilde

PZR tüplerine paylaştırılmıştır. Üzerinde, örneğe ait numarayı taşıyan PZR tüpleri karışım ile doldurulduktan sonra üzerilerine, numarada belirtilen örneğin kalıp DNA'sı ilave edilerek reaksiyon işlemi için hazır hale getirilmiştir.

Kimyasalları ve DNA materyalleri homojen karışan örnekler daha sonra termal döngü cihazının kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Bu yerleştirilme esnasında kapakların kapalı olduğundan emin olunmalıdır. PZR işlemi için termal döngü cihazına yerleştirilen örnekler (Şekil 3.5), döngüler için optimum olan koşullar (Çizelge 3.5) sayesinde çoğaltılmış ve elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.5 *COI* ve *APOB* gen bölgesi optimum koşulları

Aşamalar	<i>COI</i>	<i>APOB</i>
Ön Denatürasyon	95°C'de 5 dakika	94°C'de 3 dakika
Denatürasyon	95°C'de 1 dakika	94°C'de 30 saniye
Bağlanma	47°-51°C'de 1 dakika	45°C – 51°C'de 30 saniye
Uzama	72°C'de 1 dakika	72°C'de 30 saniye
Son Uzama	72°C'de 10 dakika	72°C'de 5 dakika



Şekil 3.5 PZR işlemi için termal döngü cihazına yerleştirilen örnekler

3.3 Agaroz Jel Elektrofrez ve Jel Görüntüleme

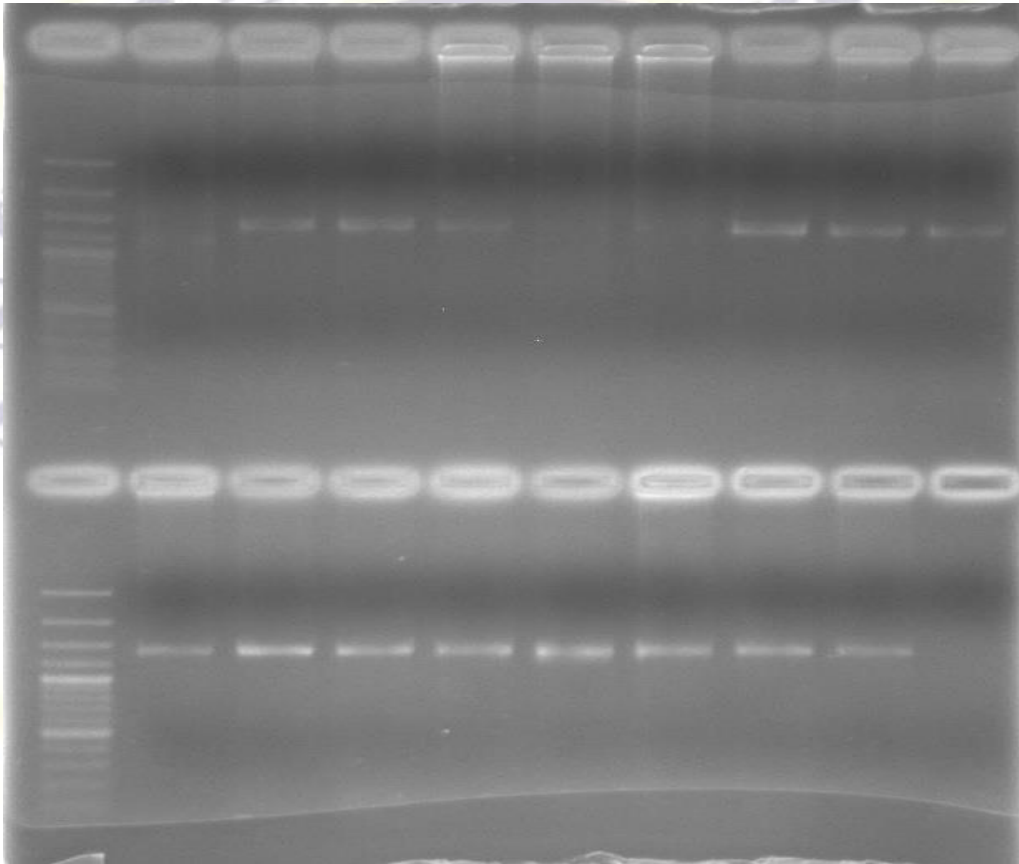
PZR uygulanarak çoğaltılması beklenen ürünlerin, çoğalıp çoğalmadığını test etmek amacıyla agaroz jelde elektriksel yük potansiyeline dayalı sistemde koşturulmasına jel elektrofrez denir. Daha sonra bu işlemde belli mesafe kat eden DNA'nın, kimyasal bir boya olan etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntülenmesi ile ne kadar mesafe kat ettiği ve ağırlığı tespit edilerek prosedür tamamlanır.

Agaroz jel %1'lik konsantrasyonda hazırlanmıştır. 150 ml TAE (Tris asetik asit EDTA) mezür ile ölçülüp erlene döküldükten sonra, 1.50 g agaroz hassas tartı ile tartılıp erlenin çeperlerine değmeyecek şekilde TAE'nin içerisine boşaltılır. Çözelti, içerisinde en ufak agaroz peltesi kalmaması ve berrak görüntüye kavuşması için mikrodalga fırın vasıtasıyla ısıtıldıktan sonra soğumaya bırakılır. Bu esnada elektrofrez tankı için gerekli hazırlıklar yapılmıştır. Sıcaklığı tenimizi yakmayacak bir kıvama gelen sıvı, katılaşmadan tankın kasetine dökülmüştür.

Memeli DNA'sı, bilindiği üzere negatif yüklü moleküler bir parçadır. Elektrofrez tankındaki jel, bu yapıya uygun olarak, kuyucukların negatif yönde olduğu şekilde konumlandırılmıştır. Yaptığımız jelde

bulunan kuyucuklara, PZR ürünleri yükleme boyası ile beraber yüklenir. Tankın iki ucunda bulunan anot ve katot uçlarına akümülatör vasıtasıyla elektrik akımı verilir. Elektrik akımına maruz kalan DNA, yükün negatif olduğu taraftan pozitif olduğu tarafa doğru ilerlemeye başlar. Bu hareket, jelin kıvamına ve DNA'nın ağırlığına bağlı olarak farklılık gösterebilir. 150 ml hacimli jelde yapılan çalışmalarda yaklaşık 90 dakikalık bir yürütme yapılmıştır.

Elektroforez işlemine tabi tutulan agaroz jel, içindeki DNA'ları UV altında görünebilir kılmak amacıyla etidyum bromür (EtBr) ile muamele edilmiştir. Belli bir süre bu kimyasala maruz bırakıldıktan sonra UV temelli görüntüleyiciler vasıtasıyla görüntülenmiştir (Şekil 3.6). Olumlu sonuç alınan örnekler dizileme hizmet alımı için -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.6 *APOB* gen bölgesine ait jel görüntülemesi

3.4 Dizileme ve Biyoistatistik Programlarının Kullanımı

DNA dizileme, DNA molekülünün istenilen bölgesinin nükleotid sırasının tam olarak belirlenmesidir. DNA dizilemek için yaklaşık olarak aynı zamanda piyasaya çıkan Maxam-Gilbert kimyasal yıkılım metodu ve Sanger-Coulsen zincir sonlandırma metodu olmak üzere iki teknik mevcuttur. Bu çalışmada

Mus sitokrom oksidaz alt ünite 1 (*COI*) ve Apolipoprotein b (*APOB*) bölgesinin dizisinin çıkarılması Sanger-Coulson tekniğini temel alan otomatik dizi cihazlarıyla hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan populasyonların genetik yapısına ilişkin tanıtıcı istatistikler, populasyonlar arası ve içi genetik farklılaşmanın derecesi ve filogenetik ağaç oluşturulması gibi moleküler seviyedeki analizlerin gerçekleştirilmesi için kullanılan yazılımlara ilaveten birçok değişik ücretli ya da ücretsiz biyoinformatik araç mevcuttur. Bu çalışmada DNA dizi analizi ile haplotipik lokuslardan elde edilecek moleküler düzeydeki verilerden filogenetik ilişkilerin çıkarsaması, en uygun metotların seçilerek evrimsel ilişki ağacının oluşturulabilmesi ve istatistik açıdan değerlendirmelerin yapılabilmesi için çoğunluğu internet üzerinden erişilebilen çeşitli ücretsiz biyoinformatik araçlar kullanılmıştır.

BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) protein ve nükleik asit dizilerini düzenlemek, hizalamak, manipüle ve analiz etmek için temel fonksiyonlara sahip ücretsiz bir yazılımdır. Bu çalışmada dizi analizi sonucunda ABI ya da Beckman Coulter gibi otomatik dizi analiz sistemlerinden (.scf uzantılı) kromatogram dosyası şeklinde elde edilen veriler, bu kromatogram dosyalarını görüntüleyebilen, bir biyolojik dizi hizalama editörü ve dizi analiz programı olan BioEdit kullanılarak analiz edilmiştir. Bu program ile her bir bireyin mitokondriyal DNA'sının sitokrom oksidaz alt ünite 1 ve nükleer DNA'sının apolipoprotein b bölgesine ait forward (ileri) ve reverse (geri) primerlerle elde edilen dizi analizi verileri hizalanmıştır (Şekil 3.7). Hem ileri hem de geri okumaya ait kromatogramlar göz ile kontrol edilerek o bireye ait ortak dizi oluşturulmuş, her bir birey için elde edilen ortak diziler programın içerdiği ClustalW modülü kullanılarak hizalanmıştır. Gerekli takdirde hizalanan dizilerin baş ve son kısımlarında aynı hizadaki baz ile başlaması ve aynı hizadaki baz ile bitmesi sağlanarak diziler eşit uzunluğa getirilmiş ve bu dizilerin diğer analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için pek çok analiz programının tanıdığı Fasta formatında düzenlenmiştir.

BioEdit ile oluşturulan veri seti bir başka ücretsiz yazılım olan MEGA 7 (Kumar vd. 2016) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı ile değerlendirilmiştir. Bu program moleküler evrimsel genetik analizleri gerçekleştirmek için kullanılmaktadır. MEGA, karşılaştırmalı dizi analizi için çeşitli istatistiksel ve matematiksel metotlar içermektedir ve koruma biyolojisi, sistematik, gelişimsel evrim ve populasyon genetiği gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bu program ile evrimsel mesafelerin, dizi istatistiklerinin hesaplanması ve genetik verilerden filogenetik ağaç çizilmesi gibi birçok analiz gerçekleştirilebilmektedir.

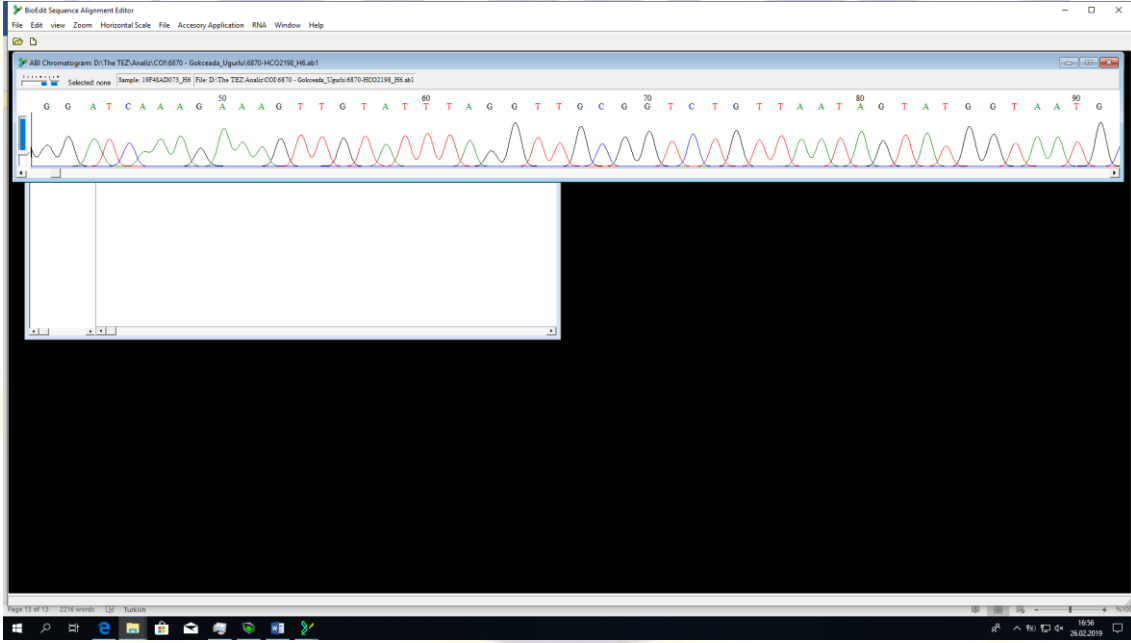
DnaSP v5 (Librado ve Rozas 2009) nükleotid dizi verilerinden, haplotip belirlemeyi, DNA polimorfizmini analiz eden, Fu ile Tajima testlerini içeren nötralite testlerini ve moleküler populasyon genetiği ile ilgili çok sayıda analiz gerçekleştirebilen bir yazılımdır. Bu yazılım vasıtasıyla tezde

kullanılan *Mus* bireylerinin haplotip sayısı, çeşitliliği, DNA polimorfizmi, evrimleri ve gelecekleri hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan nötralite testleri uygulanmıştır.

Network (Bandelt vd. 1999, Polzin ve Daneschmand, 2003) programı ile *Mus* cinsi içerisinde belirlenen haplotiplerin aralarındaki ilişki ağı oluşturuldu ve mutasyon noktaları belirlendi.

BEAST (Bayesian Evolution Analysis by Sampling Trees) (Suchard vd. 2018) programı ile, dış gruplar dahil olmak üzere, bireylerin budanmış “consensus” veri seti ile evrim analiz ağacı çizimi yapılarak, evrimsel ayrılma zamanları ortaya koyuldu.

Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier ve Lischer, 2010) programı ile projede çalışılan iki *Mus* türünün gen akışları, popülasyon durum değerlendirmesi için kullanılan AMOVA modülü ile fiksasyon indisleri hesaplanırken, ayrıca gen akışı ve farklılaşma istatistiklerini değerlendirmek amacıyla F_{ST} ve N_m değerleri hesaplandı ve bu iki değer kendi aralarında karşılaştırılarak yorumlandı.



Şekil 3.7 BioEdit programı ve içindeki ClustalW modülü kullanılarak yapılan analizler

IV. Analiz ve Bulgular

Bu çalışmada, çalışma alanından *Mus* cinsine ait *M. domesticus* ve *M. macedonicus*'a ait örnekler kullanıldı.

