

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRAKYA VE KARADENİZ BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN  
*Mus* (Linnaeus, 1758) (Mammalia: Rodentia)  
CİNSİNİN RAPD-PCR ANALİZİ

Serra ANGIN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2011

Her Hakkı Saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TRAKYA VE KARADENİZ BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN *Mus* (Linnaeus, 1758) (Mammalia: Rodentia) CİNSİNİN RAPD-PCR ANALİZİ

Serra ANGIN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

Bu çalışmanın amacı Trakya ve Karadeniz’ de yayılış gösteren *Mus* türlerini ve bu türlerin farklı populasyonları arasındaki genetik farklılaşmayı RAPD-PCR analizi ile ortaya koymaktır. Türkiye’nin farklı 16 lokasyonundan toplam 90 örnekle çalışıldı. Çalışılan 64 primer içinde iyi sonuç vermiş olan 18 primer ile 230 polimorfik bant elde edildi. *Mus* türleri içinde; *Mus domesticus* için 7, *Mus macedonicus* için 8 ve *Mus* cinsi için de 3 spesifik RAPD belirteçleri belirlendi. Çalışılan örnekler arasında tür teşhisi yapılmamış *Mus* örneklerinin RAPD-PCR analiziyle hangi türe ait olduğu belirlendi. Çalışılan örnekler arasındaki genetik ilişkileri göstermek için Nei’ nin genetik mesafe ve genetik benzerlik hesaplamaları kullanıldı. Hesaplamalar POPGENE programıyla yapılmıştır. Alt populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü (GST) değeri; *Mus macedonicus* populasyonları için 0.7655 iken, *Mus domesticus* populasyonları için 0.6450 olduğu belirlenmiştir. Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramı *Mus* örneklerini 2 gruba ayırmıştır. Bu gruplardan biri *Mus macedonicus* diğeri ise *Mus domesticus* örneklerini içermektedir. Sonuç olarak *Mus* cinsini dış gruplardan ve *Mus* türlerini birbirinden ayıran tanımlayıcı RAPD bantları elde edildi.

**Temmuz 2011, 94 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** RAPD-PCR, *Mus*, genetik farklılaşma, Türkiye

## ABSTRACT

Master Thesis

RAPD-PCR ANALYSIS OF THE GENUS *Mus* (Linnaeus, 1758)  
(Mammalia: Rodentia) IN THRACE AND BLACK SEA REGION

Serra ANGIN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK

The aim of this study is to expose genetic differentiation between *Mus* species and different population of these which are distributed in Thrace and and Black Sea, using RAPD-PCR analysis. 90 samples were studied from 16 locations in Turkey. The studied 18 RAPD marker out of 64 give consistent results and yielded 230 polymorphic bands. Within *Mus* species; 7 for *Mus domesticus*, 8 for *Mus macedonicus* and 3 for *Mus* genus were diagnostic RAPD primers. Among the studied samples unidentified *Mus* samples were determined to belong to which species by RAPD-PCR analyse. In order to show the genetic relation between the studied samples, genetic distance and similarity calculations of Nei were used. These calculations were done by using POPGENE software program. The relative magnitude of genetic differentiation between sub-populations (GST) value; 0.7655 for *Mus macedonicus* populations and 0.6450 for *Mus domesticus* populations were determinated. The UPGMA dendrogram constructed based on genetic distance data was separated into two groups for *Mus* samples. First group included *Mus macedonicus* and second group included *Mus domesticus* samples. In conclusion, diagnostic RAPD bands were obtained separating *Mus* genus from out groups and *Mus* species with each other.

**July 2011, 94 pages**

**Key Words:** RAPD-PCR, *Mus*, genetic differentiation, Turkey

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımnda, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaőan daima bana destek olan danıőmanım, değerli hocam Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü), örneklerin temin edilmesini sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ercüment ÇOLAK'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü) ve Prof. Dr. Nuri YİĞİT'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü), laboratuvar çalıőmalarımnda ve istatistik analizlerinde bana her zaman yardımcı olan Araő. Gör. Gül OLGUN KARACAN'a (Aksaray Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü), spektrofotometre ve jel görüntüleme sistemlerini benimle paylaőan Prokaryot Genetięi Laboratuvar'ından sorumlu Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü) ve laboratuvarda çalışan arkadaşlarıma, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve hiçbir fedakarlığı esirgemeyen her adımda yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Serra ANGIN

Ankara, Temmuz 2011

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Rodentia .....	6
2.2 Muridae .....	7
2.3 Mus Linnaeus, 1758 .....	8
2.3.1 <i>Mus macedonicus</i> Petrov & Ruzic, 1982 .....	11
2.3.2 <i>Mus domesticus</i> Schwarz & Schwarz, 1943 .....	12
2.3.3 <i>Mus spretus</i> Lataste,1883 .....	13
2.3.4 <i>Mus spicilegus</i> Petényi, 1882 .....	13
2.3.5 <i>Mus musculus</i> Linnaeus, 1758.....	14
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	17
2.5 PCR Basamakları .....	18
2.5.1 DNA zincirinin açılması (Denatürasyon) .....	18
2.5.2 Bağlanma (Annealing) .....	18
2.5.3 Uzama (Extension) .....	19
2.6 PCR Optimizasyonu .....	20
2.7 PCR Çalışma Şartlarını Etkileyen Faktörler .....	20
2.7.1 Enzimler ve konsantrasyonları.....	20
2.7.1.1 <i>Taq</i> DNA polimeraz ... ..	21
2.7.1.2 Magnezyum konsantrasyonu .....	21
2.7.1.3 dNTP konsantrasyonu .....	22
2.7.2 Diğer reaksiyon unsurları .....	22
2.7.2.1 DNA zincirinin açılması için gerekli zaman ve sıcaklık .....	22
2.7.2.2 Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması .....	23

2.7.2.3 Primer uzunluğu, konsantrasyonu ve yapısı .....	23
2.7.2.4 Primer uzaması.....	24
2.7.2.5 Devir sayısı.....	24
2.8 PCR Çeşitleri .....	24
2.8.1 Çoğaltılması istenen DNA dizisinin bilindiği durumlarda kullanılan PCR metotları.....	25
2.8.1.1 Standart PCR (Standart PCR) .....	25
2.8.1.2 Ters transkriptaz PCR (RT-PCR) .....	25
2.8.1.3 Katlı PCR (Multiplex PCR) .....	25
2.8.1.4 Antiserumla sabitleme PCR (Immunocapture PCR) .....	26
2.8.1.5 İç içe PCR (Nested PCR) .....	26
2.8.1.6 Renkli PCR (Colorimetric PCR) .....	26
2.8.1.7 Damlatma PCR (Spot PCR) .....	27
2.8.1.8. Kademeli sıcaklık düşürme PCR (Touchdown PCR) .....	27
2.8.1.9 Canlı hücre belirleyen PCR (Bio PCR) .....	27
2.8.2 Çoğaltılması istenen DNA dizilerinin bilinmediği durumlarda kullanılan PCR metotları.....	28
2.8.2.1 RAPD-PCR .....	28
2.8.2.2 Ters PCR (Inverse-PCR) .....	28
2.8.2.3 Kanca PCR (Anchored PCR) .....	28
2.8.2.4 Asimetrik PCR .....	29
2.8.3 PCR'ın diğer tekniklerle birlikte kullanıldığı metotlar.....	29
2.8.3.1 Çoğaltılan fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (AFLP).....	29
2.8.3.2 PCR ürününün enzimle kesilmesi (PCR-RFLP).....	29
2.8.3.3 Çoğaltılmış DNA dizilerinin enzimle kesilmesi (CAPS) .....	30
2.8.3.4 RAPD bantlarının spesifik primere dönüştürülmesi (SCAR) .....	30
2.9 PCR Kullanım Alanları .....	30
2.10 PCR'ın Avantajları .....	31
2.11 PCR'ın Dezavantajları.....	31
2.12 RAPD-PCR .....	31
2.12.1 RAPD tekniğinin değişkenleri.....	34
2.12.2 RAPD tekniğinin avantaj ve dezavantajları.....	34

2.12.3 RAPD tekniğinin uygulama alanları.....	35
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>37</b>
3.1 Materyal .....	37
3.2 Yöntem .....	41
3.3 DNA İzolasyonu.....	41
3.3.1 İzolasyonda kullanılan çözeltiler .....	42
3.4 DNA Miktarının Belirlenmesi .....	43
3.5 RAPD Primerleri .....	46
3.6 RAPD-PCR .....	47
3.7 Agaroz Jel Elektroforezi .....	48
3.8 Jellerin Yorumlanması .....	48
3.9 Veri Analizleri .....	49
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>50</b>
4.1 İstatistik Analizi Sonuçları.....	72
<b>5.TARTIŞMA .....</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>83</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>94</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AFLP	Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi
bç	Baz Çifti
βME	β-Merkapto etanol
C	Sitozin
C: IAA	Kloroform: İzomil Alkol
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromid
D	Nei'nin Genetik Mesafe Değeri (1972)
dATP	Deoksiadenintrifosfat
dCTP	Deoksisitozintrifosfat
dGTP	Deoksiguanintrifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
dTTP	Deoksitimintrifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzim İlintili İmmün Test
G <sub>ST</sub>	Alt Populasyonlar Arasındaki Genetik Farklılaşmanın Nisbi Büyüklüğü
G	Guanin
H	Nei'nin Genetik Çeşitliliği (1987)
HCl	Hidroklorik Asit
H <sub>2</sub> O	Su
H <sub>S</sub>	Populasyondaki Bir Bireyin Beklenen Heterozigotluğu
H <sub>T</sub>	Tüm Populasyonda Bir Bireyin Beklenen Heterozigotluğu
I	Shanon İnförmasiyon İndeksi
Idh-1	İzositrat Dehidrogenaz
KCl	Potasyum Klorür
Mg	Magnezyum
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür

M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mtDNA	Mitokondrial Deoksiribonükleik Asit
Na	Her Örnek İçin Gözlenen Allel Sayısı
NaCl	Sodyum Klorür
Ne	Etkili Allel Sayısı
Nm	Gen Akışı
NOR	Nukleolus Organizatör Bölge
OPA	Operon A
OPB	Operon B
OPD	Operon D
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Pikomol
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
Rb	Robertsonian metasentrik kromozom
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Dakikadaki Dönüş Hız Birimi
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Ters Transkriptaz PCR
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
T	Timin
Tm	Yapışma sıcaklığı
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UV	Ultra viyole
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
WART	Tüm Kolun Karşılıklı Translokasyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Mus macedonicus</i> 'un dorsal görünüşü.....	12
Şekil 2.2 <i>Mus domesticus</i> 'un dorsal görünüşü .....	13
Şekil 2.3 DNA Zincirinin Açılması .....	18
Şekil 2.4 Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Bağlanması .....	19
Şekil 2.5 Primerlerin Uzaması .....	19
Şekil 3.1 Türkiye' den <i>Mus</i> , <i>Apodemus</i> ve <i>Arvicola terrestris</i> örneklerinin toplandığı bölgeler. ....	41
Şekil 4.1 Çalışılan <i>Mus</i> örneklerinin bir bölümünün total DNA'larının agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	50
Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-01 (5'- CAGGCCCTTC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	52
Şekil 4.3 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-03(5'-AGTCAGCCAC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	53
Şekil 4.4 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-08 (5'-GTGACGTAGG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	54
Şekil 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-09 (5'-GGGTAACGCC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	55
Şekil 4.6 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-10 (5'-GTGATCGCAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	56
Şekil 4.7 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-11 (5'- CAATCGCCGT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	57
Şekil 4.8 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-15 (5'- TTCCGAACCC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	58

Şekil 4.9 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-08 (5'-GTCCACACGG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	59
Şekil 4.10 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-12 (5'-CCTTGACGCA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	60
Şekil 4.11 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-17 (5'-AGGGAACGAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	61
Şekil 4.12 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-18 (5'- CCACAGCAGT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	62
Şekil 4.13 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-03 (5'- GTCGCCGTCA -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	63
Şekil 4.14 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-07 (5'-TTGGCACGGG -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	64
Şekil 4.15 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-13 (5'-GGGGTGACGA -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	65
Şekil 4.16 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-09 (5'- TGAGCCTCAC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	66
Şekil 4.17 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-12 (5'- GTCCCGTGGT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	67
Şekil 4.18 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-14 (5'- CACCCGGATG- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	68

Şekil 4.19 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-19 ( 5'-GGACACCACT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	69
Şekil 4.20 Çalışılan tüm populasyonlara ait genetik mesafe değerleriyle oluşturulmuş dendogram (Nei 1978). .....	77

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Mus</i> cinsinin evrim ağacı .....	9
Çizelge 2.2 RAPD ile RFLP ve mikrosatelit yöntemlerinin karşılaştırılması .....	35
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan <i>Mus</i> örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı lokaliteler .....	37
Çizelge 3.2 Çalışmada dış grup olarak kullanılan türlerin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı lokaliteler .....	40
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan <i>Mus</i> örneklerinden elde edilen DNA'ların spektrofotometre ile ölçüm sonuçları .....	43
Çizelge 3.4 Çalışmada dış grup olarak kullanılan <i>Apodemus</i> ve <i>Arvicola terrestris</i> örneklerinden elde edilen DNA'ların spektrofotometre ile ölçüm sonuçları .....	46
Çizelge 3.5 Kaya ve Neale (1995) tarafından uygulanan PCR döngü programı .....	47
Çizelge 3.6 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü programı .....	47
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan primerler ve her bir primerden elde edilen bant sayısı .....	51
Çizelge 4.2 Türe özgü ayırt edici primerler .....	70
Çizelge 4.3 RAPD-PCR yöntemi ile belirlenen <i>Mus</i> örnekleri .....	71
Çizelge 4.4 <i>Mus</i> populasyonlarının genetik varyasyon analizleri (Nei 1987) .....	74
Çizelge 4.5 <i>Mus</i> populasyonları için genetik farklılaşma analizi (Nei 1987) .....	74
Çizelge 4.6 Genetik mesafe (alt diagonal) ve genetik benzerlik (üst diagonal) hesaplamaları (Nei 1978) .....	76
Çizelge 4.7 <i>M. domesticus</i> populasyonları için genetik farklılaşma analizi (Nei 1987) .....	78
Çizelge 4.8 <i>M. macedonicus</i> populasyonları için genetik farklılaşma analizi (Nei 1987) .....	78

## 1. GİRİŞ

Türkiye’de yaşayan en çok memeli türüne sahip ordo Rodentia ordusudur. Rodentia ordosu toplam 67 türe sahiptir (Çolak vd. 2006). Rodentia ordosunun Türkiye’de 9 familyası mevcuttur (Çolak vd. 2006). *Mus* cinsi en çok türe sahip olan Muridae familyası içinde yer almaktadır (Wilson ve Reeder 2005, Çolak vd. 2006). Yapılan çalışmalarda Türkiye’de *Mus* cinsine ait *Mus domesticus* ve *Mus macedonicus*’un yayılış gösterdiği ortaya konmuştur (Krystufek ve Macholan 1998, Wilson ve Reeder 2005, Çolak vd. 2006). Bazı araştırmacılar *Mus musculus domesticus*, bazıları da *M. domesticus*’u kullanmaktadırlar. Bu çalışmada *M. domesticus* kullanılmıştır.

Morfolojik, karyolojik, biyokimyasal ve DNA bazlı gerek Avrupa’da gerekse Türkiye’de *Mus* cinsi üzerinde taksonomik ve filogenetik birçok çalışma yapılmıştır. Avrupa’da yapılan çalışmalar sonucunda Avrupa’da *Mus* cinsine ait 5 tür (*Mus spretus*, *Mus spicilegus*, *Mus macedonicus*, *Mus musculus*, *M. domesticus*) kaydedilmiştir (Ellerman 1948, Thaler vd. 1980, 1981, Macholan ve Zima 1994, Wilson ve Reeder 2005).

Petrov ve Ruzić (1983), *M. macedonicus*’u Yugoslavya’da *Mus hortulanus*’un bir alttürü olarak tanımlamışlar daha sonraki çalışmalarında (1985) ise tür seviyesinde ele almışlardır. Bonhomme (1986), *M. macedonicus*’u yakın zamana kadar sibling bir tür olan *M. spicilegus* Petenyi (1882) ile aynı takson içerisinde değerlendirilmekteydi. Türün tam olarak taksonomik yeri daha sonraki çalışmalarla belirlenmiştir.

*M. macedonicus* coğrafik olarak bugün, Yugoslavya, Yunanistan, Bulgaristan, Türkiye, İran, İsrail, Gürcistan ve Kıbrıs’ ta yayılış göstermektedir (Ivanitskaya vd. 1996, Orth vd. 2002). *M. macedonicus* bazen yanlışlıkla *M. spretoides* Petrov ve Ruzić (1983) veya *Mus abbotti* Waterhouse (1837) olarak ele alınmaktadır (Auffray vd. 1990b). Oysa tip yeri Trabzon olan ve British Museum’ da saklanan *M. abbotti* tip örneği, muhtemelen yavru bir *M. m. domesticus*’a aittir (Boursot vd. 1993). *M. m. domesticus*’a ait fosil kayıtlar bu alttürün Orta Doğu’dan Batı Avrupa’ya geçtiğini göstermektedir (Auffray vd. 1990a). Günümüzde ise bu alttür, Batı Avrupa, Kuzey Afrika ve Yakın Doğu’da

yayılış gösterir (Boursot vd. 1993). Moleküler çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, *M. m. domesticus*'un (aynı zamanda *M. domesticus* olarak da bilinir) orijin merkezinin Irak civarında olduğu sanılmaktadır (Auffray vd. 1990a, Boursot vd. 1996, Din vd. 1996, Prager vd. 1998).

*Mus* cinsi üzerine Türkiye'de yapılan ilk çalışmalar 1940'lara dayanır. Schwarz ve Schwarz (1943) ve Ellerman ve Morrison-Scott (1951) *M. musculus* Linnaeus (1758) türünün Türkiye'de yayılış gösterdiğini kaydetmişler ve bu türün dünyada 15 alttüre sahip olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılara göre bu alttürlerden 6 tanesi; *Mus musculus musculus* L. (1758), *Mus musculus domesticus* Ruddy (1772), *Mus musculus praetextus* Brants (1827), *Mus musculus brevisrostris* Waterhouse (1837), *Mus musculus wagneri* Eversmann (1848), *Mus musculus spicilegus* Petenyi (1882), Türkiye'ye komşu ülkelerde yayılış göstermektedir. Waterhouse (1837) Trabzon'da *M. abbotti*'yi tanımlamıştır (Auffray vd. 1990b). Schwarz ve Schwarz (1943) *M. abbotti*'yi sinonim yaparak bunun yerine *M. m. brevisrostris* alttürünün geçerli olduğunu kaydetmiştir. Vinogradov ve Argyropulo (1941) örnek kaydı vermeksizin *M. abbotti*'nin Türkiye'de yayılış gösterdiğini kaydetmişlerdir.