4.1 Mitokondriyal DNA Sitokrom Oksidaz Alt Ünite 1 (COI) Gen Bölgesi Verileri

COI gen bölgesi için, bu çalışmada Türkiye’den 43 farklı lokaliteden 73 *Mus* örneğinin yapılan PZR işlemleri ile DNA’ları çoğaltıldı. Bunlara ek olarak GenBank’tan alınan *Mus musculus domesticus*, *Mus spretus* ve *Rattus norvegicus* dizileriyle gerçekleştirilen budama işlemleri sonucunda 680 baz çifti uzunluğunda veri seti oluşturuldu. Verisetlerine uygulanan DnaSP haplotip testi sonucunda, *Mus* örnekleri kendi arasında 33, GenBank dizileri ile beraber toplamda 36 haplotip bulundu (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *Mus domesticus* ve *Mus macedonicus*’un COI gen bölgesi haplotipleri

Haplotip Sırası	Haplotip Sayısı	GenBank - Müze Numarası	Lokalite (Örnek Sayısı)	Tür İsmi
Hap_1	1	2804	Samsun - Kurupelit (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_2	1	2805	Samsun - Kurupelit (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_3	1	2806	Samsun - Kurupelit (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_4	1	2958	Balıkesir - Gönen (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_5	1	3205	Kocaeli - Gölcük (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_6	11	3376, 3767, 3768, 3803, 3804, 3823, 3859, 3860, 3896, 3939, 6833	Artvin - Ardanuç (1), Artvin - Borçka (3), Artvin - Hopa (2), Trabzon - Yomra (2), Zonguldak (1), Bolu - Abant (1), Bozcaada (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_7	2	3429, 3470	Ordu - Efirli (2)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_8	4	3438, 3444, 4225, 5627	Çorum (2), Düzce - Hacıyakup (2)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_9	1	3484	Ardahan - Posof (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_10	1	3772	Rize - İkizdere (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_11	3	3782, 6978, 6991	Ordu - Fatsa (1), İstanbul (2)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_12	1	3784	Ordu - Fatsa (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_13	4	3793, 3794, 3819, 3894	Rize - Ardeşen (2), Rize - İkizdere (1), Zonguldak (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_14	2	3836, 3837	Trabzon - Sürmene (2)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_15	2	3940, 3949	Düzce - Köprübaşı (2)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_16	2	4091, 4092	Bartın - Ulus (2)	<i>Mus domesticus</i>

EK-11 Sonuç Raporu Formatı

Hap_11	3	3782, 6978, 6991	Ordu - Fatsa (1), İstanbul (2)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_17	1	4224	Düzce - Hacıyakup (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_18	2	4360, 6803	Kırklareli - İslambeyli (1), Edirne - Üyüklütatar (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_19	11	4365, 6753, 6762, 6857, 6869, 6870, 6877, 6878, 6891, 7005, 7006	Kırklareli - Evciler (1), Kırklareli - Kırıkköy (2), Balıkesir - Bandırma (1), Gökçeada - Uğurlu (2), Gökçeada - Bademli (2), Çanakkale - Gelibolu (1), Çanakkale - Fındıklı (2)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_20	4	4366, 6795, 6800, 7124	Edirne - Tatarlar (1), Edirne - Yenikadın (1), Edirne - Sazlıdere (1), Edirne - Enez (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_21	1	4772	Amasya - Suluova (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_22	1	5457	Kırklareli - Büyükkarıştıran (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_23	2	5465, 6467	Edirne - Değirmenyanı (1), Kırklareli - İnece (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_24	1	6544	Kocaeli - Maşukiye (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_25	1	6806	Marmara Adası - Topağaç (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_26	1	6807	Marmara Adası - Topağaç (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_27	3	6835, 6840, 6844	Bozcaada (3)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_28	1	6863	Gökçeada - Uğurlu (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_29	1	6890	Çanakkale - Gelibolu (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_30	1	6921	Çanakkale - Güneyli (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_31	2	6997, 6999	Bursa - Ulubat (2)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_32	1	7001	Çanakkale - Biga (1)	<i>Mus domesticus</i>
Hap_33	1	7118	Edirne - Orhaniye (1)	<i>Mus macedonicus</i>
Hap_34	1	AB451019.1	Japonya (1)	<i>Rattus norvegicus</i>
Hap_35	1	KY018921.1:532 9-6873	Avustralya (1)	<i>Mus spretus</i>
Hap_36	1	GQ905754.1	Almanya - Sassenberg (1)	<i>Mus musculus domesticus</i>

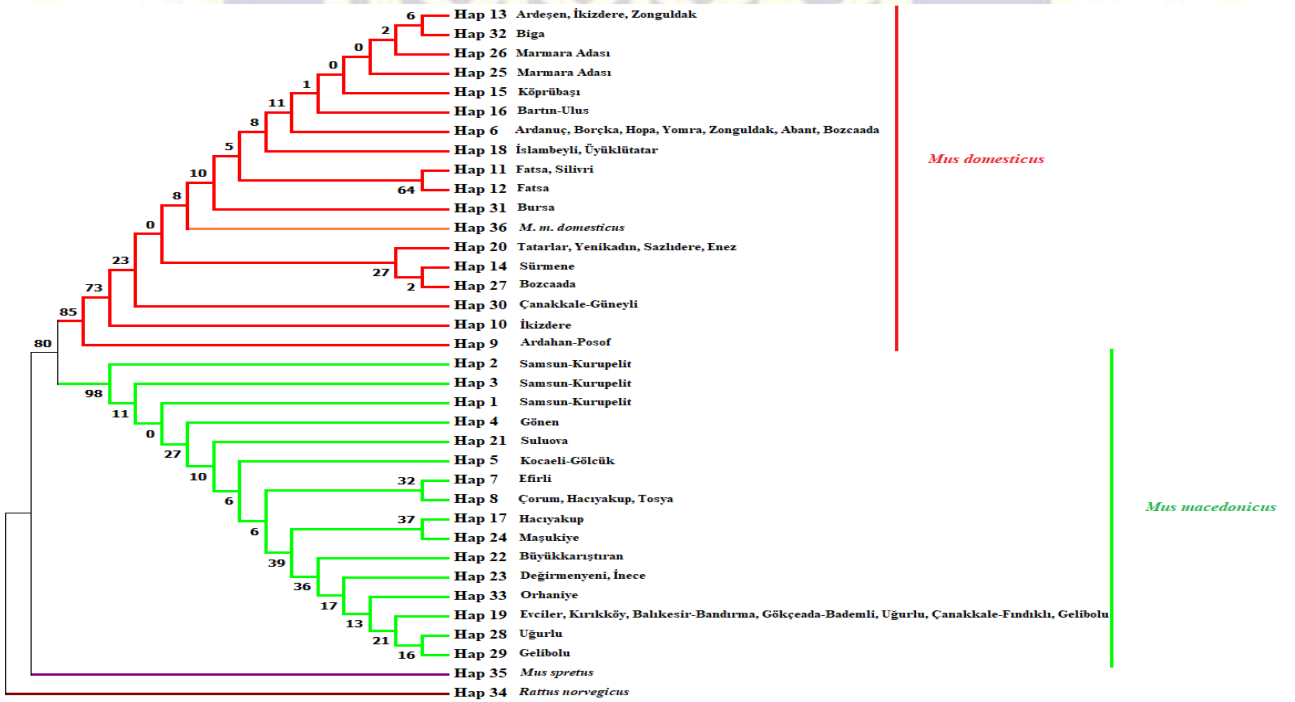
Elde edilen haplotiplerden filogenetik ağaçlar çizilebilmek için MEGA 7 (Kumar vd. 2016) programında en iyi filogenetik test modeli belirlemek amacıyla test edildi (Şekil 4.1).

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

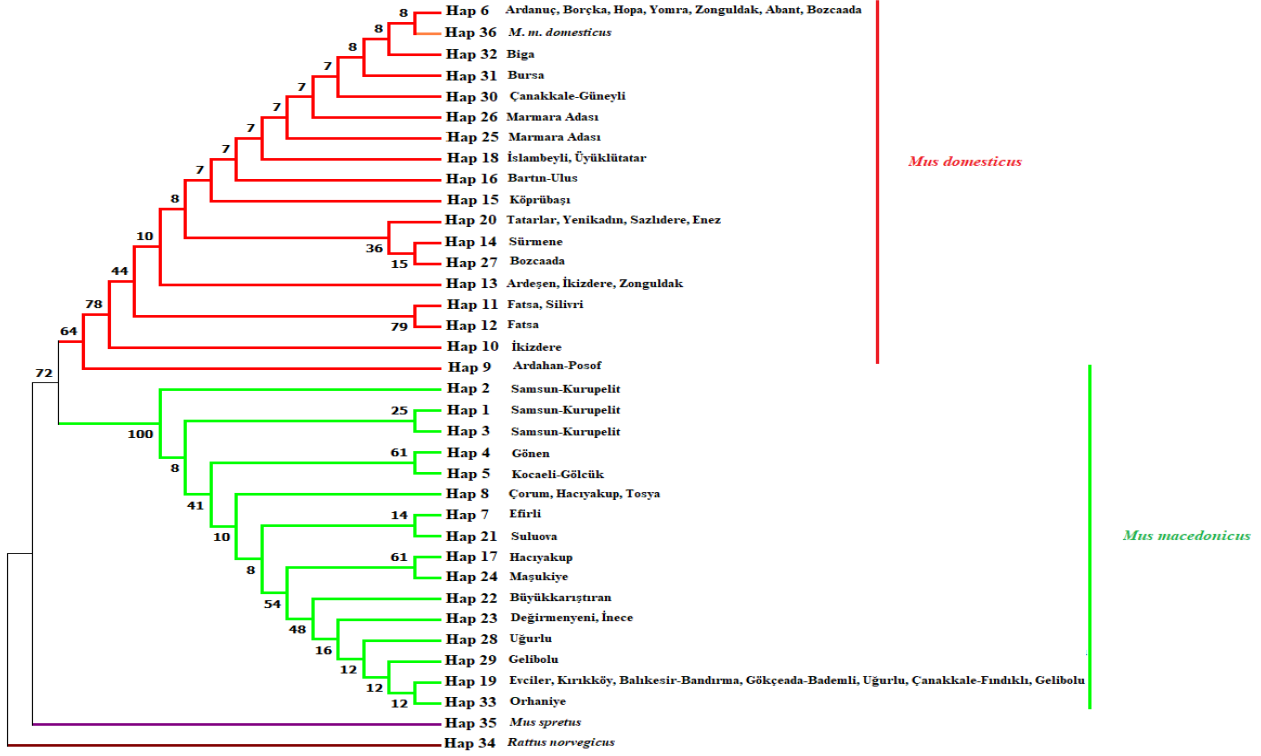
Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
TN93	74	2684.972	2192.770	-1021.427	n/a	n/a	4.55	0.360	0.290	0.270	0.080	0.021	0.019	0.098	0.026	0.154	0.006	0.026	0.166	0.006	0.439	0.021	0.019
HKY	73	2687.626	2202.050	-1027.093	n/a	n/a	4.15	0.360	0.290	0.270	0.080	0.025	0.023	0.066	0.031	0.223	0.007	0.031	0.240	0.007	0.297	0.023	0.023
TN93+I	75	2693.649	2194.822	-1021.427	0.00	n/a	4.55	0.360	0.290	0.270	0.080	0.021	0.019	0.098	0.026	0.154	0.006	0.026	0.166	0.006	0.439	0.021	0.019

Şekil 4.1 COI Bölgesi Filogenetik Model Belirleme Testi Sonuçları

MEGA'daki uygunluk testi doğrultusunda "Maximum-Likelihood" (ML) ağacı çizilebilmek en uygun modelin TN93 istatistik modeli (Tamura ve Nei 1993) olduğu belirlendi. COI gen bölgesinin haplotipleri için en uygun filogenetik test modelinin belirlenmesiyle beraber, bu haplotipler için uygun modelde "Maximum-Likelihood" ağacı (Şekil 4.2) çizildi. Daha sonra, haplotipler düzeyinde değişimleri görmek amacıyla "Maximum-Parsimony" ağacı çizildi (Şekil 4.3). Tüm bu ağaçlardan elde edilen ortak sonuçlara göre, *Mus* cinsi beklendiği üzere *Mus macedonicus* ve *Mus domesticus* olarak iki dala ayrıldı. GenBank'tan dizisi alınan türlerden *Mus musculus domesticus*, *Mus domesticus*'un bulunduğu dalın içinde yerleşti. GenBank'tan alınan *Mus spretus* dizisi ise bu iki türe dışarıdan bağlanırken, GenBank *Rattus norvegicus* dizisi kendi aralarında tam bir ayrım gösterdi ve *Mus* cinsi haplotiplerine en dış koldan bağlandı.

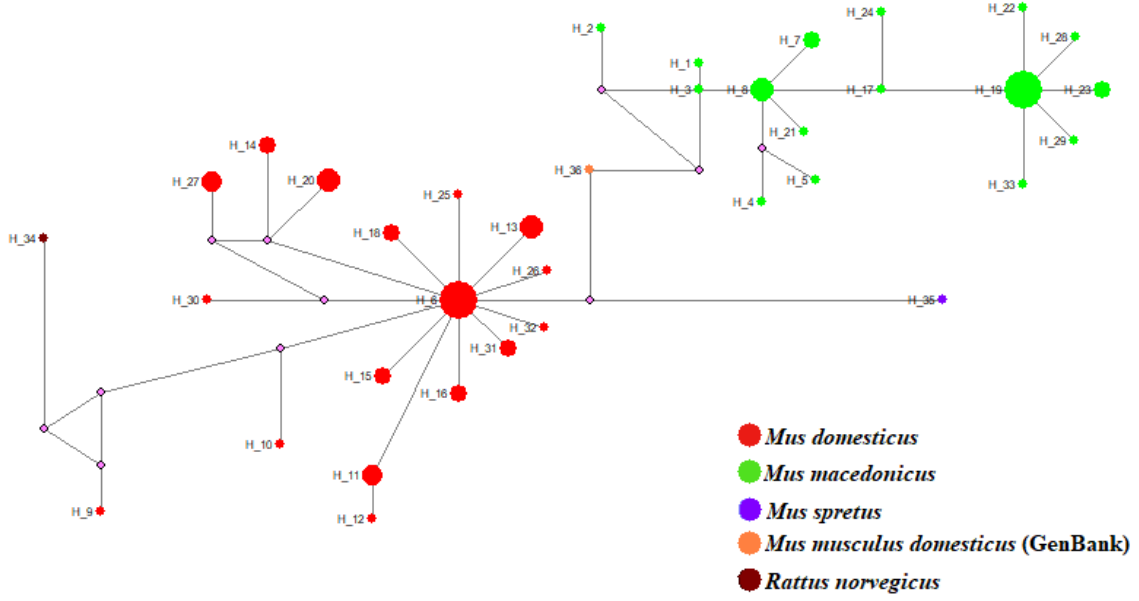


Şekil 4.2 TN93 İstatistik Modeli ile Çizilen COI Gen Bölgesi ML Ağacı



Şekil 4.3 COI Bölgesine Ait Maximum-Parsimony Ağacı

Daha sonra haplotiplerin aralarındaki ilişki ağı, “Median-Joining” yöntemiyle ortaya koyuldu (Şekil 4.4). Yapılan ilişki ağı analizi sonucunda, türlerin evrim sürecinde uğradığı mutasyonlar, diğer bir deyişle dönüm noktaları belirlendi. Analiz sonucunda, *R. norvegicus* ve *Mus spretus* dış gruplarının net şekilde *Mus domesticus* ve *Mus macedonicus* örneklerinden ayrıldığı gözlemlendi. Beklendiği üzere *Mus* cinsi, *M. domesticus* ve *M. macedonicus* olmak üzere iki ayrı kümede gruplanırken, *Mus musculus domesticus* alt türü ile *Mus spretus* ve *M. domesticus* türleri arasında 1 adet mutasyon basamağı bulunmuştur. *M. macedonicus* ise *M. domesticus*’tan farklı olarak 3 adet mutasyon evresinden geçerek geldiği tespit edildi. *M. macedonicus* bireyleri kendi aralarında ise Trakya kümesi, Doğu Marmara-Karadeniz kümesi ve Samsun (Kurupelit) kümesi olmak üzere gruplandığı gözlemlendi. *M. domesticus* ise kendi içinde heterojen bir dağılım gösterirken, Ardahan (Posof) ve Trabzon (Sürmene) örneklerinin bu heterojen yumaktan ortak bir mutasyon basamağı ile ayrıldığı tespit edildi.



Şekil 4.4 COI Bölgesi Türler Arası Median-Joining İlişki Ağı

Analizlerin bireysel bazda “Bayesian” filogenetik uygulamaları ise BEAST ve BeaUti biyoistatistik programlarıyla gerçekleştirildi. Bu işlem gerçekleştirilmeden önce bireyler üzerinden tekrar uygun model HKY+G istatistik modeli olarak belirlendi (Şekil 4.5).

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
HKY+G	154	5780.507	4423.194	-2057.118	n/a	0.22	3.40	0.298	0.284	0.249	0.169	0.032	0.028	0.131	0.033	0.194	0.019	0.033	0.221	0.019	0.232	0.032	0.028
HKY+I	154	5781.716	4424.403	-2057.723	0.66	n/a	3.31	0.298	0.284	0.249	0.169	0.032	0.028	0.130	0.034	0.193	0.019	0.034	0.220	0.019	0.230	0.032	0.028
T92+G	152	5784.019	4444.321	-2069.694	n/a	0.23	3.29	0.291	0.291	0.209	0.209	0.033	0.024	0.161	0.033	0.161	0.024	0.033	0.225	0.024	0.225	0.033	0.024

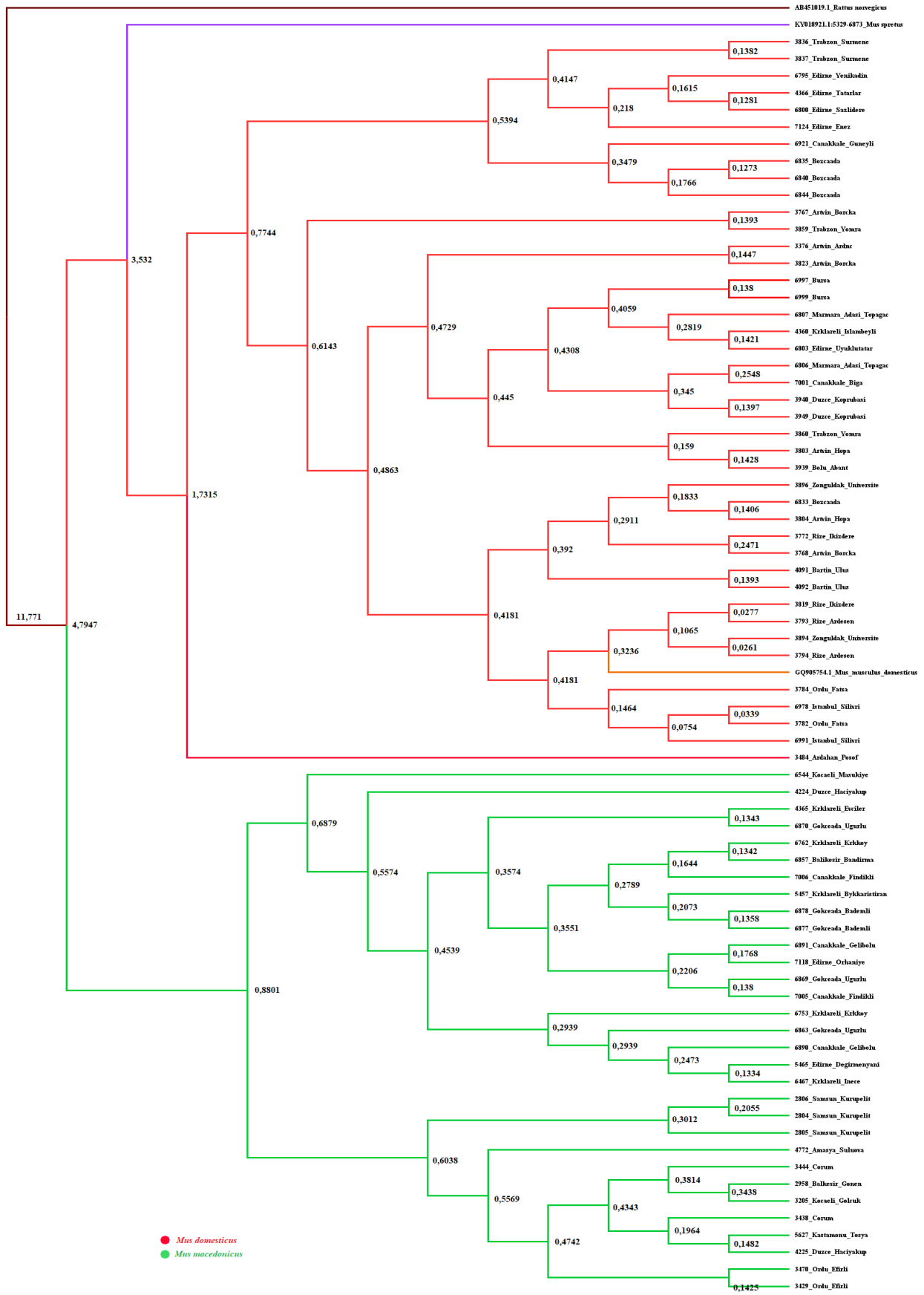
Şekil 4.5 COI Bölgesi Tüm Bireyler İçin Uygun Model Testi Uygulaması

Belirlenen model üzerinden BEAST programının BeaUti eklentisinde hazırlanan girdi dosyası işlenerek, BEAST uygulamasıyla filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Oluşturulan ağaçların belli bir kısmı, yine aynı programın TreeAnnotator eklentisiyle ortadan kaldırıldı. Daha sonra FigTree uygulaması ile Bayesian çıkarılması için filogenetik ağaç modeli çizildi (Şekil 4.6). HKY+G modelinde (Hasegawa vd. 1985) çizilen ağaç, *Mus* cinsi için belirgin bir ayırım verdi.

Yapılan analiz ile *R. norvegicus*'un *Mus*'tan ayrımının yaklaşık 11,77 milyon yıl (10,90 – 12,45 milyon yıl) önce gerçekleştiği görüldü. *Mus* cinsinde ise kendi içinde *M. macedonicus*'a ayrılma süreci 4,79 milyon yıl önce gerçekleşirken, *M. domesticus* ise *M. spretus*'tan 3,53 milyon yıl önce ayrıldığı tespit edildi. *M. macedonicus* örneklerinin kendi içerisinde kısmen bir ayrıma sahip olduğu ve Karadeniz-

Gönen-Gölcük soy hattı ile Trakya-Gökçeada-Bandırma-Maşukiye soy hattı arasındaki ayrılmanın yaklaşık 0,88 milyon yıl önce gerçekleştiği tahmin edildi. *M. domesticus*'un ise ilişki ağı analizinde ortaya çıkan sonuçlarla örtüşür nitelikte dağılımın gözlemlendiği ve Enez-Yenikadın-Sazlıdere-Tatarlar-Sürmene-Bozcaada kolunun türün geri kalanında 0,77 milyon yıl önce ayrıldığı görüldü. Ağaçta Rize – İkizdere, Ardeşen, Zonguldak soy hattında yer alan GenBank örneği *M. m. musculus*'un (GQ905754.1) ise, bu hattan 0,32 Myö ayrıldığı görüldü. Ayrıca Ardahan örneğinin, türün diğer tüm örneklerinden yaklaşık 1,73 Myö ayrıldığı görüldü.





Şekil 4.6 HKY+G İstatistik Modelinde Çizilmiş COI Bayesian Ağacı

Baz değişimleri göz önüne alındığında, transisyon ile gerçekleşen mutasyonlar koyu karakterler ile ifade edilirken; transversiyona uğrayan bazlar italik karakterler ile belirtilmiştir. Analizde, *M. domesticus* bireyleri için en iyi modelleme testi olarak teyit edilen T92 istatistik parametresi (Tamura 1992) uygulandı. Yine bu test ile sadece *Mus domesticus*'un 42 bireyine ait *COI* gen bölgesi nükleotit frekansı ortaya koyuldu (Çizelge 4.2).

Filogenetik testlerin ardından, *Mus domesticus* bireyleri üzerinde MEGA ve DnaSP nükleotit çeşitliliği ile mutasyonel değişimleri (Çizelge 4.3), haplotip çeşitliliği ve frekansı incelenip, polimorfik bölge tespitleri ve nötralite testleri yapıldı.

Çizelge 4.2 *COI* gen bölgesinde *M. domesticus* bireylerinin nükleotit frekansları

A	T/U	C	G
%29.43	%29.43	%20.57	%20.57

Çizelge 4.3 *COI* gen bölgesinde *M. domesticus*'ta meydana gelen baz değişimleri

	A	T/U	C	G
A	-	<i>1.06</i>	<i>0.74</i>	19.10
T/U	<i>1.06</i>	-	19.10	<i>0.74</i>
C	<i>1.06</i>	27.31	-	<i>0.74</i>
G	27.31	<i>1.06</i>	<i>0.74</i>	-

COI gen bölgesi için *M. domesticus* bireylerine DnaSP programında uygulanan diğer bir test kümesi ile, kendi içerisinde sahip olduğu haplotip değeri (h), haplotip çeşitliliği (Hd), nükleotit çeşitliliği (π), ortalama nükleotit farklılığı (k) değerleri hesaplandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 *M. domesticus* bireylerinde *COI* gen bölgesi için h , H_d , π ve k değerleri

Haplotip Değeri (h)	Haplotip Çeşitliliği (H_d)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Ortalama Nükleotit Farklılığı (k)
17	0,909	0,00484	3,286

M. domesticus türüne ait bireylerde DnaSP programıyla gerçekleştirilen başka bir test ile, genetik dizilerindeki monomorfik ve polimorfik bölgeler hesaplandı. Bu bölgelerin geçirdiği mutasyonlar rakamsal olarak ifade edildi (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 *M. domesticus* için *COI* gen bölgesi dizilerindeki polimorfizm verileri

Monomorfik (Sabit) Bölgeler	Polimorfik (Değişken) Bölgeler
642	37 (37 adet mutasyon bulundu)

Cinsin geleceğini de yakından ilgilendiren nötralite testleri ile darboğaz oluşumunun söz konusu olup-olmadığı konusunda fikir elde edildi (Çizelge 4.6).

Tajima'nın D testi, F_u ve L_i 'nin D testi ile yine F_u ve L_i 'nin F testi sonucunda negatif değerler gözlemlendi. Bu değerler incelemede istatistiksel olarak anlamlı bir aralıkta bulunduğu görüldü ($P < 0.5$). Bu sonuçlar, oldukça fazla yeni mutasyon olabileceğini, popülasyonda genişleme görülebilirliğini ve nadir haplotip miktarında kayda değer bir artış yaşanabileceğini işaret etmiştir. Diğer taraftan ise F_u 'nun F_s istatistiksel değeri ise bu sonuçları onaylayan bir sonuç vererek türün geleceğinin sıkıntı içerisinde olmadığını işaret etti.

Çizelge 4.6 *M. domesticus* bireylerinin *COI* gen bölgesindeki nötralite testleri verileri

Tajima'nın D Değeri	Fu ve Li'nin D Değeri	Fu ve Li'nin F Değeri	Fu'nun Fs Değeri
-2,14489	-2,56677	-2,87401	-6,385

Arlequin programı (Excoffier ve Lischer, 2010) AMOVA test modülü (Çizelge 4.7) ile *M. domesticus* için AMOVA verileri elde edildi. Bu testte örnekler iki grupta ve dört farklı alt grupta ele alındı. İlk grubun birinci alt grupta heterojen dağılımın hakim olduğunu Karadeniz (Artvin, Trabzon, Bolu, Zonguldak, Rize)–Ardahan – Bozcaada haplotiplerinden meydana gelirken, ikinci alt grup Karadeniz (Ordu, Rize, Zonguldak, Düzce, Bartın) – İstanbul haplotiplerinden oluşmuştur. Diğer grubun ise üçüncü alt grubu Marmara – Trakya haplotipleri ile dördüncü alt grubu Adalar haplotiplerinden meydana gelmiştir.

Çizelge 4.7 *COI* gen bölgesi *M. domesticus* AMOVA verileri

Varyasyon Kaynağı	d.f	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyasyon Yüzdesi
Gruplar İçinde	1	5.239	0.07110 Va	4.07
Gruplardaki Populasyonlar Arasında	2	6.849	0.21978 Vb	12.59
Populasyonlar İçinde	38	55.270	1.45447 Vc	83.33
Toplam	41	67.357	25.04595	
Fiksasyon İndisleri	FSC = 0.51713 Vb(P = 0.00489+-0.00203)			
	FST = 0.50901 Vc(P = 0.00000+-0.00000)			
	FCT = -0.01681 Va(P = 0.32160+-0.01518)			

Yine aynı program ile oluşturulan gruplar için F_{ST} (Çizelge 4.8) hesaplandı. Bu hesaplamalar ile populasyonların gen akışları ortaya koyuldu.

Çizelge 4.8 *M. domesticus* türünün *COI* gen bölgesi F_{ST} değerleri

F_{ST}	Karadeniz (Artvin, Trabzon, Bolu, Zonguldak, Rize) – Ardahan – Bozcaada	Karadeniz (Ordu, Rize, Zonguldak, Düzce, Bartın) - İstanbul	Marmara - Trakya	Adalar
Karadeniz (Artvin, Trabzon, Bolu, Zonguldak, Rize) – Ardahan – Bozcaada	0.00000			
Karadeniz (Ordu, Rize, Zonguldak, Düzce, Bartın) - İstanbul	0.10070*	0.00000		
Marmara - Trakya	0.09709*	0.21031*	0.00000	
Adalar	0.19632*	0.37794*	0.18869*	0.00000

Bu sonuçlara göre *M. domesticus* populasyonları arası gen akışının kesilmediği görülmüştür. Özellikle Marmara – Trakya alt grubu ile Karadeniz (Artvin, Trabzon, Bolu, Zonguldak, Rize) – Ardahan – Bozcaada alt grubu arasındaki gen akışının oldukça yüksek şekilde devam ettiği görülmektedir. Diğer taraftan Marmara – Trakya ile Adalar arasındaki gen akışının su ve kara bariyerlerine rağmen devam ettiği görülmektedir. İçerisinde Karadeniz haplotiplerini barındıran iki alt grup arasındaki gen akışı ise, içerisinde Bozcaada'yı içeren Karadeniz alt grubunun Marmara – Trakya alt grubuyla olduğundan daha az olmasına rağmen, oldukça yüksek seviyededir.

F_{ST} değerleri 0'dan 1'e yaklaştıkça gen akışında azalma olduğunu ifade ederken, Nm değerleri için bu durum 0'a yaklaştıkça kesilen gen akışını temsil ettiğinden dolayı, hesaplanan Nm değerleri, F_{ST} değerlerinin anlamlarıyla paralellik içerisinde olduğu görüldü (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 *M. domesticus*'ta *COI* gen bölgesi için Nm değerleri

Nm	Karadeniz (Artvin, Trabzon, Bolu, Zonguldak, Rize) – Ardahan – Bozcaada	Karadeniz (Ordu, Rize, Zonguldak, Düzce, Bartın) - İstanbul	Marmara - Trakya	Adalar
Karadeniz (Artvin, Trabzon, Bolu, Zonguldak, Rize) – Ardahan – Bozcaada				
Karadeniz (Ordu, Rize, Zonguldak, Düzce, Bartın) - İstanbul	2.23273			
Marmara - Trakya	2.32492	0.93873		
Adalar	1.02341	0,41148	1.07494	

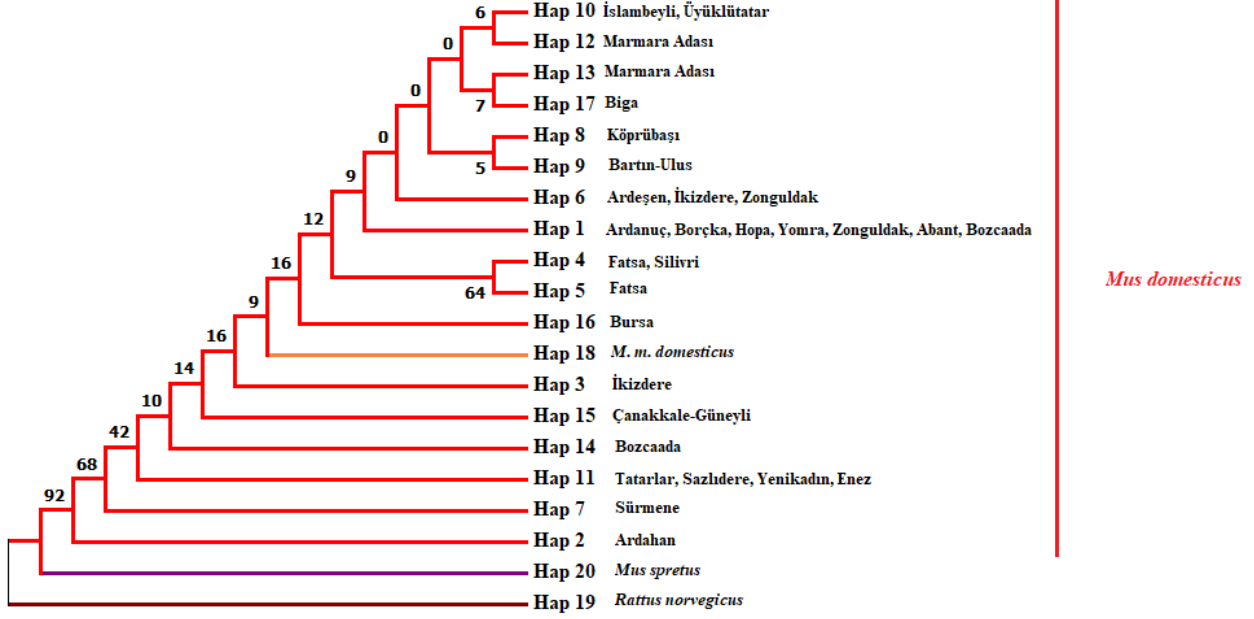
Daha sonra cins için yapılan filogenetik testleri, tür düzeyinde gerçekleştirmek için en uygun istatistiksel modeli belirleme testi gerçekleştirildi (Şekil 4.7) ve TN93 (Tamura ve Nei 1993) modeli en uygun test modeli olarak belirlendi.