Hoogstraal (1959) ve Stainer ve Vaug (1966) çalışmalarında morfolojik özellikleri kullanarak Türkiye'de *M. musculus*'un yayılış gösterdiğini belirtmişlerdir. Mursaloğlu (1978) ise Türkiye'de, *M. musculus*'un yayılış gösterdiğini belirterek bu türün Türkiye'deki yayılış alanı içerisinde, *M. m. domesticus*, *M. m. praetextus*, *M. m. vignaudi*, *M. m. wagneri* ve *M. m. brevisrostris* alttürleri ile temsil edildiğini kaydetmiştir. Yukarıda verilen *M. musculus*'un alttürlerinin Türkiye'de yayılış gösterdiği şeklindeki taksonomik düşünceden vazgeçilerek bunun yerine Türkiye'de iki türün, *M. domesticus* ve *M. macedonicus*'un yayılış gösterdiği ortaya konmuştur. Morfolojik temelli çalışmalardan; Harrison ve Bates (1991) ve Musser ve Carleton (1993) *M. macedonicus*'un yayılış alanı içerisinde Türkiye'nin de bulunduğunu belirtmişlerdir. Daha kapsamlı bir çalışmada Krystufek ve Macholan (1998) Orta Anadolu'dan *M. macedonicus* kaydı vermişlerdir. Çolak vd. (2006) morfolojik verilere dayanarak Türkiye'de *M. domesticus* ile *M. macedonicus*'un yayılış gösterdiğini ortaya koymuşlar ve iki türü ayırt edici morfolojik özelliklerini tanımlamışlardır.

*Mus* cinsi türlerinden *M. domesticus* ait standart karyotip ( $2n=40$ ) dışında çok sayıda Robertsonian (Rb) metasentrik populasyonunun varlığı ortaya konmuştur. Yapılan karyolojik çalışmalar sonucunda, *M. m. domesticus* alttürünün  $2n=40$  kromozoma sahip olduğunu belirtmişler ve bu karyotipe sahip bireyleri 'standart karyotipli ırklar' olarak adlandırmışlardır (Searle 1993). Buna karşın *M. m. domesticus*'ta şaşkırtıcı değişiklikler rapor edilmiştir. Rb metasentrik kromozomları yaban tip *M. m. domesticus*'da keşfedilmiştir (Gropp vd. 1969). Bugüne kadar bu alttür içerisinde 97 farklı Rb metasentrik kromozom kaydedilmiştir (Pialek vd. 2005).

Ivanitskaya vd. (1996), İsrail'de yapmış olduğu kromozomal çalışmada 2 tip X ve 2 tip Y kromozomu tespit etmişlerdir. 1. tip X kromozomunun *M. m. domesticus*, *M. m. bactrianus*, *M. m. castaneus*, *M. caroli*, *M. spicilegus* ve *M. macedonicus* için karakteristik olduğu tespit edilmiştir. 2. tip X kromozomu ise yaygın olarak *M. m. musculus*, *M. m. raddei* ve *M. m. sergii*'de bulunmuştur (Dev vd. 1975, Bulatova vd. 1991). Tanımlanan 2 tip Y kromozomu alt grup sınıflaması için kromozomal yapılar olarak hizmet etmiştir. 1. tip büyük Y kromozomu, 2. tipin ise küçük Y kromozomu olduğu saptanmıştır. Küçük Y kromozomlarına sahip grubun yabani türlerden oluştuğu ve *M. macedonicus*'un küçük Y kromozomuna sahip bir tür olduğu belirlenmiştir.

Moleküler düzeydeki allozim çalışmalarında; Bonhomme vd. (1983) Avrupa'daki *M. m. domesticus* için karbonik anhidraz enziminin ayırt edici lokus olduğunu, Thaler vd. (1981) ve Mezhzherin vd. (1998) Avrupa'daki *M. domesticus* ve Kafkasya'da bulunan *M. musculus* için izositrat dehidrogenaz (Idh-1) lokusunun ayırt edici özelliğini saptamışlardır.

Gözcüoğlu vd. (2005), Türkiye'de Bolu ve çevresindeki illerde *M. domesticus* ve *M. macedonicus* bireyleri üzerine yaptıkları çalışmada her iki türü morfolojik, morfometrik, karyolojik ve Idh-1 enzim sistemi özellikleri yönünden birbirlerinden ayırt etmişlerdir.

Gündüz vd. (2000b), İran ve Türkiye'nin (Samsun ve Kayseri) farklı lokalitelerinden topladıkları *Mus* örneklerini kuyruk uzunluğu 71 mm'den büyük örnekleri *M. m. domesticus*, 71 mm'den küçük örnekleri ise *M. macedonicus* olarak ele almışlar ve bu

örnekler üzerinde mitokondrial D-loop sekansı analizi yapmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları sekans analizleri sonucunda; kuyruk uzunluğunun türleri birbirinden ayırt ettiğini, kuyruk uzunluğu 71 mm'nin altında olanların mtDNA analiz sonucuna göre de *M. macedonicus*, 71 mm'nin üzerinde olanların da mtDNA analiz sonuçlarına göre *M. m. domesticus* olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca D-loop sekans analiz sonucuna göre *M. macedonicus*'un monotipik bir tür olduğunu göstermişlerdir. Sonraki yıllarda Orth vd. (2002), mitokondrial D-loop sekansı araştırmalarında Bulgaristan, Yunanistan, Makedonya, Gürcistan, İran, Türkiye ve İsrail' de yayılış gösteren *M. macedonicus* örnekleri ile yaptıkları çalışmada bu türün politipik olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar; Bulgaristan, Yunanistan, Makedonya, Gürcistan, İran ve Türkiye'deki *M. macedonicus* bireylerini klad A, İsrail' dekileri ise klad B olarak ifade etmişlerdir. Araştırmacılar Klad A bireyleri için "*Mus macedonicus macedonicus*", Klad B bireyleri için "*Mus macedonicus spretoides*" olarak isimlendirmeyi önermişlerdir.

Gündüz vd. (2005) *M. m. domesticus*'un kolonizasyon tarihi hakkında yeni bir bakış açısı sağlamak için yapmış oldukları bir çalışmada, Türkiye'nin 45 farklı lokasyonundan toplam 92 örnekle çalışmışlardır. mtDNA analizi ile Türkiye'nin farklı bölgelerinden 51 yeni, toplam 54 tane *M. m. domesticus* haplotipi elde etmişlerdir. Bu sonuç, bu taksona ait bireylerin yüksek nükleotid çeşitliliğinin olduğunu göstermiştir. Anadolu'nun güneyi hariç tüm Türkiye'de Temel Türkiye Kladı adını verdikleri, zayıf genetik yapıya sahip *M. m. domesticus* bireyleri tanımlamışlardır. Yüksek haplotip çeşitliliğinin zayıf genetik yapıya işaret ettiğini, bu zayıf genetik yapının da Türkiye'nin orijin yerine (Irak) yakınlığı ile ilişkili olduğunu ve "Ana Türk Kladı"nın batı yönündeki kolonizasyonları için Türkiye'nin kaynak alan olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Spiridonova vd. (2008a) tarafından Rusya'da yapılmış olan çalışmada, *Mus musculus*'un 6 alttürü: *M. m. musculus*, *M. m. domesticus*, *M. m. castaneus*, *M. m. gansuensis*, *M. m. wagneri*, *M. m. bactrianus* arasındaki genetik farklılık RAPD-PCR analizi ile incelenmiş ve taksonların spesifik moleküler belirteçleri saptanmış ve alttürler arası genetik farklılık seviyeleri değerlendirilmiştir.

Spiridonova vd. (2008b) Rusya’da 10 farklı lokaliteden topladıkları alttürlerin; coğrafik dağılımları, genetik çeşitliliği, genetik farklılığı ve akrabalık ilişkilerini RAPD belirteçleri kullanılarak analiz etmişlerdir. İncelenen tüm örneklerde yüksek oranda benzerlik görülmüş, aynı zamanda popülasyona özgü olan fragmentler de belirlenmiştir.

Yukarıda verilen literatür özetinden *Mus* cinsine ait Türkiye’de iki türün; *M. domesticus* ve *M. macedonicus*’un yayılış gösterdiği anlaşılmaktadır. Türkiye zoocoğrafik olarak üç kıtanın arasında geçiş bölgesinde yer almaktadır. Ayrıca çok sayıda farklı coğrafik bariyere (sıra dağlar, akarsular ve boğazlar) sahiptir. Bu özellikler Türkiye’ye çok farklı iklimsel çeşitliliği kazandırmıştır. Bu doğal oluşumlar dışında çok sayıda insan kaynaklı oluşum da Türkiye’nin doğal yapısını etkilemektedir. Bütün bu oluşumlar habitat parçalanması ve habitat kaybına neden olmaktadır. Habitat parçalanması ve habitat kaybı hayvan ve bitki türlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu yönde popülasyonların genetik çeşitliliklerinin ortaya konması koruma biyolojisi bakımından önem taşımaktadır. *M. domesticus* ve *M. macedonicus* bütün Türkiye’de yayılış göstermektedir. Çalışma alanı olarak seçilen Karadeniz bölgesi ve Trakya’daki *M. domesticus* ve *M. macedonicus*’lar da yukarıda belirtilen faktörler tarafından etkilenmektedirler. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bu faktörlerin bu iki türü nasıl etkilediği kapsamlı bir çalışma ile ortaya konmamıştır.