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
TN93	42	1624.717	1378.556	-646.593	n/a	n/a	6.76	0.329	0.331	0.272	0.068	0.016	0.013	0.105	0.016	0.131	0.003	0.016	0.159	0.003	0.508	0.016	0.013
HKY	41	1628.644	1388.313	-652.504	n/a	n/a	6.15	0.329	0.331	0.272	0.068	0.022	0.018	0.059	0.022	0.236	0.005	0.022	0.287	0.005	0.285	0.022	0.018
TN93+I	43	1631.703	1379.715	-646.140	0.00	n/a	6.76	0.329	0.331	0.272	0.068	0.016	0.013	0.105	0.016	0.131	0.003	0.016	0.159	0.003	0.508	0.016	0.013

Şekil 4.7 *M. domesticus* *COI* gen bölgesi için en uygun model belirleme sonucu

Belirlenen model doğrultusunda tür içi, dış gruplar (*Mus spretus*, *M. m. domesticus*, *Rattus norvegicus*) katılarak “Maximum-Likelihood” (Şekil 4.8) analizi gerçekleştirildi.



Şekil 4.8 *M. domesticus* COI gen bölgesi Maximum-Likelihood ağacı

Bütün testler yine *M. macedonicus* türü için de uygulandı. İlk önce türün bireyleri için en iyi model belirleme testi ile model parametre belirlendi (Şekil 4.9).

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92	61	2932.488	2447.527	-1162.583	n/a	n/a	2.11	0.293	0.293	0.207	0.207	0.046	0.033	0.142	0.046	0.142	0.033	0.046	0.201	0.033	0.201	0.046	0.033
K2	60	2941.699	2464.682	-1172.167	n/a	n/a	2.11	0.250	0.250	0.250	0.250	0.040	0.040	0.170	0.040	0.170	0.040	0.040	0.170	0.040	0.170	0.040	0.040
T92+I	62	2942.207	2449.302	-1162.465	0.40	n/a	2.12	0.293	0.293	0.207	0.207	0.046	0.032	0.142	0.046	0.142	0.032	0.046	0.201	0.032	0.201	0.046	0.032

Şekil 4.9 *M. macedonicus* türü için model parametre belirleme testi sonuçları

Elde edilen test sonuçları ile yapılan nükleotit mutasyon oranları verileri (Çizelge 4.10) ve nükleotit yüzdeleri (Çizelge 4. 11) ortaya koyuldu.

Baz değişimleri göz önüne alındığında, transisyon ile ortaya çıkan mutasyonlar **koyu** karakterler ile ifade edilirken; transversiyon mutasyona maruz kalan bazlar *italik* karakterler ile belirtilmiştir. Yapılan bu analizde T92 (Tamura 1992) istatistiksel parametresi kullanılmıştır.

M. macedonicus bireyleri için COI gen bölgesi haplotip değeri (h), haplotip çeşitliliği (Hd), nükleotit çeşitliliği (π), ortalama nükleotit farklılığı (k) değerleri DnaSP programıyla hesaplandı (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.10 *COI* gen bölgesi için *M. macedonicus*'ta meydana gelen mutasyonlar

	A	T/U	C	G
A	-	4.62	3.25	14.16
T/U	4.62	-	14.16	3.25
C	4.62	20.10	-	3.25
G	20.10	4.62	3.25	-

Çizelge 4. 11 *M. macedonicus* bireylerinin *COI* gen bölgesi nükleotit frekansları

A	T/U	C	G
%29.33	%29.33	%20.67	%20.67

Çizelge 4.12 *M. macedonicus* türünün *COI* gen bölgesindeki h, Hd, π ve k değerleri

Haplotip Değeri (h)	Haplotip Çeşitliliği (Hd)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Ortalama Nükleotit Farklılığı (k)
17	0,871	0,00461	3,13333

31 birey üzerinden yapılan bu analizde, türün ortalama nükleotit farklılığının düşük olmasına rağmen haplotip çeşitliliğinin oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan testlerde türün örnek sayısının yarısından fazlasında haplotip miktarı göze çarpmıştır.

Testlere ek olarak yine DnaSP programındaki modüllerden türün polimorfik bölge miktarı (Çizelge 4.13) ve nötralite verileri (Çizelge 4.14) analiz edildi.

Çizelge 4.13 *M. macedonicus*'un *COI* gen bölgesi polimorfik bölge verileri

Monomorfik (Sabit) Bölgeler	Polimorfik (Değişken) Bölgeler
650	30 (31 mutasyon görüldü)

Çizelge 4.14 *M. macedonicus* *COI* gen bölgesi nötralite verileri

Tajima'nın D Değeri	Fu ve Li'nin D Değeri	Fu ve Li'nin F Değeri	Fu'nun Fs Değeri
-2,14699	-3,69419	-3,76120	-9,048

Nötralite verilerine göre elde edilen tüm değerlerin istatistiksel olarak oldukça anlamlı ($P < 0.02$) olduğu ve türün geleceğinin tehlike altında olmadığını göstermektedir. Elde edilen değerlerin tamamının negatif değerlere sahip olması türün haplotip çeşitliliği açısından, herhangi bir genetik darboğaz açısından sıkıntıda olmadığını göstermiştir. Nötralite verilerinin, polimorfizm verileri ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Arlequin ile F_{ST} (Çizelge 4.15) ve N_m (Çizelge 4.16) değerleri hesaplanarak, türün tehlike durumu hakkında bilgi elde edildi.

M. macedonicus türü popülasyonları için gen akışı hesaplamasında Arlequin programı kullanılmıştır. Bu programın AMOVA verilerine göre belirlenen popülasyonlar arası, içi ve popülasyonun kendi içindeki gen akış değerleri ortaya koyulmuştur (Çizelge 4.17).

F_{ST} verilerine göre, türün Kurupelit soyhattının ile Marmara-Adalar soyhattı ile arasındaki gen akışı diğer soyhatlarına oranla oldukça yavaşladığı görüldü. Kocaeli soyhattı ile Marmara-Adalar soyhattının beklenmedik bir şekilde gen akışının azaldığı tespit edildi. F_{ST} verileri ile N_m verileri karşılaştırıldığında, iki verinin birbiriyle uyum içerisinde olduğu ve yine Kurupelit popülasyonları ile Kocaeli popülasyonu, Marmara-Adalar popülasyonlarının farklılaşmaya başladığı görülmüştür.

Çizelge 4.15 *M. macedonicus* COI gen bölgesi F_{ST} Verileri

F_{ST}	Karadeniz	Kurupelit	Marmara-Adalar	Kocaeli
Karadeniz	0.0000			
Kurupelit	0.34934*	0.0000		
Marmara-Adalar	0.49836*	0.67447*	0.0000	
Kocaeli	0.38968*	0.28358*	0.63222*	0.0000

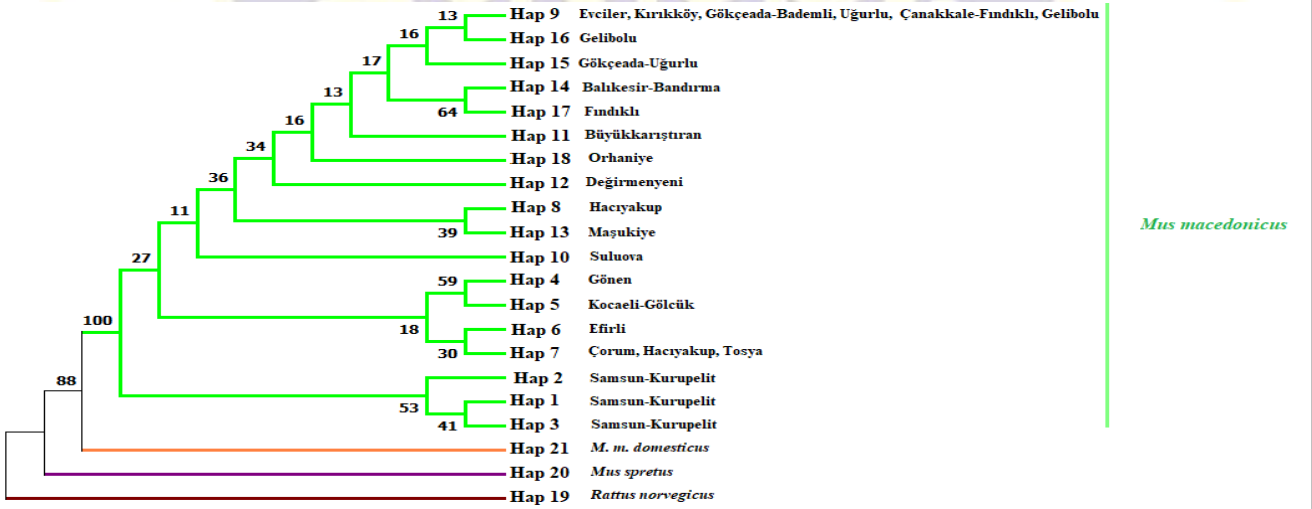
Çizelge 4.16 *M. macedonicus* COI gen bölgesi Nm verileri

Nm	Karadeniz	Kurupelit	Marmara-Adalar	Kocaeli
Karadeniz				
Kurupelit	0.46563			
Marmara-Adalar	0.25165	0.12066		
Kocaeli	0.39156	0.63158	0.14544	

Çizelge 4.17 *M. macedonicus* COI gen bölgesi AMOVA verileri

Varyasyon Kaynakları	d.f	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyasyon oranı
Gruplar Arası	1	10.900	-0.03294 Va	-1.68
Grupların içindeki popülasyonlar arası	2	10.128	1.03017 Vb	52.58
Popülasyonlar içindeki	27	25.972	0.96193 Vc	49.60
Toplam	30	47.000	1.95916	
Fiksasyon İndisleri			FSC = 0.51713 Vb (P = 0.00000+-0.00000)	
			FST = 0.50901 Vc (P = 0.00000+-0.00000)	
			FCT = -0.01681 Va (P = 0.66178+-0.01071)	

Yapılan testlere ek olarak *M. macedonicus* COI gen bölgesi için tür düzeyinde ML (Şekil 4.10) ağacı üzerinden incelendi.

Şekil 4.10 *M. macedonicus* COI gen bölgesi ML ağacı

4.2 Nükleer Apolipoprotein B (APOB) Gen Bölgesi Verileri

Nükleer DNA'nın APOB gen bölgesi için laboratuvarındaki mevcut dokulardan, 39 farklı lokaliteden 74 birey ile çalışıldı. Dış grup oluşturmak amacıyla GenBank veritabanından *Mus macedonicus*, *Mus spretus* ve *Rattus norvegicus* türlerine ait diziler alındı. BioEdit programıyla gerçekleştirilen, dizilerin başları ve sonlarının eşit uzunlukta olacak şekilde kesilmesi işlemiyle, 1120 baz çifti uzunluğunda ortak bir veri seti oluşturuldu. Elde edilen veri setine DnaSP programında uygulanan haplotip belirleme testi ile, gen bölgesinde bireyler ve GenBank dizileri için 26 adet haplotipin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.18 APOB gen bölgesinde elde edilen haplotip verileri

Tür İsmi	Haplotip Sırası	Haplotip Sayısı	GenBank-Müze Numarası	Lokalite (Örnek Sayısı)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_1	15	2881-3376-3768-3772-3781-3782-3896-3939-4091-4366-6817-6833-6835-6840-6921	Samsun-Kurupelit (1), Artvin-Ardanuç (1), Artvin-Borçka (1), Rize-İkizdere (1), Ordu-Fatsa (2), Zonguldak (1), Bolu (1), Bartın (1), Edirne-Tatarlar (1), Marmara Adası (1), Bozcaada (3), Çanakkale-Güneyli (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_2	1	3484	Ardahan (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_3	1	3767	Artvin-Borçka (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_4	1	3793	Rize-Ardeşen (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_5	1	3794	Rize-Ardeşen (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_6	1	3803	Artvin-Hopa (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_7	1	3804	Artvin-Hopa (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_8	1	3819	Rize-İkizdere (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_9	1	3823	Artvin-Borçka (1)

Çizelge 4.18 APOB gen bölgesinde elde edilen haplotip verileri (devamı)

<i>Mus domesticus</i>	Hap_10	8	3836-3853-3859-3860-3894-4360-6922-7001	Trabzon-Sürmene (1), Ordu-Fatsa (1), Trabzon-Yomra (2), Zonguldak (1), Kırklareli-İslambeyli (1), Çanakkale-Güneyli (1), Çanakkale-Sinekçi (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_11	1	3837	Trabzon-Sürmene (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_12	1	6795	Edirne-Yenikadın (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_13	1	6803	Edirne-Üyükütatar (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_14	1	6805	Edirne-Üyükütatar (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_15	4	6806-6807-6818-6844	Marmara Adası (3), Bozcaada (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_16	1	6997	Bursa-Ulubat (1)
<i>Mus domesticus</i>	Hap_17	1	7124	Edirne-Enez (1)
<i>Mus macedonicus</i>	Hap_18	25	2804-2806-2812-2958-3429-3438-3441-3444-3470-4224-4225-4365-4772-5457-5465-5627-6753-6762-6852-6877-6878-6890-6891-7005-7006	Samsun-Kurupelit (3), Balıkesir-Gönen (1), Ordu-Efirli (2), Çorum (3), Düzce-Hacıyakup (2), Kırklareli-Evciler (1), Amasya-Suluova (1), Kırklareli-Büyükkarıştıran (1), Edirne-Değirmenyanı (1), Kastamonu-Tosya (1), Kırklareli-Kırıkköy (2), Balıkesir-Bandırma (1), Gökçeada-Bademli (2), Çanakkale-Gelibolu (2), Çanakkale-Fındıklı (2)

Çizelge 4.18 *APOB* gen bölgesinde elde edilen haplotip verileri (devamı)

<i>Mus macedonicus</i>	Hap_19	1	3205	Kocaeli-Gölcük (1)
<i>Mus macedonicus</i>	Hap_20	1	6857	Balıkesir-Bandırma (1)
<i>Mus macedonicus</i>	Hap_21	1	6863	Gökçeada-Uğurlu (1)
<i>Mus macedonicus</i>	Hap_22	1	6870	Gökçeada-Uğurlu (1)
<i>Mus macedonicus</i>	Hap_23	1	7118	Edirne-Orhaniye (1)
<i>Mus macedonicus</i>	Hap_24	1	AB285437.1	(1)
<i>Mus spretus</i>	Hap_25	1	MF947503.1	(1)
<i>Rattus norvegicus</i>	Hap_26	1	U53873.1	(1)

Belirlenen haplotiplere “Maximum-Likelihood” ağacı çizebilmek için en uygun ağaç modeli tespit testi MEGA programında uygulandı. Test sonucunda en uygun modelin T92 (Tamura, 1992) olduğu belirlendi (Şekil 4.11).

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92	51	7390.801	6989.287	-3443.507	n/a	n/a	1.70	0.287	0.287	0.213	0.213	0.052	0.039	0.135	0.052	0.135	0.039	0.052	0.182	0.039	0.182	0.052	0.039
K2	50	7399.777	7006.131	-3452.934	n/a	n/a	1.68	0.250	0.250	0.250	0.250	0.047	0.047	0.157	0.047	0.157	0.047	0.047	0.157	0.047	0.157	0.047	0.047
T92+I	52	7400.679	6991.298	-3443.507	0.00	n/a	1.70	0.287	0.287	0.213	0.213	0.052	0.039	0.135	0.052	0.135	0.039	0.052	0.182	0.039	0.182	0.052	0.039

Şekil 4.11 *APOB* gen bölgesi test modeli uygunluk verileri

Test modeli uygunluk verilerine göre belirlenen T92 istatistiksel parametresi (Tamura, 1992) ile “Maximum-Likelihood” ağacı çizildi (Şekil 4.12).

Filogenetik ağaçtan elde edilen verilere göre, *Mus macedonicus* ile *Mus domesticus*'un ve *Mus spretus* ile *Rattus norvegicus*'tan keskin bir ayırım ile tamamen ayrıldığı gözlemlendi. *Mus macedonicus* haplotipleri içerisinde, Hap 20 (Balıkesir – Bandırma), Hap 21 (Gökçeada – Uğurlu), Hap 22 (Gökçeada – Uğurlu) haplotiplerinin bulunduğu soy hattı, Hap 23 (Edirne – Orhaniye), Hap 19 (Kocaeli), Hap 18 (Samsun – Kurupelit, Balıkesir – Gönen, Ordu – Efirli, Çorum, Düzce, Kırklareli – Evciler, Amasya, Kırklareli – Büyükkarıştıran, Balıkesir – Bandırma, Gökçeada – Bademli, Çanakkale – Gelibolu,

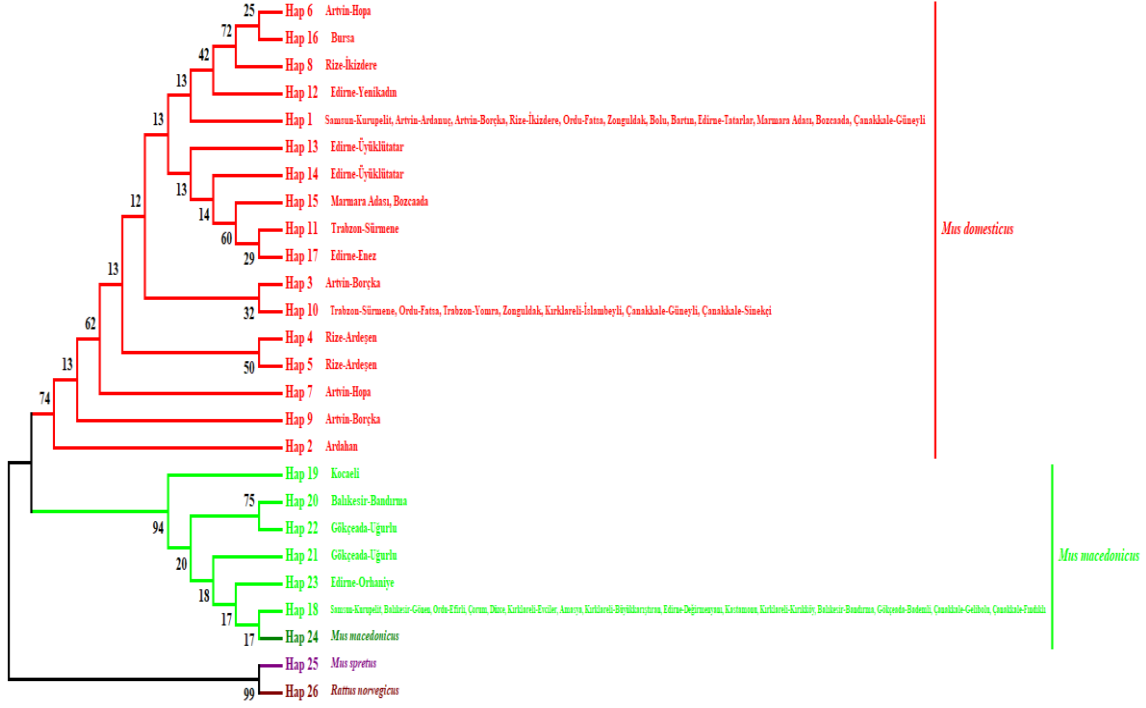
Çanakkale – Fındıklı) ve Hap 24 (AB285437.1 - *M. macedonicus* dış grup) haplotiplerinin bulunduğu soy hattından neredeyse tamamen ayrılmıştır. Diğer taraftan, *M. domesticus*'ta ise Hap 2 (Ardahan) ile Hap 9 (Artvin – Borçka) haplotipleri, türün diğer tüm haplotiplerinden ayrılmıştır.



Şekil 4.12 APOB gen bölgesi Maximum-Likelihood ağacı

Çizilen “Maximum-Likelihood” ağacını takiben, “Maximum-Parsimony” ağacı ile de haplotiplerin değişimlerine ilişkin veriler elde edildi (Şekil 4.13).

Gerçekleştirilen diğer bir analiz ile de “Maximum-Parsimony” ağacı çizildiğinde, ML ağacının verilerini destekler nitelikte sonuçlar elde edildi. *M. macedonicus* örneklerine ait haplotiplerde, çizilen diğer tüm ağaçlarda olduğu üzere, Hap 20 (Balıkesir – Bandırma) ve Hap 22 (Gökçeada – Uğurlu) soy hattı diğer soylardan ayrıldı, ama bu sefer Hap 21 (Gökçeada – Uğurlu) haplotipinin, Hap 23 (Edirne – Orhaniye)’ün bulunduğu soy hattı ile birleştiği görüldü. *M. domesticus* bireylerinin haplotiplerinde ise Hap 2 (Ardahan), Hap 9 (Artvin – Borçka), Hap 7 (Artvin – Hopa) haplotipleri türün diğer haplotiplerinden ayrıldı.



Şekil 4.13 APOB gen bölgesine ait Maximum-Parsimony ağacı

M. domesticus türü haplotiplerinin kendi aralarında, dış grup dahil edilerek filogenetik analizlerini gerçekleştirmek amacıyla istatistiksel parametre belirleme testi uygulandı (Şekil 4.14). Uygulanan bu test ile T92 (Tamura 1992) en uygun test olarak belirlendi.

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92	39	7031.281	6734.630	-3328.210	n/a	n/a	1.72	0.290	0.290	0.210	0.210	0.052	0.038	0.134	0.052	0.134	0.038	0.052	0.185	0.038	0.185	0.052	0.038
T92+I	40	7040.893	6736.641	-3328.210	0.00	n/a	1.72	0.290	0.290	0.210	0.210	0.052	0.038	0.134	0.052	0.134	0.038	0.052	0.185	0.038	0.185	0.052	0.038
T92+G	40	7041.091	6736.839	-3328.309	n/a	200.00	1.72	0.290	0.290	0.210	0.210	0.052	0.038	0.134	0.052	0.134	0.038	0.052	0.185	0.038	0.185	0.052	0.038

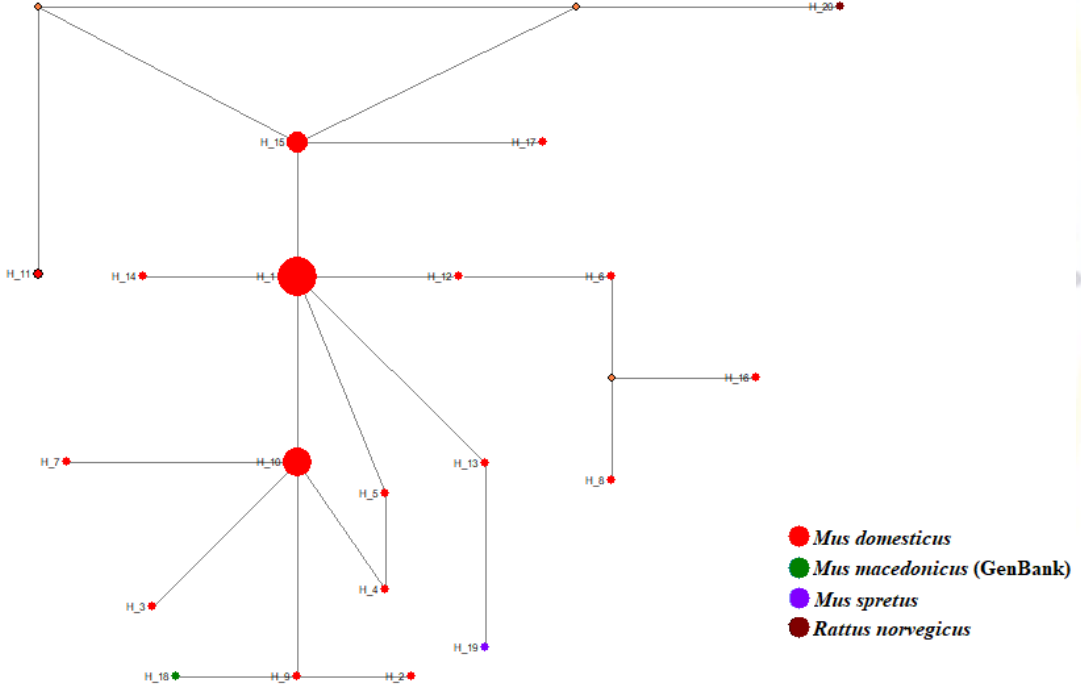
Şekil 4.14 *M. domesticus* haplotiplerinin APOB gen bölgesi için en iyi test modeli

Bu istatistiksel parametre doğrultusunda, türün haplotipleri ve dış gruplar dahil edilerek “Maximum-Likelihood” ağacı (Şekil 4.15) çizildi.



Şekil 4.15 *M. domesticus* haplotiplerine dış grup katılarak çizilen ML ağacı

Tüm bu veriler doğrultusunda *M. domesticus* türü için Network programı kullanılarak, türün haplotipleri ve dış gruplarla olan ilişkisini değerlendirmek amacıyla “Median-Joining” ilişki ağı çizildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 *POB* gen bölgesinde *M. domesticus* türü haplotiplerinin ilişki ağı

Yapılan haplotip analizlerinin ardından türlerin ayrı ayrı birey düzeyinde MEGA’da uygun test modeli belirleme verilerine (Şekil 4.17) göre, daha sonra MEGA ve DnaSP biyoistatistik programları ile nükleotid mutasyonları (Çizelge 4.19) ve çeşitliliği, polimorfizm, polimorfik bölge tespiti ve nötralite testleri uygulandı.

EK-11 Sonuç Raporu Formatı

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92+G	82	3978.774	3272.571	-1554.118	n/a	0.05	0.41	0.301	0.301	0.199	0.199	0.106	0.070	0.059	0.106	0.059	0.070	0.106	0.090	0.070	0.090	0.106	0.070
T92+G+I	83	3981.971	3267.159	-1550.408	0.49	0.05	0.41	0.301	0.301	0.199	0.199	0.106	0.070	0.059	0.106	0.059	0.070	0.106	0.090	0.070	0.090	0.106	0.070
HKY+G	84	3984.893	3261.473	-1546.561	n/a	0.05	0.41	0.318	0.285	0.234	0.163	0.099	0.082	0.049	0.111	0.071	0.057	0.111	0.086	0.057	0.096	0.099	0.082

Şekil 4.17 *APOB* gen bölgesinde *M. domesticus* bireyleri için uygun model testi verileri

Baz değişimleri göz önüne alındığında, transisyon mutasyonlar **koyu** karakterler ile ifade edilirken; transversiyon gerçekleşen bazlar *italik* karakterlerle belirtilmiştir. Bu baz mutasyonlarının tespit edilmesinde T92+G (Tamura, 1994) istatistiksel modeli kullanıldı. Aynı test üzerinden *Mus* bireylerinde 1192 baz çiftlik dizi içerisinde bulunan nükleotitlerin frekansları da ortaya koyuldu (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.19 *APOB* gen bölgesi *M. domesticus* bireylerinde meydana gelen mutasyonlar

	A	T/U	C	G
A	-	10.55	6.96	5.95
T/U	10.55	-	5.95	6.96
C	10.55	9.02	-	6.96
G	9.02	10.55	6.96	-

M. domesticus bireyelerine *APOB* gen bölgesi için DnaSP programında uygulanan testler ile, kendi içerisinde sahip olduğu haplotip değeri (h), haplotip çeşitliliği (Hd), nükleotit çeşitliliği (π), ortalama nükleotit farklılığı (k) değerleri hesaplandı (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.20 *M. domesticus* bireylerinin *APOB* gen bölgesindeki nükleotit verileri

A	T/U	C	G
%30,13	%30,13	%19,87	%19,87

Çizelge 4.21 *M. domesticus* bireylerinde *APOB* gen bölgesi için h, Hd, π ve k verileri

Haplotip Değeri (h)	Haplotip Çeşitliliği (Hd)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Ortalama Nükleotit Farklılığı (k)
17	0,830	0,00214	2,128

M. domesticus bireylerinde DnaSP programıyla gerçekleştirilen diğer bir test ile, genetik dizilerindeki monomorfik ve polimorfik bölgeler ortaya koyuldu. Bu bölgelerin geçirdiği mutasyonlar rakamsal olarak hesap edildi (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22 *M. domesticus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi polimorfizm verileri

Monomorfik (Sabit) Bölgeler	Polimorfik (Değişken) Bölgeler
977	18 (19 Adet Mutasyon mevcut)

Fu'nun Fs değeri, Tajima'nın D testi, Fu ve Li'nin D testi ile yine Fu ve Li'nin F testi sonucunda negatif değerler ortaya koyuldu (Çizelge 4.23). Bu sonuçların istatistiksel bir önem arz etmediği ($P>0.5$) programın hesaplarına göre belirlendi.

Çizelge 4.23 *Mus domesticus* bireylerinin APOB gen bölgesi nötralite verileri

Tajima'nin D'si	Fu ve Li'nin D'si	Fu ve Li'nin F'si	Fu'nun Fs Değeri
-1,70493	-1,97198	-2,22555	-10,599

Fu'nun Fs değeri bu bileşenlerden bağımsız olarak değerlendirildiğinde, popülasyonda genişlemenin mümkün olduğunu ve nadir görülebilir haplotip miktarında ciddi bir artış yaşanabileceğini göstermiştir.

COI uygulamasında olduğu üzere AMOVA testleri (Çizelge 4.24) Arlequin programı ile (Excoffier ve Lischer, 2010) gerçekleştirildi. Bu testler sayesinde popülasyonlar arasında, popülasyonların grupları arasında ve grupların içerisinde farklılıklar tespit edilerek AMOVA verileri oluşturulmuştur.

Çizelge 4.24 *M. domesticus* için APOB gen bölgesi AMOVA verileri

Varyasyon Kaynağı	d.f	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyasyon oranı
Gruplar İçinde	1	3.235	0.03778 Va	3.25
Gruplardaki Popülasyonlar Arasında	4	10.143	0.29116 Vb	25.04
Popülasyonlar İçinde	34	29.183	0.83381 Vc	71.71
Toplam	40	42.561	1.16274	
Fiksasyon İndisleri	FSC = 0.25881 Vb (P = 0.00000+-0.00000)			
	FST = 0.28289 Vc (P = 0.00000+-0.00000)			
	FCT = 0.03249 Va (P = 0.24731+-0.01461)			

Arlequin programı sayesinde yapılan diğer bir test ile F_{ST} değerleri (Çizelge 4.25) ve N_m değerleri ortaya koyulmuştur (Çizelge 4.26).