Bu çalışmanın amacı Trakya ve Karadeniz bölgesinde yayılış gösteren *Mus* türlerini ve bu türlerin farklı popülasyonları arasındaki genetik farklılaşmayı RAPD-PCR analizi ile ortaya koymaktır. Ayrıca İstanbul ve Çanakkale boğazlarının *Mus* cinsine ait türlerin Anadolu ve Trakya popülasyonları arasında coğrafik bir bariyer oluşturup oluşturmadığı, Karadeniz ve Marmara bölgesinin popülasyonlar üzerinde iklimsel ve topografik etkisinin ortaya konması çalışmanın başka bir amacını oluşturmaktadır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

**Regnum:** Animalia

**Classis:** Mammalia

**Subclassis:** Eutheria

**Ordo:** Rodentia

**Familia:** Muridae

**Genus:** *Mus*

### 2.1 Rodentia

Rodentia ordosu 29 familya, 400'ü aşkın cins ve 2800'ün üzerinde türüyle memeli sınıfının en büyük takımıdır (Ognev 1947, Wilson ve Reeder 2005). Antartika, Kutuplar, Yeni Zelanda ve birkaç okyanus takımadası dışında tüm karalara yayılmış olarak bulunurlar. Bu hayvanlar kara, ağaç, toprak altı ve yarı sucul olarak çok farklı habitatlarda yayılış gösterirler. Diğer takımlardan kolayca ayrılabilen kemiricilerin kendi içlerinde filogenetik durumları birçok yönden net değildir. Çiğneme kasları ve kafa yapıları kemiricileri sınıflandırmak için önemli kriterlerdir. Her bir grup kafatası yapısı ve çenenin kafatası ile yapmış olduğu bağlantıyla birbirinden ayrılır. Rodentia takımını diğerlerinden ayıran en önemli diagnostik karakter köpek dişleri ve ön azı dişlerinin kaybolması ile oluşan diastema boşluğudur. Diastema boşluğu üst kesici dişlerle azı dişler arasında bulunur ve besinleri toplamak için kullanılır. Her iki çenenin önünde, tüm kemiricilerin ortak özelliği olan ikişer adet kesici diş bulunur. Bu dişler köksüzdür ve sürekli büyürler. Kesici dişlerin kırılması halinde yerlerine yenileri oluşmaz ve karşılardakiler sürekli büyüyerek hayvanın ölümüne neden olur (Ognev 1947).

Birçoğunda üst dudağın yarık olması ağız tavanının gelişmesinin erken evrede durması sonucu ortaya çıkmış eksik bir yapıdır. Bu yapı kemirme olayında çok gerekli ve kullanışlıdır. Her çeşit koşulda yaşayan ve yeni koşullara en kısa sürede uyum sağlayan hayvanlardır (Kuru 1999).

Bazı türlerde besinin toplanmasına yarayan yanak keseleri vardır. Mideleri basit, körbağırsakları uzundur. Kuyrukları çoğunlukla uzun, bazı türlerde pullarla örtülüdür. Toprak altında tüneller kazarak yaşayan türlerde tırnaklar iyi gelişmiştir. Gözler yaşam biçimine bağlı olarak farklı büyüklükte olabilir. Toprak altında yaşayanlarda gözler küçülmüş hatta bazı türlerde körelerek deri altında kalmıştır. Gececi olanlarda ise oldukça büyüktür. Gözler başın yan taraflarında yer aldıklarından hem önü hem de arkayı aynı anda görebilirler. Suda yaşayanlarda gözler başın üst kısmındadır. Kulaklar da yaşam biçimine göre değişik şekiller gösterir. Örneğin, toprak altında ve suda yaşayanlarda oldukça küçülmüştür. Kemiriciler genellikle herbivor ya da omnivordurlar. Çok iyi koşar, sıçrar, tırmanır ve yüzerler. Üreme kapasiteleri çok yüksektir. Gebelik süreleri 16–170 gün arasında değişir. Çoğunlukla yılda birkaç defa doğururlar ve her doğumda 1-18 yavru yaparlar (Kuru 1999).

Kemiriciler insanların besinlerine, kâğıttan, tahtadan, deriden veya kumaştan yapılmış malzemelere ve eşyalara keskin dişleriyle kemirerek zarar vermeleri ve bazı hastalıkları bulaştırmaları açısından çok önemlidirler (Buckie ve Smith 1994, Nowak 1999).

## 2.2 Muridae

Fosil kayıtlar, *Mus* cinsinin ait olduğu Muridae familyasının bilinen en eski ve en ilkel fosili olan *Anthemus*'un yaklaşık 14 milyon yıl önce, Orta Miyosen devrinde Hint-Pakistan bölgesinde ortaya çıktığını göstermektedir (Boursot vd. 1993).

Muridae familyası günümüzde tanımlanan 301 cins ve 1336 türü ile memeliler ve dolayısıyla kemiriciler içindeki en geniş familyadır. Kutup bölgeleri, Batı Hindistan'ın bazı bölgeleri, Yeni Zelanda ve bazı Okyanus adaları dışında dünyanın tüm bölgelerinde çok geniş bir yayılışa sahiptirler. Familyanın orijinal olarak bulunmadığı birçok bölgede bile bu familyaya dahil türler insanlar aracılığıyla bu bölgelere ulaşarak buralarda da yaşamlarını sürdürebilmişlerdir.

Kılları kısa, yumuşak ya da kalın ve serttir. Kuyrukları genellikle vücuttan daha uzun, çıplak ve üzeri pullarla örtülüdür. Kulakları genellikle uzundur. En dar yerlerden geçerler. Çok farklı habitatlarda yaşayabilirler. Toprak üzerinde, ağaçlarda ya da toprak

altında yaşıyan türleri vardır. Tünellerde ya da çatlaklarda, kütük ya da benzeri uygun nesnelerin altında, uygun ağaç gövdelerinde ya da kovuklarında ve çalılarda, toprakta ya da ağaçlarda yaptıkları yuvalarda barınırlar. Gündüz ya da gececi davranışlar gösterirler ve genellikle tüm yıl boyunca aktiftirler (Kuru 1999). Muridae familyasının bazı üyeleri toplu halde yaşarlar ve yüksek derecede sosyalleşebilmişlerdir. Bunun yanında diğerleri yalnız ya da çiftler halinde yaşamaya eğilimlidirler. Yılın sıcak geçen dönemlerinde çiftleşirler. Dişiler bir yıl içinde genellikle çok sayıda yavrularlar. Diğer kemiricilerden farklı olarak kulak kepçeleri daha büyük, ağız-burun kısımları daha sivri ve gözleri daha büyüktür. Diş formülü  $1.0.0.2-3/1.0.0.2-3=12-16$ 'dır (Demirsoy 1998).

İnsanlar için tehlikeli birçok hastalık bu familyadaki kemiricilerden insanlara taşınabilir. Familyanın bazı türleri ekinlere, genç ağaçlara ve insanların depoladıkları besinlere zarar verirler (Buckie ve Smith 1994, Nowak 1999).

### **2.3 *Mus* Linnaeus, 1758**

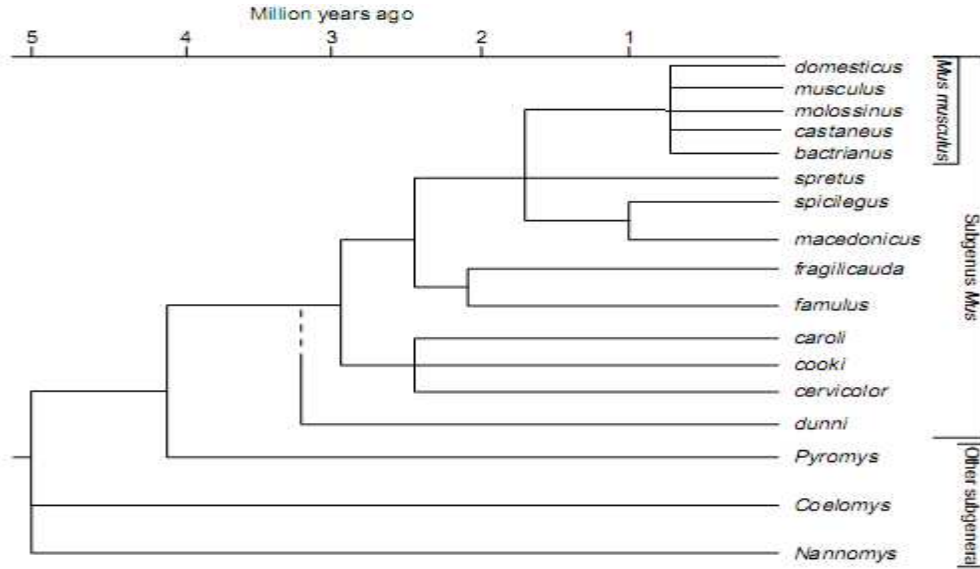
*Mus* cinsinin bilinen ilk türü olan *Mus auctor* yaklaşık 5 milyon yıl önce, Miyosen devri sonunda ortaya çıkmış ve diğer pek çok Muridae üyesi gibi Hint Yarımadası'ndan köken alarak farklı lokalitelere doğru yayılmaya başlamıştır. Diş morfolojisine göre *M. auctor* sadece *Mus* altcinsinin değil tüm *Mus* cinsinin de atası olabilir (Boursot vd. 1993).