Hesaplama; 1, Artvin – Hopa ve Ardahan haplotiplerini; 2, Rize – Ardeşen haplotiplerini; 3, Samsun – Kurupelit, Ardanuç ile Borçka (Artvin), Rize – İkizdere, Ordu – Fatsa, Zonguldak, Bolu – Abant, Bartın – Ulus, Edirne – Tatarlar, Marmara Adası, Bozcaada, Çanakkale – Güneyli bireylerinin olduğu haplotipleri; 4, Sürmene ile Yomra (Trabzon), Ordu – Fatsa, Zonguldak, Kırklareli – İslambeyli, Güneyli

ile Sinekçi (Çanakale) bireylerini içeren haplotipleri; 5, Marmara Adası ve Bozcaada haplotiplerini; 6, Üyükütatar, Enez ve Yenikadın (Edirne) haplotipleri gruplarını temsil etmiştir.

Çizelge 4.25 *M. domesticus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi F_{ST} değerleri

F_{ST}	1	2	3	4	5	6
1	0.00000					
2	0.14679	0.00000				
3	0.35153*	0.41672	0.00000			
4	0.27576	0.44045	0.32414*	0.00000		
5	0.15167	0.30603	0.28387	0.34489*	0.00000	
6	0.15304*	0.26486*	0.07572	0.35707*	0.03309	0.00000

M. macedonicus haplotipleri için tekrar kendi içerisinde, tür için bir en iyi parametre belirleme testi yapılmıştır (Şekil 4.18). Bu testin sonucunda en uygun model T92 (Tamura 1992) olarak belirlenmiştir.

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92	17	6415.557	6300.122	-3133.015	n/a	n/a	2.41	0.287	0.287	0.213	0.213	0.041	0.031	0.151	0.041	0.151	0.031	0.041	0.204	0.031	0.204	0.041	0.031
T92+I	18	6424.353	6302.133	-3133.015	0.00	n/a	2.41	0.287	0.287	0.213	0.213	0.041	0.031	0.151	0.041	0.151	0.031	0.041	0.204	0.031	0.204	0.041	0.031
T92+G	18	6424.540	6302.320	-3133.108	n/a	200.00	2.43	0.287	0.287	0.213	0.213	0.041	0.031	0.152	0.041	0.152	0.031	0.041	0.205	0.031	0.205	0.041	0.031

Şekil 4.18 *M. macedonicus* haplotiplerinin *APOB* en iyi model testi sonucu

Bu testler doğrultusunda türün kendi haplotipleri arasına dış gruplar katılarak, “Maximum-Likelihood”(Şekil 4.19) ve “Maximum-Parsimony” (Şekil 4.20) ağaçları çizilmiştir.

Çizelge 4.26 *M. domesticus* bireylerine ait Nm değerleri

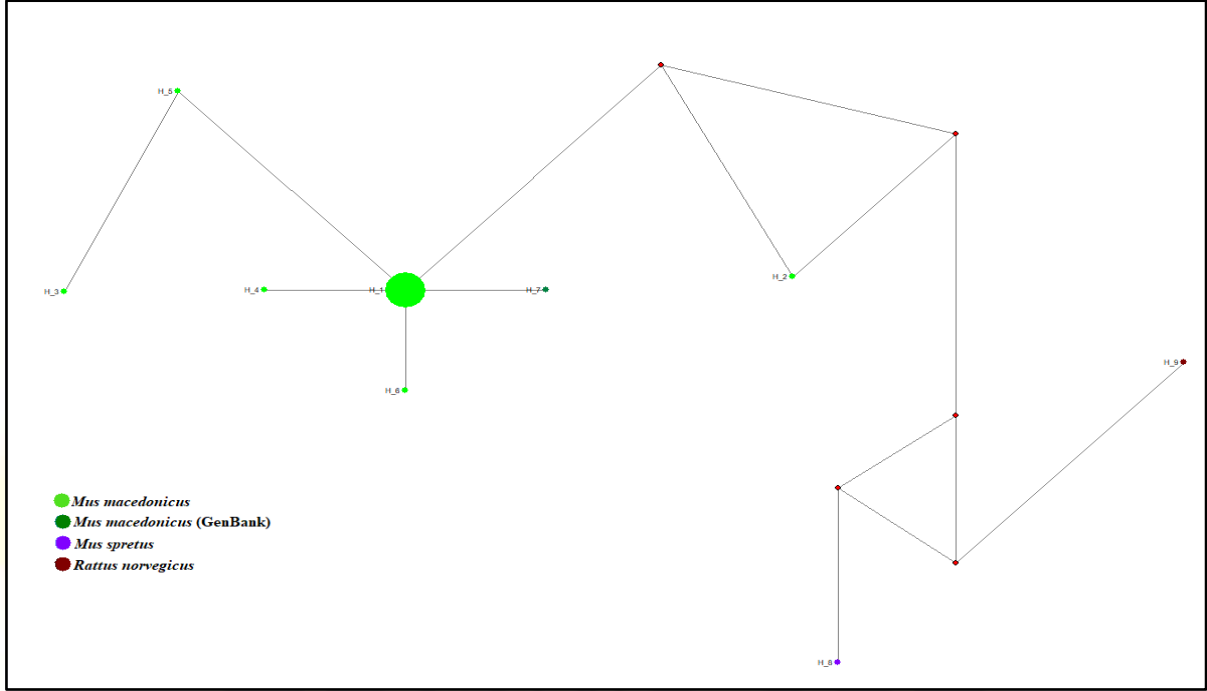
Nm	1	2	3	4	5	6
1						
2	1,45313					
3	0,46119	0,34992				
4	0,65659	0,31761	0,52128			
5	1,39831	0,56692	0,63067	0,47488		
6	1,38356	0,69388	3,05157	0,45016	7,30469	

Yapılan testler doğrultusunda *M. macedonicus*'un haplotipleri ve dış grupları arasındaki ilişkileri incelemek için "Median-Joining" çizimi yapıldı (Şekil 4.21).

Şekil 4.19 *M. macedonicus* haplotipleri ve dış gruplardan oluşan APOB ML Ağacı



Şekil 4.20 *M. macedonicus* haplotiplerinin dış gruplu *APOB* gen bölgesi MP ağacı



Şekil 4.21 *M. macedonicus* türünün Median-Joining Analizi Çizimi

Türün bireysel analizlerinde kullanılmak üzere, birey üzerinden en iyi istatistiksel parametre modeli hesaplaması gerçekleştirildi (Şekil 4.22).

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
T92	59	3513.371	3025.306	-1453.531	n/a	n/a	0.64	0.301	0.301	0.199	0.199	0.090	0.060	0.079	0.090	0.079	0.060	0.090	0.120	0.060	0.120	0.090	0.060
HKY	61	3522.215	3017.613	-1447.676	n/a	n/a	0.64	0.318	0.284	0.231	0.166	0.085	0.069	0.067	0.095	0.093	0.050	0.095	0.114	0.050	0.128	0.085	0.069
T92-I	60	3523.648	3027.315	-1453.531	0.00	n/a	0.64	0.301	0.301	0.199	0.199	0.090	0.060	0.079	0.090	0.079	0.060	0.090	0.120	0.060	0.120	0.090	0.060

Şekil 4.22 *M. macedonicus* bireyleri *APOB* gen bölgesi için en uygun test modeli

Yapılan test ile belirlenen parametre sayesinde bireylerin nükleotitlerinde meydana gelen mutasyonlar (Çizelge 4.27), nükleotit oranları (Çizelge 4.28) belirlendi.

Çizelge 4.27 *M. macedonicus* için *APOB* gen bölgesindeki nükleotit mutasyonları

Nükleotit	A	T/U	C	G
A	-	9.05	5.97	7.94
T/U	9.05	-	7.94	5.97
C	9.05	12.02	-	5.97
G	12.02	9.05	5.97	-

Çizelge 4.28 *M. macedonicus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi nükleotit oranları

A	T/U	C	G
%30,11	%30,11	%19,89	%19,89

M. macedonicus bireylerinin nükleotit çeşitliliği, haplotip sayısı ve çeşitlilikleri, ortalama nükleotit farklılığı ölçüldü (Çizelge 4.29).

M. macedonicus bireylerinde uygulanan diğer bir test ile, genetik dizilerindeki monomorfik ve polimorfik bölgeler ortaya kondu. Bu bölgelerin geçirdiği mutasyonlar rakamsal olarak ifade edildi (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.29 *M. macedonicus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi h , H_d , π , k değerleri

Haplotip Değeri (h)	Haplotip Çeşitliliği (H_d)	Nükleotit Çeşitliliği (π)	Ortalama Nükleotit Farklılığı (k)
6	0,310	0,00130	1,262

Çizelge 4.30 *M. macedonicus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi sabit ve değişken bölgeleri

Sabit (Monomorfik) Bölgeler	Değişken (Polimorfik) Bölgeler
950	18 (18 Mutasyon tespit edildi)

M. macedonicus bireylerinin popülasyonlarının ne durumda olduğu hakkında bilgi sahibi olabilmek adına nötralite testleri uygulandı (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31 *M. macedonicus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi nötralite testi verileri

Tajima'nın D'si	Fu ve Li'nin D'si	Fu ve Li'nin F'si	Fu'nun Fs Değeri
-2,48758	-4,18318	-4,28287	-0,959

Gerçekleştirilen nötralite testleri doğrultusunda *M. macedonicus* verilerinin istatistiksel açıdan çok önemli olduğu görülmüştür ($P < 0.001$). Bu doğrultuda sonuçlar, türün popülasyonlarında oldukça fazla yeni mutasyon bulunduğunu, popülasyonun genişlemeye açık olduğunu ve nadir haplotip miktarında az da olsa bir artışa sahip olabileceğini işaret etti.

Nötralite verilerine paralel olarak uygulanan AMOVA testi (Çizelge 4.32) ve F_{ST} (Çizelge 4.33) ile N_m (Çizelge 4.34) değerlerinin hesaplanması sayesinde türün popülasyonları arasındaki gen akışı ifade edildi.

Çizelge 4.32 *M. macedonicus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi AMOVA verileri

Varyasyon Kaynağı	d.f.	Kareler Toplamı	Varyans Bileşenleri	Varyasyon oranları
Gruplar arası	1	4.571	-0.82047 Va	-52.88
Grup içindeki popülasyonlar arası	1	4.250	1.87785 Vb	121.02
Popülasyon içi	27	13.346	0.49430 Vc	31.86
Toplam	40	22.167	1.55168	
Fiksasyon İndisleri	FSC = 0.79162 Vb (P = 1.00000+-0.00000)			
	FST = 0.68144 Vc (P = 0.00000+-0.00000)			
	FCT = -0.52876 Va (P = 0.67253+-0.01599)			

F_{ST} verilerine göre, Karadeniz-Trakya soy hattı ile Gökçeada-Uğurlu, Gölcük-Gönen popülasyonlarının gen akışında azalma tespit edildi. Ancak bunlardan sadece Karadeniz-Trakya ile Gölcük-Gönen popülasyonlarının ayrımı istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Çizelge 4.33 *M. macedonicus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi F_{ST} değerleri

F _{ST}	Karadeniz - Trakya	Uğurlu	Gölcük - Gönen
Karadeniz - Trakya	0.00000		
Uğurlu	0.79728	0.00000	
Gölcük - Gönen	0.69729*	-0.05556	0.00000

F_{ST} değerleri ile paralel olarak, Nm değerlerinin de Karadeniz-Trakya ile diğer iki soy hattı arasındaki farklılaşmanın yüksek olduğu görüldü.

Çizelge 4.34 *M. macedonicus* bireylerinin *APOB* gen bölgesi Nm değerleri

Nm	Karadeniz - Trakya	Uğurlu	Gölcük - Gönen
Karadeniz - Trakya			
Uğurlu	0,063565		
Gölcük - Gönen	0,10853	inf	

V. Sonuç ve Öneriler

5.1 *COI* Gen Bölgesi Bulgularının Genel Değerlendirmesi

Yapılan çalışmalarda *Mus* cinsinin *Rattus* cinsinden ayrılmasının Orta Miyosen döneminde gerçekleştiği görülmektedir. Bu bilgi, literatürdeki fosil kayıtlarıyla da uyumluluk göstermektedir.

M. macedonicus bireylerinin çeşitlilik göstermesi için gerekli olan adaptasyon koşullarının oturması, Karadeniz bölgesinde, Marmara'dan daha önce gerçekleştiğinden dolayı bireylerin bu bölgede ayrımı daha erken gerçekleşmiştir. Özellikle Kurupelit (Samsun), ilgili gen bölgesi için 3 farklı haplotip çıkartması, bu yerin çeşitlilik açısından diğer tüm lokalitelerden çok daha yüksek öneme sahip olduğunu ortaya koymuştur. *Mus macedonicus* örneklerinde bu gen bölgesi için yapılmış moleküler filogenetik bir çalışma bulunmadığından, elde edilen veriler, bu gen bölgesi açısından moleküler düzeyde tartışılmamıştır.

M. domesticus ise diğer türden çok daha sosyal ve insanlarla kommensal bir tür olduğu için çokça antropojenik etkiye maruz kalmıştır. Buna ek olarak her ne kadar coğrafi bir bariyer olarak düşünülse de, boğazların bu tür için bir engel teşkil etmemesi söz konusudur. Çalışmada, bireylerin oldukça yüksek heterojenitede dağıldıkları gözlemlenmiştir. *M. musculus domesticus*'un GenBank dizisi bu dağılımda,

kendine ayrı bir yer edinmeden Rize – İkizdere, Ardeşen ve Zonguldak örnekleri ile beraber aynı soy hattında yer almışlardır.

5.2 *Mus APOB* Gen Bölgesi Bulgularının Genel Değerlendirmesi

Nükleer bir gen bölgesi olduğu için, kendi bünyesinde mutasyonlara izin vermeyen oldukça fazla genetik tamir mekanizması barındırmaktadır. Bundan dolayı yapılan analizlerde tür ayrımı net şekilde ortaya koyulsa da haplotip dağılımlarında, *COI* gen bölgesine nazaran daha az haplotip sayısı ve çeşitliliği, nükleotid çeşitliliği ve ortalama nükleotid farklılığı gözlemlendi. Beklendiği üzere çok düşük düzeyde polimorfik bölge bulunurken, bunların uğradığı mutasyon sayısı bu bölgelere oranla fazlalık gösterdiği tespit edildi. Yapılan nötralite testleri ile, cinsin Türkiye topraklarında kayda değer bir mutasyon geçirme kapasitesine ve buna bağlı genetik çeşitliliğe sahip olduğu ortaya koyuldu. Nükleotid mutasyon değerleri ise beklenildiği gibi *COI* gen bölgesine kıyasla daha düşük seviyelerdedir. Ayrıca türler arası gen akışının neredeyse tamamen kesildiği, *M. domesticus*'ta çok daha yoğun olmak üzere iki türde de gen akışının devam ettiği tespit edilmiştir.

Filogenetik analizler ile çizilen “Maximum-Likelihood” ve “Maximum-Parsimony” ağaçlarında cins iki türe ayrılmıştır. *M. domesticus* ve *M. macedonicus* için tür içi dağılımda çok farklı coğrafi bölgelerden bireyleri bir arada barındırmaktadır. Ayrıca dağılımda *M. macedonicus* GenBank örneği kendine, yine kendi türünden bireylerin içinde bulunduğu soy hattında yer bulmuştur.

M. macedonicus'un ve *M. domesticus*'un *APOB* gen bölgesinin literatürde herhangi bir çalışmasının bulunmadığı için, bu gen bölgesinin moleküler filogenetik düzeyde karşılaştırılması yapılamamıştır. Ayrıca bu gen bölgesi için *Mus-Rattus* ayrım değerleri bilinmediğinden dolayı Bayesian ağacı çizilememiştir.