Bu küçük kemiricilerin baş-beden uzunlukları genellikle 100 mm'nin altındadır. Kürkleri yumuşak, sert veya yer yer dikenimsi yapıda olabilir. Kafatası narin ve oldukça düzdür. Rostrum genellikle kısadır. Timpanik bullalar genişlememiştir. Üst kesici dişlerde alt kesici dişlerin hareketinden kaynaklanan, posterior marjine doğru uzanan karakteristik bir subapikal çentik vardır. Diş formülü:  $i: 1/1 c: 0/0 pm 0/0 m 3/3 =16$ 'dır (Harrison ve Bates 1991). Renkleri açık kahverenginden siyaha kadar değişir. Koku alma ve işitme duyuları çok iyi gelişmiştir. Günümüzde birçok kanser araştırması ve gebelik testleri bu hayvanlarda yapılmaktadır.

Günümüzde, yaklaşık 30-40 tür içeren *Mus* cinsi 4 altcins ile temsil edilmektedir. Bunlar *Mus*, *Pyromys*, *Coelomys* ve *Nannomys* olup her bir altcins kendine özgü

morfolojik ve moleküler özelliklere sahiptir. Bunlardan *Mus altcinsi* Asya ve Avrupa’da 9 tür, *Pyromys altcinsi* Güney ve Güneydoğu Asya’da 5 tür, *Coelomys altcinsi* Sumatra, Srilanka, Güneydoğu Asya ve Jawa’da 5 tür, *Nannomys altcinsi* ise Afrika’da 19 tür ile temsil edilir (Wilson ve Reeder 2005).

Çizelge 2.1 *Mus* cinsinin evrim ağacı (Guenet ve Bonhomme 2003)



Çizelge 2.1’de Asya türleri ( *Mus cervicolor*, *Mus cookii* ve *Mus caroli* ) 3 milyon yıl önceki ayrılması ve diğer tarafta ev faresiyle beş farklı benzer türün oluşması olan dallanmadır. 2 milyon yıl önce, biri Hindistan’ dan olup (*Mus famulus*) yakınlarda *Mus*’un alt türü olduğu anlaşılan ve diğeri Tayland’dan (*Mus fragilicauda*) olup yakın zamanlara kadar bilinmeyen iki benzer türün ayrılması görülebilir. Ağaçtaki sonraki nod, yaklaşık 1,5 milyon yıl önce, morfolojik olarak çok benzeyen kısa kuyruklu Paleartik türlerin bulunduğu noddur; Batı Akdenizin bilinen kısa kuyruklu türü *M. spretus*, Merkez Avrupa’ da bulunan *M. spicilegus*; doğu Akdeniz’ de bulunan kısa kuyruklu ve Kafkaslar’ ın güneyinden Adriatik ve doğuya kadar olan bölgede bulunan *M. spretus* ile benzer olan (akraba olup, üst üste gelmeyen coğrafi bölgede bulunan ekolojik olarak aynı bölgelerde yaşamaktadırlar) *M. macedonicus*. Son nod ise karmaşık *M. musculus* alt türlerini göstermektedir (Guenet ve Bonhomme 2003).

Lundrigan vd. (2002)’nin yapmış olduğu çalışmada, 6 genin DNA sekansı kullanılarak *Mus* cinsi için bir filogeni oluşturulmuştur. Çalışmada genomun paternal, maternal,

biparental kalıtılan bölgeleri temsil eden altı gen kullanılmıştır. İlk olarak bu 6 gen ayrı ayrı analiz edilmiş daha sonrasında mitokondrial ve nükleer parsimoni analizi ve son olarak da kombine verilerden oluşan parsimoni analizi yapılmıştır. Genomun çeşitli kısımlarını temsil eden oldukça büyük nükleotit dizilerine dayalı olduğu için, bu çalışmada elde edilen filogenetik ağacın bugüne kadar olan en iyi kombine *Mus* data filogenisi olduğu ileri sürülmüştür. Ve bu filogeni allozim ve tek kopya nükleer DNA gibi çeşitli yöntemlerle elde edilen önceki filogeniler ile de uyumludur. Yine de genler arası bazı uyumsuzluklar görülmüştür; bunlar *Mus* altcinsindeki Asya taksonları arasındaki ilişki, *M. spretus*'un yerleşimi ve *Mus* cinsinin alt cinsleri arasındaki ilişkilerdir. Araştırmacılar, Asya kladı ve *M. spretus*'un durumu için ellerinde yeterince örnek olmasına rağmen stabil bir topoloji elde edilememesini bu kladların hızlı radyasyonuna bağlamışlardır. Alt cinsler için ise bunları temsil eden daha fazla örneğin çalışılmasının gerekli olduğunu vurgulamışlardır.

*Mus* altcinsi kromozomal olarak korunmuştur ve yapılan kromozomal çalışmalar sonucunda bu altcins içerisindeki tüm bireylerin, 40 akrosentrik kromozoma sahip olduğu saptanmıştır. Yalnızca heterokromatin ve NOR bölgelerinin miktarı ve dağılımı ile Y kromozomunun büyüklüğünde çok küçük varyasyonlar görülmektedir (Winking vd. 1980, Moriwaki 1986, Bulatova ve Kotenkova 1990, Suzuki vd. 1990, Bulatova vd. 1991, Matsuda vd. 1991).

*Mus* cinsinin doğal yayılış alanı Avrupa, Afrika ve Asya kıtalarıdır. Bu cins içerisindeki *M. musculus* ise dünyanın hemen hemen tamamına yayılmış halde bulunur (Boursot vd. 1993). Amerika ve Avustralya kıtalarındaki *Mus* cinsi kolonileşmesinde insanların da rolü bulunmaktadır (Guenet ve Bonhomme 2003).

Birçok araştırmacıya göre *Mus*, çeşitli çalışmalarla birbirinden ayrılmış ve aralarında üreme izolasyonu olan *M. spretus*, *M. macedonicus*, *M. spicilegus*, *M. musculus* ve *M. domesticus* türlerini kapsamaktadır. Biyokimyasal ve karyolojik çalışmalar Akdeniz bölgesinde 3 farklı türün yayılış gösterdiğini ortaya koymuştur; *M. spretus*, *M. macedonicus* ve *M. spicilegus* (Marshall ve Sage 1981, Marshall 1986, Sage 1981, Orsini 1982, Bonhomme vd. 1983, Macholan ve Zima 1994).

Hem morfometrik hem de biyokimyasal analizlerin sonuçları İsrail’de 2 *Mus* türünün varlığını ispat etmiştir; *M. m. domesticus* kommensal olan türü ve *M. spretoides* yabani türüdür, Akdeniz iklimi zonunda yaşarlar (Auffray vd. 1990b). İsim “*spretoides*” iken, Harrison ve Bates (1991) Kuzey İsrail *M. spretoides* formunu *M. macedonicus* olarak adlandırdılar. Bu tür kısa bir kuyruk ve geniş ön kısmı molar yapıya sahiptir.

Zararlı olarak kabul edilen *Mus* türü *M. musculus*’tur ve 3 alttüre sahiptir; *M. m. domesticus*, *M. m. bactrianus* ve *M. m. castaneus* (*domesticus* ve *castaneus* bazı yerlerde tür olarak da kabul edilmektedir) (Nowak 1999).

### **2.3.1 *Mus macedonicus* Petrov & Ruzic, 1982**

Ev farelerinin yabani türüdür. Yunanistan, Bulgaristan, Trakya, Ege Adaları, Anadolu, İsrail, Suriye, Kuzeybatı İran, Hazar Denizi’nin güney kıyılarında dağılım gösterir (Özkan 1995).

*M. macedonicus* ekilmiş ve çalılık alanların hududunda, caddelerin ve evlerin yakınlarında yaşar. Türkiye’de yayılış göstermektedir. Çolak vd. (2002) *Mus macedonicus* türlerini Türkiye’deki çeşitli lokalitelerde kaydetmiştir.

Bu türün sırt renklemesi koyu kahverengiden hafif sarımsı ile soluk parlak kahverengiye değişir, karında daha parlak olur. Kürk böğürlere doğru daha parlaklaşır. Böğürler arasındaki hudut çizgisi bellidir. Karın beyazımsı gri, lekesiz beyaz, sarımsı beyaz ve kırmızımsı beyaz olabilir. Kulaklar içten ve dıştan ufacık beyaz seyrek kıllarla kaplıdır. Kuyruğun dorsal yüzeyi koyu kahverengi iken ventral yüzeyi kısmen parlak renktedir. Pençeler çıplaktır ve kahverengidir. Arka ve ön ayaklar dorsal olarak beyaz kıllarla kaplıdır (Çolak vd. 2006), (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 *M. macedonicus* 'un dorsal görünüşü (Özsu 2011)

### 2.3.2 Species: *Mus domesticus* Schwarz & Schwarz, 1943

*M. domesticus* türleri Akdeniz ve Orta Avrupa'da dağılım gösterir (Özkan 1995). Evlerde, bahçelerde, ekili ve çalılık alanlarda bulunurlar. Tüm Türkiye'de yayılış göstermektedir. Batı faresi olarak ta bilinen bu tür kommensal yaşar ve tüm yıl evlerde ve depolarda bulunur. Daha koyu gri renkli sırt kısımları biraz daha açık renkli karın kısımlarına tedrici bir şekilde geçiş gösterirler. Kuyrukları oldukça kalındır. En tipik özellikleri küf kokusuna sahip olmalarıdır (Demirsoy 1998).