5.3 Verilerin *Mus* Cinsinin Filocoğrafyası ile İlişkisi

Bu çalışmanın yapıldığı alanda, *Mus* cinsi Posof'tan (Ardahan) Marmara bölgesini de içine alacak şekilde Bulgaristan hududuna kadar uzanan bir alanda örnekler değerlendirildi. Bu yayılış alanı içinde *Mus* cinsinin evrimini etkileyebilecek çok sayıda coğrafik bariyer mevcuttur. İstanbul ve Çanakkale Boğazları, Marmara Denizi, Sakarya, Kızılırmak, Melet Irmağı ve Çoruh nehri kanyonu günümüzde *Mus* cinsi türlerinin yayılış alanlarında gen akışını kesme potansiyeline sahip coğrafik engellerdir. Bunun dışında *Mus* cinsi türlerine ait popülasyonların birbirlerinden izole olmasını sağlayan hem Marmara Denizi hem de Ege Denizi'nde adalar mevcuttur. Gökçeada, Bozcaada ve Marmara adası önemli adalardır. Bunun dışında *Mus* cinsi türleri hem yoğun dağ oluşumlarının yaşandığı alanda (Karadeniz) hem de Pleyistosen iklim değişikliklerinin etkili olduğu bir bölgede yaşamaktadırlar. *COI* gen bölgesi

dizilerine dayanarak oluşturulan ayrılma zamanı ağacına göre *M. domesticus* ve *M. macedonicus*'un 4.79 Myö birbirlerinden ayrıldığı tahmin edildi. Bu ayrılma zamanı erken-geç Pliyosen dönemine karşılık gelmektedir. Bu dönem hem iklim dalgalanmaları hem de tektonik olayların yaşandığı bir dönemdir. Rudra vd. (2016) mtDNA kontrol bölgesi dizi analizlerine dayanarak *Mus* cinsi içinde biri Asya diğeri de Paleartik olmak üzere iki büyük soy hattının varlığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar *M. domesticus*'u *M. musculus domesticus* olarak ele almışlar ve *M. domesticus* ile *M. macedonicus*'u Paleartik soy hattına dahil etmişlerdir. Araştırmacılar iki soy hattının ayrılma zamanını 5.47 Myö olarak vermişlerdir. Ayrıca, soy hatları içindeki farklılaşmanın ise 4.2-4.4 Myö gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (Chevret vd. 2005). Buna karşın, Rudra vd. (2016) tarafından soy hatları içindeki farklılaşma 4.63-4.7 Myö olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise *Mus* cinsi içindeki ayrılma zamanı 4.79 Myö olarak hesaplandı. Bu ayrılma zamanının hem Chevret vd. (2005) hem de Rudra vd. (2016)'nin bulgularıyla uyum içinde olduğu görüldü. Araştırmacılar *M. macedonicus* grubunun *M. spretus*'tan 2.9 Myö ayrıldığını tahmin etmişlerdir. Bu çalışmada mtDNA *COI* dizilerine dayanarak yapılan analize göre *M. spretus* cinse ait iki türün oluşturduğu soy hattından 3.53 Myö ayrıldığı tahmin edildi. Bu ayrılma zamanı Rudra vd (2016)'ın bulgularından farklılık gösterdiği görüldü. Bu farklılık kullanılan gen bölgelerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Suzuki vd. (2004) hem mtDNA hem de çekirdek DNA dizilerini analiz ederek *Mus macedonicus*, *Mus spicilegus* ve *Mus spretus*'u *Mus musculus musculus* tür grubu içinde toplamışlardır. Araştırmacılar çekirdek DNA dizilerine dayanarak *Mus* cinsinin kökeninin 5.6 Myö, *Mus* alt cinsi içindeki türlerinin orijinini ise 2-3 Myö olarak vermişlerdir. Bu çalışmada ise Türkiye örnekleri için 4.79 Myö olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar mtDNA *Cyt-b* gen bölgesine dayanarak Paleartik grubuna dahil ettikleri *Mus macedonicus*, *M. musculus*, *M. spicilegus*, *M. spretus* türleri arasındaki farklılaşmayı 1.1 Myö olarak vermişlerdir. Bu çalışmada ise daha yüksek değer bulundu.

Chevret vd. (2005) dört alt cinsin (*Mus*, *Pyromys*, *Nannomys* ve *Coelomys*) 7.8 - 6.8 Myö farklılaştığı ve Cerling vd. (1997)'ne atıf yaparak bu yayılmayı da memeli hayvan faunasında büyük değişikliğe yol açan açık alanların genişlemesine bağlamışlardır. Orth vd. (2002) 77 *Mus macedonicus* örneğini mtDNA kontrol bölgesine dayanarak analiz etmişler ve iki ana soy hattı elde etmişlerdir. Araştırmacılar bu soy hatlarına dayanarak *M. macedonicus* için biri Karadeniz bölgesi diğeri de Kafkasya'nın güneyinde olmak üzere iki farklı sığınığın varlığını ileri sürmüşlerdir. Birçok araştırmacı da Pleyistosen süresince yaşanan iklim değişiklikleri (buzul dönemleri) sonucu Karadeniz bölgesindeki sığınaklara sığınan bazı popülasyonların farklı birer genetik soy hattına farklılaştığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada *M. macedonicus* içinde 0.88 Myö ayrılan biri Anadolu diğeri de Gökçeada örneklerini içine alan Trakya olmak üzere iki soy hattı tespit edildi. Bu iki soy hattının ayrılma zamanı iklimde soğumanın görüldüğü orta-Pleyistosen'e karşılık gelmektedir. Bu da Orth vd. (2002)'de olduğu gibi *M. macedonicus* için Karadeniz buzul sığınığını desteklemektedir. Yapılan analizler *M. macedonicus*'un Karadeniz'de

batıdan doğuya doğru Efirli'ye (Ordu) kadar yayılış gösterdiğini ortaya koydu. Bu da *M. macedonicus* için bir tanesi Trakya diğeri de batı Karadeniz buzul sığınağını işaret etmektedir. Yapılan analizlerde *M. domesticus*'un bir tane Posof (Ardahan) örneğinin 1.73 Myö türün geri kalanından ayrıldığı görüldü. Bu ayrılma zamanının Pleyistosen dönemine karşılık geldiği görüldü. Türün geri kalanı için ise Karadenizde Pleyistosen iklim dalgalanmaları tarafından etkilenmediği görüldü. Macholán vd. (2007) mtDNA kontrol bölgesi dizi analizine dayanarak *M. macedonicus*'un İsrail'den tanımlanan *M. macedonicus speltoides* alttürünün geçerliliğini teyit ederek *M. macedonicus macedonicus*'un Avrupa ve Asya populasyonları arasında genetik bir farklılığın olmadığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacıların aksine bu çalışmada mtDNA COI gen bölgesi dizi analizine dayanarak iki farklı soy hattının varlığı ortaya konmuştur. Macholán vd. (2007) *M. macedonicus*'un Akdeniz-Karadeniz bağlantısının olmadığı zaman Karadeniz'in güney kıyısı boyunca ilerleyerek Avrupa'ya yerleştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada mtDNA COI gen bölgesi dizi analizleri ise Macholán vd. (2007)'nin aksine *M. macedonicus*'un Karadeniz boyunca bir yayılış yolunun olmadığı İç Anadolu boyunca hem Karadeniz'e (Efirli'ye kadar) hem de Avrupa'ya bir genişlemenin olabileceği söylenebilir. Gündüz vd. (2005) mtDNA kontrol bölgesi dizi analizlerine dayanarak *M. m. domesticus*'un batıya yayılmasının Anadolu'dan olmasının muhtemel olduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde Rajabi-Maham vd. (2008) mtDNA kontrol bölgesi dizi analizine dayanarak *M. m. domesticus* için Avrupa'ya genişlemeyi Akdeniz ve Karadeniz/İstanbul boğazı olmak üzere iki yayılış rotası tespit etmişlerdir. En eski *Mus* fosili Asya'da (Pakistan) bulunmuş ve 5.7 Myö yaşındadır. Bu da *Mus* için Anadolu'dan Avrupa'ya yayılış yolunu desteklemektedir. Sağlam vd. (2014) *Phonochorion* ve Kankılıç vd. (2018) Çoruh kanyonunun *D. nitedula*'yı doğu-batı populasyonları olarak ayırdığını ortaya koymuşlardır. Karadeniz bölgesinde yer alan populasyonları doğu-batı yönünde izole eden ve Karadeniz'e akan bazı akarsuların (Kızılırmak, Melet Çayı ve Çoruh Nehri) *Glis glis* (Helvacı vd. 2012), *Myodes glareolus* (Çolak vd. 2015), *Phonochorion* (Sağlam vd. 2014) ve *D. nitedula* (Kankılıç vd. 2018) populasyonlarının farklılaşmasına katkı sağladığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde hem *M. domesticus* hem de *M. macedonicus* için mevcut coğrafik engellerin farklılaşmaya yol açmadığı görüldü.

5.3.1 Gökçeada, Bozcaada ve Marmara Adası'nın etkisi

Bu çalışmada Bozcaada ve Marmara Adası'nda *M. domesticus*, Gökçeada'da da *M. macedonicus* kaydedildi.

Yüz ölçümü 285.5 km² olan Gökçeada Ege Denizi'nin kuzeyinde yer almaktadır. Gökçeada Gelibolu Yarım Adası'na 13 km uzaklıktadır. Yapılan arazi çalışmasında Gökçeada'dan *M. macedonicus*'a ait örnekler elde edildi. *M. macedonicus*'un hem Anadolu'da hem de Trakya'da yayılış gösterdiği tespit edildi. Gökçeada'da yaşayan *M. macedonicus*'un adaya hangi rota üzerinden ve nasıl taşındığını

belirlemek önemlidir. İki gen bölgesinden (çekirdek *APOB* ve mtDNA *COI*) elde edilen diziler kullanılarak genetik ilişkileri ortaya koyan ilişki ağaçları çizildi. Filogenetik ağaçlardan mtDNA *COI* MP ağacında Gökçeada, Trakya örnekleriyle beraber ayrı bir dal olarak ayrıldı. İstisna olarak Hacıyakup (Düzce), Maşukiye (Kocaeli) ve Bandırma'dan (Balıkesir) birer haplotip bu dalda yer aldı. Anadolu'dan haplotiplerin adada bulunması Anadolu'dan adaya gen girişlerinin olduğu şeklinde yorumlanabilir. Çekirdek *APOB* gen bölgesine göre herhangi bir farklılaşma görülmedi. Bunun sebebi çekirdek genlerinin daha geç evrimleşmesinden kaynaklanmış olabilir. *COI* gen bölgesi dizilerine dayanarak ayrılma zamanları tahmin edildi. Buna göre tespit edilen iki soy hattı arasındaki ayrılma zamanı 0.88 Myl olarak tahmin edildi. Bu ayrılma zamanı orta-Pleyistosen'e karşılık gelmektedir. Pleyistosen döneminde iklim dalgalanmalarına bağlı olarak birçok buzul dönemi yaşanmıştır. Bu da biri Anadolu'da diğeri de Trakya'da iki muhtemel buzul sığınağının varlığını işaret etmektedir.

Ünverdi (2016) *M. macedonicus*'a ait örnekler üzerinde yaptığı mt DNA *Cyt-b* ve mtDNA kontrol bölgesi analizlerinde Gökçeada örneklerinin farklı bir soy hattı olarak ayrıldığı, mtDNA *Cyt-b* gen bölgesine göre hem Anadolu hem de Trakya ile filogenetik yakınlık gösterirken, mtDNA kontrol bölgesine göre Trakya ile aynı dalda yer aldığını ortaya koymuştur. MtDNA kontrol bölgesi bulgularının bu proje çalışması ile yapılan mtDNA *COI* gen bölgesi analizi ile uyum içinde olduğu görüldü. Ünverdi (2016) mtDNA *Cyt-b* gen bölgesine dayanarak yapmış olduğu ayrılma zamanı analizinde *M. domesticus*'un Gökçeada örneklerinin yer aldığı soy hattının türün geri kalanından yaklaşık 0.091 Myö farklılaştığını ortaya koymuştur. Ünverdi (2016) *M. macedonicus*'un adaya insan yerleşiminden önce gelmiş olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada da *M. macedonicus*'un adaya insan yerleşiminin olmadığı zaman ulaştığı bulgusunu (Ünverdi 2016) desteklemektedir.

Özkan ve Kryštufek (1999) Gökçeada *Apodemus*'larının Trakya *Apodemus*'larına benzer olduğunu ortaya koymuşlardır. Selvi (2019), Gökçeada *A. sylvaticus*'un Trakya soy hattı içinde yer aldığını ortaya koymuştur. Jeolojik olarak Gökçeada'nın Trakya'ya bağlı olması (Koral vd. 2009, Avcıoğlu vd. 2016), Özkan ve Kryštufek (1999), Ünverdi (2016), Selvi (2019) ve bu çalışmada elde edilen sonuçları desteklediği görüldü. Pleyistosen süresince, gerek Ege gerekse Marmara denizinde deniz su seviyesindeki düşüşler (Perissoratis ve Conispoliatis 2003, Canals vd. 2009, Papoulia 2017) sonucunda oluşan kara köprüleriyle *M. macedonicus*'un adaya ulaşmış olabileceği söylenebilir. Selvi (2019) tarafından belirtildiği gibi bu çalışmada da Gökçeada'nın izole bir ada olmadığı görüldü. Benzer şekilde Şeker vd. (2017) Gökçeada'ya ait *M. macedonicus*, *A. sylvaticus* ve *R. rattus* üzerinde yaptıkları karyolojik çalışmada ana kara ile ada arasında karyolojik bir farkın olmadığını tespit etmişlerdir.

Bozcaada Ege Denizi'nde Marmara Adası ise Marmara Denizi'nde yer almaktadır. Bu iki adada da *M. domesticus* yayılış göstermektedir. Analiz edilen iki gen bölgesi bakımından hem Bozcaada hem de

Marmara Adası'nın *M. domesticus*'un farklılaşması üzerinde etkili olmadığı görüldü. Ünverdi (2016)'de olduğu gibi her iki adaya da hem Anadolu'dan hem de Trakya'dan *M. domesticus* girişlerinin olduğu görüldü. Bozcaada'da üç örneğin 0.177 Myö türün geri kalanından ayrıldığı tahmin edildi. Selvi (2019) mtDNA *Cyt-b* ve mtDNA kontrol bölgesi dizi analizine dayanarak hem *A. witherbyi*'nin Bozcaada örneklerinin hem de *A. sylvaticus*'un Marmara Adası örneklerinin Trakya soy hattı içinde yer aldığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada Karadeniz, Marmara bölgeleri ve Trakya'da yayılış gösteren *Mus* cinsi iki gen bölgesine göre analiz edildi. Bütün çalışma alanında *M. domesticus* ve *M. macedonicus*'un yayılış gösterdiği tespit edildi. Bu iki türden *M. domesticus*'un çalışma alanının tümünde yayılış gösterirken, *M. macedonicus*'un ise batıdan Efirli'ye (Ordu) kadar yayılış gösterdiği görüldü. Gökçeada'da *M. macedonicus*'un Bozcaada ve Marmara Adasında ise *M. domesticus*'un yayılış gösterdiği ortaya koyuldu. Adalardaki kolonizasyonun insan yerleşiminden önce gerçekleştiği tahmin edildi.

5.4 Öneriler

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda Anadolu'yu kapsayacak şekilde toplanacak örnekler ve daha fazla gen bölgesi dizileri kullanılarak, adalar kolonizasyonunun araştırılması önemli görülmektedir.