Böğürler boyunca olan hudut çizgisi belli belirsizdir. Karın siyahımsı gri, kırmızımsı, gri ve kırmızımsı gri renklerinde olabilir. Kulaklar içten ve dıştan ufacık koyu kahverengi seyrek kıllarla örtülüdür. Kuyruğun dorsal kısmı koyu renlidir ve ventral kısmı parlak renktedir. Pençeler çıplaktır ve koyu veya koyu kahverengi renktedir. Arka ve ön ayaklar dorsal olarak koyu renk kıllarla örtülmüştür (Çolak vd. 2006), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 *M. domesticus*'un dorsal görünüşü (Özsu 2011)

### 2.3.3 *Mus spretus* Lataste, 1883

Cezayir faresi (Algerian Mouse) olarak da bilinmektedir. En iyi bilinen Batı Akdeniz kısa kuyruklu faresidir. Cezayir, Fransa, Libya, Portekiz, İspanya ve Tunus' ta bulunmaktadır. Doğal yaşam ortamları ılıman otlaklar, tarım alanları ve köy-çiftlik bahçeleridir ([http://en.wikipedia.org/wiki/Mus\\_spretus](http://en.wikipedia.org/wiki/Mus_spretus)). İki renkli kuyruk kısa, sırt sarımsı kahverengi, karın kurşuni veya beyaz renkte, ayaklar beyaz ve ayakların üst tarafı sarımsı kahverengidir. Kommensal bir türdür (Özkan 1995).

### 2.3.4. *Mus spicilegus* Petényi, 1882

Bozkır faresi (Mound-building Mouse ve Steppe Mouse) olarak da bilinir. Avusturya, Bosna, Hırvatistan, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Macaristan, Makedonya, Romanya, Slovakya ve Ukrayna'da bulunmaktadır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Mus-spicilegus>).

İki renkli kuyruk kısa, sırt açık sarımsı, kahverengi, karın beyazımsı ve renk sınırı bellidir. Yabanidir. Tahıl depolar. Karadeniz'in kuzeyinde ve Kafkaslar'da dağılım göstermektedir (Özkan 1995).

### 2.3.5 *Mus musculus* Linnaeus, 1758

*Mus* cinsinin en son filogenetik dalını oluşturan bu tür, yaklaşık 0.5 milyon yıl önce ilk olarak Hindistan'ın kuzeyinde ortaya çıkmıştır (Boursot vd. 1993).

*M. domesticus* türüne göre daha kahverengi, bazen kum renginden kırmızımsı kahverengiye kadar değişir, karın kısmı daha açık renklidir. Yanlarındaki sırt-karın renk farkı belirgin olarak görülür. Kuyruk, baş+gövdeden daha kısadır. İnsanlarla birlikte dünyanın her yerine yayılmışlardır. Doğu faresi olarak ta bilinen bu tür geçici kommensaldir, yazın doğada serbest yaşar, kışın binalara girer. Sıcak olan güney sahillerimizde tüm yıl doğada kalabilir (Demirsoy 1998).

Omnivor olarak beslenirler. Çok iyi koşar, tırmanır, sıçrar ve yüzebilir. Koku alma ve işitme duyuları çok iyi gelişmiştir. İki-üç ayda hatta daha erken eşeyssel olgunluğa erişir. Gebelik süresi 20-21 gün olup 6-13 yavru doğurur. İnsanların besinlerine aşırı ölçüde zarar verirler (Kuru 1999).

Bu türün Avrasya içerisine doğru farklı yollarla yayılması bugün dört alttürün meydana gelmesine neden olmuştur. *M. m. domesticus* (Batı Avrupa ve Akdeniz havzası), *M. m. musculus* (Orta Avrupa'dan Çin'in kuzeyine kadar), *M. m. castaneus* (Güneydoğu Asya), *M. m. bactrianus* (Orjin merkezinde). Bu dağılım, bu alttürlerin gen havuzunun değişik kısımlarında mozaik evrimine yol açmaktadır (Boursot vd. 1993). Bu alt türlerin hiç biri genetik olarak izole olmamış ve karşılaştıkları bölgelerde, sınırlı genetik değişimden, komple karışıma kadar çeşitli genetik değiş tokuş yaptıklarına dair kanıtlar bulunmaktadır. Avrupa'da dar bir hibrid bölgesinde *M. m. musculus* ve *M. m. domesticus* arasında ve Çin ve Japonya'da *M. m. musculus* ve *M. m. castaneus* arasında genetik değişimin olduğu gösterilmiştir. Japonya'da, bu iki alt tür geniş ölçüde hibridize olarak, eşsiz *Mus musculus molossinus* populasyonunun oluşmasına sebep olmuştur (Yonekawa vd. 1988). *M. m. musculus* ile *M. m. domesticus* arasında, Avrupa'da

Jutland Yarımadası (Danimarka) ve Doğu Holstein'den (Almanya) başlayıp Orta Avrupa boyunca Balkan Yarımadası'na ve Bulgaristan'ın Karadeniz kıyılarına kadar uzanan dar bir hibrit zon bulunmaktadır (Bozikova vd. 2005). Ayrıca bu iki alttürün, Transkafkasya bölgesinde de hibrit zonlar oluşturduğu tespit edilmiştir (Milishnikov vd. 2004). Bazı *M. musculus* alttürleri aynı yerde görülseler de, kısa kuyruklu türler; *M. spretus*, *M. spicilegus* ve *M. macedonicus* doğada çok az hibrid oluştururlar (Guenet ve Bonhomme 2003). Boursot vd. (1993) *M. macedonicus*'un *M. m. domesticus*'la aynı alanda yaşadığını belirtmektedirler.

Alttürlerden *M. m. domesticus*'un orjin merkezinin Irak civarında olduğu konusunda bir fikir birliği vardır ( Boursot vd. 1996, Din vd. 1996, Prager vd. 1998). *M. m. domesticus*'a ait fosil kayıtlar bu alttürün son 8.000 yıl içerisinde tarımsal faaliyetlerin artmasıyla Orta Doğu'dan Batı Avrupa'ya geçtiğini göstermektedir (Auffray vd. 1990a). *M. m. domesticus* alttürü  $2n=40$  kromozoma sahiptir (19 akrosentrik otozomal kromozom çifti ve XX/XY eşey kromozomları).  $2n=40$  karyotipe sahip bireyler 'standart karyotipli ırklar' olarak adlandırılmıştır (Searle 1993). Buna karşın *M. m. domesticus*'ta doğal sınırlar boyunca şaşkıncı değişiklikler rapor edilmiştir. Rb metasentrik kromozomlarının yaban tip *M. m. domesticus*'da keşfedilmesi, ev faresi üzerinde yeni bir çalışma alanı yaratmış ve cevaplanması gereken yeni sorular ortaya çıkartmıştır (Gropp vd. 1969). *M. m. domesticus* alttürleri üzerine yapılan tüm çalışmalar sonucunda, bugüne kadar bu alttür içerisinde 97 farklı Rb metasentrik kromozom kaydedilmiştir (Pialek vd. 2005).

Metasentrik kromozom oluşumu, üç temel mekanizmayla gerçekleşir. Birinci mekanizma Rb füzyonudur. Bu oluşum sırasında kromozomun telomer kısmının kaybı ya da inaktivasyonu söz konusudur (Slijepcevic 1998). Rb füzyonu, iki akrosentrik veya telosentrik kromozomun sentromer kısımlarından birleşerek iki kollu tek bir kromozom (metasentrik veya submetasentrik) oluşturması olayıdır. Rb füzyonu diploid kromozom sayısında indirgenmeye neden olsa bile temel kromozom sayısı (NF) aynı kalır. *M. m. domesticus* içerisindeki Rb translokasyonunun farklı kombinasyonları sonucu  $2n=22$ 'den  $2n=38$ 'e kadar değişebilen farklı populasyonların oluşumuna neden olmaktadır. İkinci mekanizma, tüm kolun karşılıklı translokasyonu (WART) sonucunda meydana gelebilir (Gündüz vd. 2000a). *M. m. domesticus*'da WART oluşumu ilk defa

Hauffe ve Pialek tarafından 1997 yılında tanımlanmıştır. WART'ın üç tipi bilinmektedir:

Tip a: İki metasentrik kromozom arasında

Tip b: Metasentrik ve akrosentrik kromozom arasında

Tip c: İki metasentrik ve bir akrosentrik kromozom arasındaki değişimle meydana gelir.

Şimdiye kadar *M. m. domesticus*'un doğal populasyonlarında WART oluşumunun yalnızca bir tipi kaydedilmiştir (Tip a). Üçüncü mekanizma ise zonal ırklaşmadır. Zonal ırklaşma, iki metasentrik populasyon veya bir metasentrik populasyon ile standart karyotipli populasyon arasındaki hibritleşmeyle meydana gelir (Pialek vd. 2005). Bu farklı kromozom sayısına sahip populasyonlara genel olarak 'kromozomal ırklar' adı verilmektedir. Pialek vd. (2005), kromozomal ırk terimi yerine taksonomik bir ifade olmayan 'metasentrik populasyon' kavramını ileri sürmüşlerdir. Onlara göre, metasentrik populasyon terimi ev faresinde kromozomal varyasyonun evriminin anlaşılması bakımından daha uygun bir ifadedir. Rb ırklar, standart karyotipli farelerden morfolojik olarak ayırt edilememektedir. Bu ırkların ortaya çıkış tarihi de net olarak bilinmemektedir (Nachman vd. 1994).