Ayrıca, Posof soy hattının kesin sınırlarının tespiti için daha geniş alanlardan toplanacak örnekler analiz edilebilir.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkıları

Bu proje çalışmasında Trakya, Gökçeada, Bozcaada, Marmara Adası ve Karadeniz bölgesinden toplanan örnekler genetik olarak analiz edilmiştir. Elde edilen genetik analiz sonucunda *Mus* cinsine ait iki türün araştırma alanında yayılış gösterdiği ortaya konmuştur. Filogenetik ve filocoğrafik açıdan her iki gen bölgesi bakımından adaların hem Anadolu hem de Trakya ile ilişki içinde olduğu görülmüştür. Bu da adaların hem Trakya hem de Anadolu'dan gen akışı ile etkilendiğini göstermektedir. CO1 gen bölgesine göre *Mus domesticus* ve *M. macedonicus*'un Trakya ve Anadolu popülasyonları arasında belirgin farklılıkların olduğu tespit edildi. Karadeniz bölgesinde ise iki türün yayılış gösterdiği ve *M. macedonicus*'un Ordu'da popülasyonu tespit edildi. Ayrıca Posof'tan (Ardahan) alınan bir örneğin genetik olarak her iki türden tür seviyesinde farklı olduğu görülmüştür.

Bu proje çalışması sonucunda gelecekte yapılacak çalışmalar için aşağıdaki öneriler sunulabilir;

1. *Mus macedonicus*'un Anadolu'dan Ordu'ya genişlerken hangi yayılma yolunu kullandığı, bu yayılma örgüsüne jeolojik, tektonik ve iklim değişikliklerinin etkisinin belirlenmesi,
2. Hem morfolojik özellikleri incelenerek hem de yeni gen bölgeleri ile analiz edilerek Posof'tan daha fazla örnek incelenerek Posof popülasyonunun taksonomik durumunun araştırılması,
3. Bilindiği üzere adalarda Anadolu ve Trakya'dan göç eden insanlar yaşamaktadır. Bu insanların daha önce yaşadıkları yerlerde *Mus* örnekleri incelenerek insan aracılığı ile ada popülasyonlarının kökenlerinin araştırılması,
4. Pleyistosen döneminde hüküm süren buzul çağlarında deniz seviyesinde yaşanan alçalmaların Anadolu ve Trakya'dan gen akışının nasıl etkilendiğinin araştırılması,
5. Anadolu son dönemde tespit edilen fosil kayıtları ile popülasyonların ayrılma zamanlarının karşılaştırılması,
6. Anadolu, Avrupa ile Asya arasında geçiş bölgesidir. Anadolu'da yaşayan cinse ait türlerin kökeninin belirlenmesi için bütün toplanacak örneklerin genetik olarak analiz edilmesi ve analiz sonucu elde edilen verilerin bölgenin geçirmiş olduğu jeolojik, tektonik iklimsel değişikliklerin etkilerinin karşılaştırılması ve filocoğrafyasının detaylı bir şekilde ortaya konması,

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

IX. Kaynaklar

- Alibert, P., Renaud, S., Dod, B., Bonhomme, F., Auffray, J. C. 1994. Fluctuating asymmetry in the *Mus musculus* hybrid zone: a heterotic effect in disrupted co-adapted genomes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 258(1351), 53-59.
- Amrine-Madsen, H., Koepfli, K. P., Wayne, R. K., Springer, M. S. 2003. A new phylogenetic marker, apolipoprotein B, provides compelling evidence for eutherian relationships. *Molecular phylogenetics and evolution*, 28(2), 225-240.
- Auffray, J. C., Vanlerberghe, F., Britton-Davidian, J. 1990. The house mouse progression in Eurasia: a palaeontological and archaeozoological approach. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41.1-3: 13-25.

- Avcıoğlu, M., Yiđitbař, E., Erginal, A. E. 2016. Beachrock formation on the coast of Gökçeada Island and its relation to the active tectonics of the region, northern Aegean Sea, Turkey. *Quaternary international*, 401, 141-152.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Bonhomme, F., Miyashita, N., Boursot, P., Catalan, J., Moriwaki, K. 1989. Genetical variation and polyphyletic origin in Japanese *Mus musculus*. *Heredity*, 63(3), 299.
- Boursot, P., Din, W., Anand, R., Darviche, D., Dod, B., Von Deimling, F., Talwar, G. P., Bonhomme, F. 1996. Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA phylogeny. *Journal of Evolutionary Biology*, 9: 391-415.
- Canals, M., Danovaro R., Heussner S., Lykousis V., Puig P., Trincardi F., Calafat A. M., Durrieu De Madron X., Palanques A., Sánchez-Vidal A. 2009. Cascades in Mediterranean submarine grand canyons. *Oceanography*, 22(1), 26-43.
- Cerling, T. E., Harris, J. M., MacFadden, B. J., Leakey, M. G., Quade, J., Eisenmann, V., Ehleringer, J. R. 1997. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature*, 389(6647), 153.
- Chevret, P., Veyrunes, F., Britton-Davidian, J. 2005. Molecular phylogeny of the genus *Mus* (Rodentia: Murinae) based on mitochondrial and nuclear data. *Biol. J. Linn. Soc.* 84, 417-427.
- Cucchi, T., Vigne, J. D., Auffray, J. C. 2005. First occurrence of the house mouse (*Mus musculus domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943) in the Western Mediterranean: a zooarchaeological revision of subfossil occurrences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(3), 429-445.
- Çolak, E., Yiğit, N., ve Sözen, M., 2002. Türkiye'deki *Mus* L., 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsinin Taksonomik Durumu ve Karyolojik Özellikleri. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi (BAP-96050306), Ankara, 59 sayfa.
- Çolak, E., Yiğit, N., Sözen, M., Çolak, R., Özkurt, ř., Kankılıç, T., Kankiliç, T. 2006. The morphological analysis of *Mus domesticus* and *Mus macedonicus* (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 30(3), 309-317.
- Çolak, R., Karacan, G. O., Kandemir, I., Çolak, E., Kankiliç, T., Yiğit, N. ve Michaux, J. 2015. Genetic variations of Turkish bank vole, *Myodes glareolus* (Mammalia: Rodentia) inferred from mtDNA. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(6); 4372-4379.
- Demeke, T., Adams, F. P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques*, 12: 332-335.
- Dieffenbach, C. W., Lowe T. M. J., Dveksler G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, 530-537.
- Doyle, J. 1991. DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Ellerman, J. R., Morrison-Scott, T. C. S. 1951. Checklist of Palaearctic and Indian mammals, 1758-1946. Printed by order of the Trustees of the British Museum.
- Erlich H. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. 1991. Recent advances in polymerase chain reaction. *Science*, 252:1643-1650.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Gözcüoğlu, B., Çolak, R., Çolak, E., Yiğit, N. 2005. A Study on *Mus domesticus* Rutt, 1772 and *Mus macedonicus* Petrov and Ruzic, 1983 (Mammalia: Rodentia) Distributed along the Line of Ankara, Bolu and Zonguldak. *Tr. J. of Zoology*, 29, 133-140.
- Gündüz, İ., Rambau, R. V., Tez, C., Searle, J. B. 2005. Mitochondrial DNA variation in the western house mouse (*Mus musculus domesticus*) close to its site of origin: studies in Turkey. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(3), 473-485.
- Gündüz, İ., Tez, C., Malikov, V., Vaziri, A., Polyakov, A. V., Searle, J. B. 2000. Mitochondrial DNA and chromosomal studies of wild mice (*Mus*) from Turkey and Iran. *Heredity*, 84(4), 458.
- Hadidi, A., Levy, L., Podleskis, E. V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp.167-187. Eds. R. P. Singh, U. S. Singh. Boca Raton: CRS Press.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*, 41, 95-98.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T. A. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22(2), 160-174.
- Helvacı, Z., Renaud, S., Ledevin, R., Adriaens, D., Michaux, J., Çolak, R., Kankılıç, T., Kandemir, İ., Yiğit, N., Çolak, E. 2012. Morphometric and genetic structure of the edible dormouse (*Glis glis*): a consequence of forest fragmentation in Turkey. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107(3), 611-623.
- Henson J. M., Frech, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31:81-109.
- Innis, M. A., Gelfand., D. H. 1990. Optimization of PCRs In Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J (eds.). *PCR protocols A guide to methods and applications*. Academic Press.3-12.
- Jiang, Z., Priat, C., Galibert, F. 1998. Traced orthologous amplified sequence tags (TOASTs) and mammalian comparative maps. *Mammalian Genome*, 9(7), 577-587.
- Jones, E. P., Jóhannesdóttir, F., Gündüz, I., Richards, M. B., Searle, J.B. 2011. The expansion of the house mouse into north-western Europe. *Journal of Zoology* 283, 257–268.
- Kankılıç, T., Şeker, P. S., Erdik, A. C., Kankılıç, T., Selvi, E., Yiğit, N., Çolak, E. 2018. Determination of genetic variations in the genus *Dryomys* Thomas, 1906 (Rodentia: Gliridae) distributed in Turkey using NADH dehydrogenase 1 (ND1) gene. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(6), 933-942.

- Koral, H., Öztürk, H., Hanilçi, N. 2009. Tectonically induced coastal uplift mechanism of Gökçeada Island, northern Aegean Sea, Turkey. *Quaternary International*, 197(1-2), 43-54.
- Kryštufek, B., Macholán, M. 1998. Morphological differentiation in *Mus spicilegus* and the taxonomic status of mound-building mice from the Adriatic coast of Yugoslavia. *Journal of Zoology*, 245(2), 185-196.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kwok S., Chang, S. Y., Sninsky, J. J., Wang, A. 1994. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications*, 539-547.
- Librado, P. ve Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Macholán, M., Vyskocilova, M., Bonhomme, F., Kryštufek, B., Orth, A. 2007. Genetic variation and phylogeography of free-living Mouse species (genus *Mus*) in the Balkans and the Middle East. *Molecular Ecology*, 16: 4774-4788.
- Macholán, M., Mikulaa, O., Vohralík, V. 2008. Geographic phenetic variation of two eastern-Mediterranean non-commensal mouse species, *Mus macedonicus* and *M. cypriacus* (Rodentia: Muridae) based on traditional and geometric approaches to morphometrics. *Zoologischer Anzeiger* 247: 67-80.
- Nachman, M.W., Boyer, S.N., Searle, J.B. and Aquadro, C.F. 1994. Mitochondrial DNA variation and the evolution of Robertsonian chromosomal races of house mice, *Mus domesticus*. *Genetics*, 136(3); 1105-1120.
- Orth, A., Auffray, J. C., Bonhomme, F. 2002. Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse *Mus macedonicus* reveal multiple glacial refuges south of Caucasus. *Heredity* 89: 353-357.
- Özkan, B. 1999. Rodent fauna of Imbros and Tenedos (Mammalia: Rodentia). *Turkish Journal of Zoology*, 23(EK1), 133-148.
- Özkan, B., Kryštufek, B. 1999. Wood mice, *Apodemus* of two Turkish islands: Gökçeada and Bozcaada. *Folia Zoologica*, 48(1), 17-24.
- Papoulia, C. 2017. Seaward dispersals to the NE Mediterranean islands in the Pleistocene. The lithic evidence in retrospect. *Quaternary International*, 431, 64-87.
- Perissoratis, C., Conispoliatis, N. 2003. The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). *Marine Geology*, 196(3-4), 145-156.
- Polzin T, Daneschmand S. V. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31:12-20.

- Prager, E. M., Orrego, C., Sage, R. D. 1998. Genetic variation and phylogeography of central Asian and other house mice, including a major new mitochondrial lineage in Yemen. *Genetics*, 150(2), 835-861.
- Prager, E. M., Tichy, H., Sage, R. D. 1996. Mitochondrial DNA sequence variation in the eastern house mouse, *Mus musculus*: comparison with other house mice and report of a 75-bp tandem repeat. *Genetics*, 143(1), 427-446.
- Rajabi-Maham, H., Orth, A., Bonhomme, F. 2008. Phylogeography and postglacial expansion of *Mus musculus domesticus* inferred from mitochondrial DNA coalescent, from Iran to Europe. *Molecular Ecology*, 17, 627–64.
- Rudra, M., Chatterjee, B., Bahadur, M. 2016. Phylogenetic relationship and time of divergence of *Mus terricolor* with reference to other *Mus* species. *Journal of genetics*, 95(2), 399-409.
- Sağlam, İ. K., Küçük yıldırım, S., Çağlar, S. S. 2014. Diversification of montane species via elevation shifts: the case of the K açkar cricket *P honochorion* (Orthoptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52(3), 177-189.
- Schwarz, E., Schwarz, H. K. 1943. The wild and commensal stock of the house mouse, *Mus musculus* Linnaeus. *J. Mamm.*, 24: 59-72.
- Selvi, E. 2019. Kuzey Anadolu ve Trakya'daki *Apodemus* Kaup, 1829 (Mammalia: Rodentia) Cinsine Ait Türleri Mitokondriyal DNA (Sitokrom *b* ve Kontrol Bölgesi) Analizi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Slabova, M., Frynta, D. 2007. Morphometric variation in nearly unstudied populations of the most studied mammal: The non-commensal house mouse (*Mus musculus domesticus*) in the Near East and Northern Africa. *Zoologischer Anzeiger* 246: 91–101
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., Rambaut, A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 *Virus Evolution* 4, vey016. DOI:10.1093/ve/vey016
- Suzuki, H., Shimada, T., Terashima, M., Tsuchiya, K., Aplin, K. 2004. Temporal, spatial, and ecological modes of evolution of Eurasian *Mus* based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 626–646.
- Şeker, P. S., Selvi, E., Çolak, E. 2017. Karyological and distributional contributions to Turkish rodent fauna (Mammalia: Rodentia) from islands in Aegean and Marmara Sea. *Artvin Coruh University Journal of Forestry Faculty* 18, (1):28-35.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular biology and evolution*, 9(4), 678-687.
- Tamura, K., Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.

Tamura, K. 1994. Model selection in the estimation of the number of nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 11(1), 154-157.

Ünverdi, A. 2016. Marmara bölgesi'nde yayılış gösteren *Mus l.*, 1758 (Mammalia: Rodentia) cinsinin mitokondriyal dna (sitokrom b ve kontrol bölgesi) varyasyonları. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.

Vinogradov, B. S., Argyropulo, A. I. 1941. Fauna of the USSR. Mammals, Key to the rodents. Leningrad pub.

Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5), 294-9.

Wilson, D. E., Reeder, D. M. 2005. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference JHU Press.

Yang, X., Hadidi, A., Garnsey, S. M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82: 279.

Yiğit, N., Çolak, E., ve Karataş, A. 2006. Rodents of Türkiye: Türkiye Kemiricileri. Meteksan Company, Ankara.

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bütçe Yılı	Detaylar													
Bütçe Kodu	Açıklama	Önceki Yıldan Devir	Başlangıç Odeneği	Eklene Aktarma	Düşülen Aktarma	Eklene Odenek	Düşülen Odenek	Net Odenek	Harcanan (Mahsup)	Harcanan (Diğer)	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan	
2019	03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	0,00	6.150,00	0,00	0,00	0,00	6.150,00	0,00	6.057,00	0,00	0,00	93,00	
	03.5	HİZMET ALIMLARI	0,00	8.850,00	0,00	0,00	0,00	8.850,00	0,00	8.850,00	0,00	0,00	0,00	
		Toplam	0,00	15.000,00	0,00	0,00	0,00	15.000,00	0,00	14.907,00	0,00	0,00	93,00	
2020	03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	93,00	0,00	0,00	0,00	0,00	93,00	0,00	0,00	0,00	0,00	93,00	
		Toplam	93,00	0,00	0,00	0,00	0,00	93,00	0,00	0,00	0,00	0,00	93,00	

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)**

Şenkuş MC, Selvi E, Çolak R, 2019. Marmara Bölgesi ve Kuzey Anadolu'da Yayılış Gösteren *Mus Linnaeus*, 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsi Türlerinde Mitokondriyal DNA Sitokrom Oksidaz Alt Ünitesi 1 (CO1) Gen Bölgesinin Analizi, EuroasianBioChem 2019, Ankara, Sözlü Sunum.

- e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (**Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz**)

Mahir Can ŞENKUŞ “Marmara Bölgesi ve Kuzey Anadolu'da Yayılış Gösteren *Mus* Linnaeus, 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsi Türlerinde Mitokondriyal DNA Sitokrom Oksidaz Alt Ünitesi 1 (CO1) ve Nükleer DNA Apolipoprotein B (APOB) Gen Bölgelerinin Analizi” 2019 Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