Rb füzyonları, laboratuvar fareleri üzerinde ilk olarak 1967 yılında tanımlanmıştır (Evans vd. 1967, Leonard ve Decknuddt 1967). Daha sonra, Gropp vd. (1972) İsviçre'de Valle di Poschiavio'da yakaladığı ev fareleri üzerinde Rb füzyonlarını tanımlamışlardır. Bu ilk Rb populasyonu farklı tür olarak *Mus poschivianus* olarak değerlendirilmiştir.

Tryfonopoulos vd. (2005a) Yunanistan'da *M. m. domesticus*'un Rb ırklarında allozim polimorfizmlerini çalışmışlardır. Araştırmacılar 5 farklı karyotipe sahip bireyler rapor etmişlerdir:  $2n= 24, 29, 30, 31, 32$ . Yeni bir nadir allel olan "C" alleli Amilaz (amy-2) lokusunda tespit edilmiş ve yalnızca  $2n= 30$  karyotipli 2 bireyde ve  $2n= 24$  karyotipli bir bireyde bulunmuştur.

Tryfonopoulos vd. (2005b) yapmış oldukları bir başka çalışmada, Yunanistan'ın kuzey batısında bulunan Mora Yarımadası'ndaki, kromozomları değişiklik gösteren ev faresi *M. m. domesticus* populasyonlarının mitokondrilerindeki sekans varyasyonlarına odaklanmışlardır. Ve bu populasyonlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemek ve Rb füzyonlarının fiksasyonunu anlama açısından atılmış ilk adımdır. Yunanistan'ın 18

bölgesinden toplam 58 örnekle çalışılmıştır ve 58 *M. m. domesticus* sekanslaması 23 haplotip ile sonuçlanmıştır. Çalışılmış moleküler parametrelere dayanarak, Yunan *M. m. domesticus* populasyonları diğer çalışılmış *M. m. domesticus* populasyonları ile karşılaştırıldığında önemli farklılıklar göstermemiştir. Diğer çalışılanlardan belirgin bir şekilde farklı olmasa da bu güne kadar, mitokondrideki en yüksek moleküler varyasyon *M. m. domesticus* populasyonlarında görülmüştür. Haplotip dağılımı şekli oldukça karışıktır. Bu veriler, Rb kromozomları ile karakterize edilen populasyonlar ile standart  $2n=40$  ile karakterize edilen karyotip arasında uzun-dönem coğrafi izolasyon olduğuna dair bir destek sağlamamaktadır.

Gündüz vd. (2000a), Orta Doğu'da *M. m. domesticus* ile ilgili araştırmalar sırasında metasentrik kromozomlara sahip bireylerden oluşan bir populasyon tespit etmişlerdir. İlgili fare Türkiye'nin Denizli ilinde yakalanmış olup bu farenin *M. m. domesticus*'un kuyruk uzunluğuna ve mitokondrial DNA sekans özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir.

#### **2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Tüm dünyada canlıları oluşturan genetik yapının çözülmesi, ortaya çıkarılan bu yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, işlevlerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Bu amaç doğrultusunda, belirlenen hedefe ulaşmayı kolaylaştıracak, hızlandıracak yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Basit gibi görünmekle birlikte, geliştirilen bu yöntemlerin en önemlilerinden birisi PCR'dır. 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen metot nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanır. Hem araştırmada hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan PCR'ın geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle, K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmıştır. PCR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir (Saiki vd. 1985, Mullis 1990). PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır:

1. Amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu
2. Primerin hedef DNA'ya bağlanması
3. Primerin uzamasıdır.

PCR, DNA'nın ortamda polimeraz enzimi ve DNA sentezi için uygun maddeler bulunması halinde karşıt sıralarını sentezleyebilme yeteneğinden faydalanılarak oluşturulan bir reaksiyondur. PCR'in en önemli yönü, özel bir DNA dizisi seçip çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, ayrıca DNA'nın analiz edilmesini de sağlamaktadır (Türkyılmaz ve Esendal 2002).

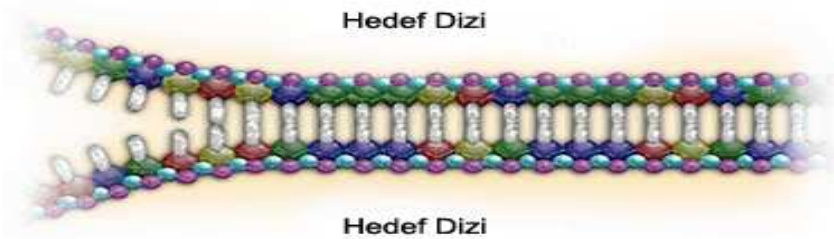
## 2.5 PCR Basamakları

### 2.5.1 DNA zincirinin açılması (Denatürasyon)

Kalıp DNA (template DNA), 92-95°C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir (Watson vd. 1992, Hadidi vd. 1995), (Şekil 2.3).

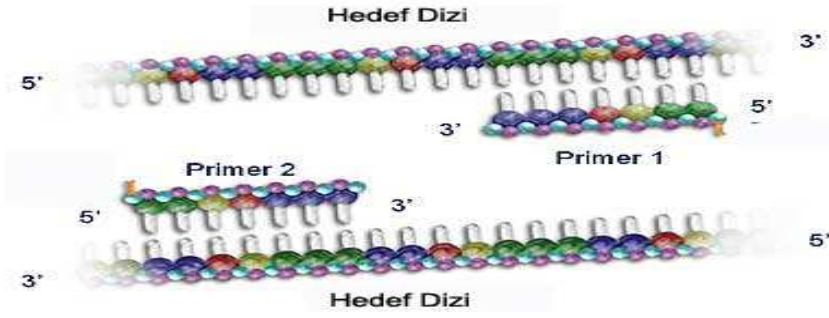
### 2.5.2 Bağlanma (Annealing)

Reaksiyon sıcaklığının, 37-65°C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilen baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir (Innis ve Gelfand 1990), (Şekil 2.4).



Şekil 2.3 DNA Zincirinin Açılması

(<http://www.pharmaceutical-technology.com/roche/images/roche6.jpg> 2011)

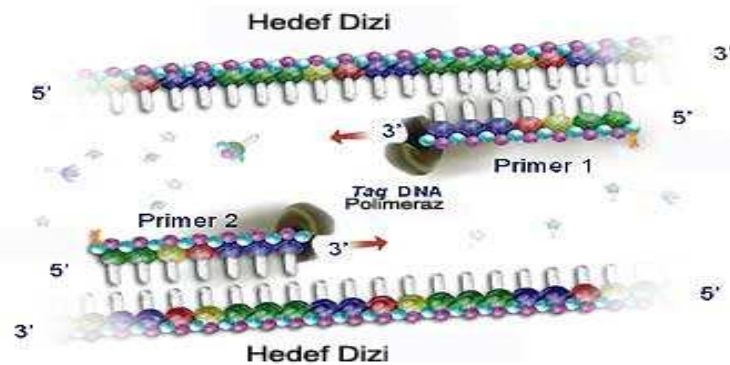


Şekil 2.4 Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Bağlanması

(<http://www.pharmaceutical-technology.com/roche/images/roche7.jpg> 2011)

### 2.5.3 Uzama (Extension)

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polimeraz) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polimerase 72°C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (Erlich vd. 1991). Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek primerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Karslı vd. 2006) (Şekil 2.5). PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır (Hadidi vd. 1995).



Şekil 2.5 Primerlerin Uzaması

(<http://www.pharmaceutical-technology.com/roche/images/roche8.jpg> 2011)

Üç basamaktan oluşan bu işlemler, bir PCR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır.

## **2.6 PCR Optimizasyonu**

PCR teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PCR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PCR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuarda yeniden ayarlanması gerekmektedir (Hadidi vd. 1995). Eğer PCR şartları yeni PCR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle karşılaşılabilir. Bu problemler; PCR'dan beklenen ürün ya az alınır yada hiç alınmaz, primerlerin yanlış bağlanmasından dolayı spesifik olmayan bantlar oluşabilir, primerler yanlış şekilde uzayabilir, primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemini yavaşlatır, yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon veya istenilenden farklı diziler ortaya çıkabilir (Innis ve Gelfand 1990, Erlich vd. 1991, Hadidi vd. 1995).

## **2.7 PCR Çalışma Şartlarını Etkileyen Faktörler**

### **2.7.1 Enzimler ve konsantrasyonları**

PCR için termostabil DNA polimerazların kullanılması büyük bir teknolojik ilerleme olup araştırma ve klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Termostabil enzimler kullanılmadan önce *E. coli* DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti ve T4 DNA polimeraz enzimi gibi sıcaklığa stabil olmayan enzimler kullanılmaktaydı. Bu enzimlerin taze çözeltilerinin her bir PCR döngüsüne eklenmesi gerekiyordu. Buna karşın termostabil enzimler PCR reaksiyonunun ileri aşamalarında reaksiyona eklenmesine gerek kalmaksızın sadece amplifikasyon yolunun başında eklenebilir. DNA polimeraz enzimi, yeni komplementer ipliğin sentezi için orijinal ipliklerden birini kalıp olarak kullanarak deoksiribonükleotit trifosfatlardan (dNTPs) uzun polinükleotit zincirinin sentezini katalizler. Polimerizasyon daima dNTP' in 5'  $\alpha$  fosfatından büyüyen/sentezi yapılan DNA ipliğinin 3' hidroksil grubuna doğru olduğu

için DNA sentezi daima 5'→3' yönünde ilerler (Innis ve Gelfand 1990, Erlich vd. 1991, Yang vd. 1992).

### **2.7.1.1 *Taq* DNA polimeraz**

*Taq* DNA polimeraz, *Thermus aquaticus*'tan elde edilmektedir. Isıya dayanıklıdır. PCR'da en yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. 5'- 3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Dolayısıyla sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Bu enzimler sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) ihtiyaç duyarlar (Devrim ve Kaya 2004). Diğer PCR şartları optimum seviyede olduğu zaman 100 µl reaksiyon için önerilen *Taq* DNA polimeraz enzim konsantrasyonu 1-2.5 ünedir. Fakat enzim gereksinimi kullanılan kalıp DNA veya primere göre değişebilir. Enzim konsantrasyonu düşük olursa elde edilecek ürün (DNA) az olur. Enzim konsantrasyonu yüksek olursa spesifik olmayan bantlar ortaya çıkabilir (Innis ve Gelfand 1990, Erlich vd. 1991, Yang vd. 1992).

### **2.7.1.2 Magnezyum konsantrasyonu**

PCR uygulamalarında magnezyum (Mg) iyon konsantrasyonunu ayarlamak çok önemlidir. Çünkü Mg konsantrasyonu primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasını, kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını, PCR sonucunda elde edilen DNA kalitesini, primer-dimer bağ oluşumlarını, enzim aktivitesi ve güvenilirliğini etkilemektedir. Ayrıca, *Taq* DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir. Bu yüzden 0.5-2.5 mM arasında Mg iyonlarının dNTP konsantrasyonu içerisinde bulunması gerekmektedir (Innis ve Gelfand, 1990, Hadidi vd. 1995).

### **2.7.1.3 dNTP konsantrasyonu**

Her bir deoksिनुकлеотид (Adenin (A), Guanin (G), Sitozin (C), Timin (T)) konsantrasyonu 20- 200  $\mu$ M arasında olduğunda genellikle PCR uygulamalarından iyi sonuç alınabilmektedir. Bu dört bazın konsantrasyon içerisindeki oranı eşit olmalıdır. Başlangıç stok solüsyonu 10 mM kadar seyreltildikten sonra, küçük hacimlere ayrılarak  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklanmalıdır. dNTP konsantrasyonunun yüksek olması yeni sentezlenen DNA dizilerinde istenilenden farklı dizilerin hatalı olarak ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu yüzden mümkün olduğu kadar düşük konsantrasyonda dNTP'leri kullanmak PCR spesifikliğini ve güvenilirliğini artırmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990, Hadidi vd. 1995, Weising vd. 1995).

### **2.7.2 Diğer reaksiyon unsurları**

PCR uygulamalarında genel olarak 10-50 mM arasında 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol- hidroklorik asit (Tris-HCl) tampon zltisi (pH 8.3- 8.8) kullanılır. Bu tampon zltinin  $20^{\circ}\text{C}$  de pH'sı 6.8 ile 7.8 arasında değişir. PCR karışımı içerisine 50 mM potasyum klorür (KCl) ilave edilirse primer bağlanmasını kolaylaştırır. Fakat 50 mM'ın zerindeki KCl veya 50 mM sodyum klorür (NaCl) Taq DNA polimeraz aktivitesini engeller. Ayrıca, PCR solüsyonuna jelatin, bovine serum albumin veya Tween 20 deterjanı eklenirse enzimin daha iyi çalışmasına yardımcı olurlar. Fakat bu maddeler eklenmeden de PCR protokolleri çok iyi bir şekilde çalışabilmektedir (Innis ve Gelfand 1990, Demeke ve Adams 1992, Henson ve French 1993).

#### **2.7.2.1 DNA zincirinin açılması için gerekli zaman ve sıcaklık**

PCR uygulamalarında sistemin çalışmamasının en önemli sebeplerinden birisi kalıp DNA zincirinin veya üretilen DNA parçacığının yeterince açılmamasıdır. Genel olarak DNA moleküllerinin  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dakika tutulması zincirin açılması için yeterli olmaktadır. Fakat G, C bazlarınca zengin kalıp DNA zincirlerinde bu süre ve sıcaklığın fazla olması istenmektedir (Innis ve Gelfand 1990, Erlich vd. 1991).

### **2.7.2.2 Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması**

Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması için gerekli sıcaklık derecesi ve zaman aralığı primerlerin konsantrasyonu, elde edilecek DNA'nın uzunluğu ve kullanılan bazların kompozisyonuna göre değişir. Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması 37- 65°C sıcaklıklarda gerçekleşir. Primerlerin açılan DNA'ya bağlanması sırasında sıcaklığın artırılması DNA seçiciliğini artırmaktadır. Dolayısıyla primerlerin yanlış yerlere bağlanması ve hatalı DNA dizilerinin elde edilmesi önlenmiş olmaktadır. Özellikle PCR işleminin ilk birkaç devrinde sıcaklığın artırılması PCR uygulamasının hassasiyetini çok yükseltmekte ve spesifik olarak beklenen DNA parçacıkları sentezlenmektedir. Sıcaklığın düşürülmesi primerlerin hatalı şekilde uzamasına ve yeni sentezlenen DNA dizilerinde hatalı baz bağlanmalarına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand 1990, Dieffenbach vd. 1993, Kwok vd. 1994).

### **2.7.2.3 Primer uzunluğu, konsantrasyonu ve yapısı**

Primer konsantrasyonunun 0.1-0.5 µM arasında olması sistemin iyi çalışmasını sağlamaktadır. Yüksek primer konsantrasyonu primerlerin yanlış bağlanmasına ve spesifik olmayan DNA bantlarının üretilmesine sebep olur. Ayrıca primer-dimer oluşumunu teşvik ederek elde edilecek ürünün (DNA) az olmasına sebep olmaktadır. Tipik primer uzunluğu 16-30 baz arasında değişmekte fakat genel olarak 18-24 baza sahip primerler eğer primer yapışma sıcaklığı (T<sub>m</sub>) da iyi ayarlanmış olursa çok spesifik ürün elde edilebilmektedir. Ancak daha kısa (14 bazdan aşağı) primerlerde bazı özel amaçlar için kullanılmaktadır (Innis ve Gelfand 1990, Dieffenbach vd. 1993, Kwok vd. 1994).

Primerlerin baz dizilişinde G ve C miktarı ve primerlerin yapışması için gerekli T<sub>m</sub> arasında çok iyi bir ilişki kurmak gerekir. Bu denge sağlanamadığı takdirde PCR uygulamalarından iyi sonuç almak mümkün olmamaktadır. Bu bakımdan primer dizilerinde G+C bazlarının toplam oranı % 50 veya daha yukarı olması istenmektedir. Örneğin bir primerin baz dizisinde G+C oranı % 50 ve T<sub>m</sub> değeri 56-62°C arasında olursa bu primerin sorunsuz bir şekilde çalışması beklenir. Primerlerin açılan DNA kalıplarına hatasız bir şekilde bağlanabilmesi için yapışma sıcaklığının iyi hesaplanması

gerekmektedir. Primerlerin yapışma sıcaklığını hesaplamak için bir formül geliştirilmiştir. Bu formül  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  şeklinde ifade edilmiştir (Innis ve Gelfand 1990, Dieffenbach vd. 1993).

Primerlerin 3' uçlarındaki baz dizilişi, primerin yanlış veya doğru yere bağlanmasını belirlemektedir. Eğer aşağı ve yukarı yönlü primerlerin karşılıklı olarak 3' uçlarında birbirlerine bağlanabilecek baz dizilişi mevcut olur ise bu durum istenmeyen primer-dimer oluşumlarına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand 1990).

#### **2.7.2.4 Primer uzaması**

Primerlerin DNA polimeraz tarafından uzatılması için gerekli zaman, çoğaltılması hedeflenen kalıp DNA parçasının uzunluğu, kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve ortam sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak primer uzatılma işlemi 72°C'de yapılmaktadır. Çünkü bu sıcaklık *Taq* DNA polimeraz enziminin iyi çalışması için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Primerlerin uzatılması için gerekli süre ise baz uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Innis ve Gelfand 1990, Dieffenbach vd. 1993).

#### **2.7.2.5 Devir sayısı**

PCR'ın çalışma şartları iyi ayarlandığı takdirde 25-40 devir sayısı yeterli olmaktadır. Devir sayısı çoğaltılacak kalıp DNA miktarı ile yakından ilişkilidir. Devir sayısının fazla olması spesifik olmayan bantların ortaya çıkmasına, devir sayısının az olması üretilen DNA miktarının az olmasına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand 1990, Watson vd. 1992).

### **2.8 PCR Çeşitleri**

PCR tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojiye çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PCR metotları geliştirilmiştir.

### **2.8.1 çoğaltılması istenen DNA dizisinin bilindiği durumlarda kullanılan PCR metotları**

Bu tip PCR metotlarında çoğaltılması hedeflenen DNA dizisinin sekans yapısı bilinmektedir. Oligonükleotid primer çifti kullanılarak çift sarmal DNA dizileri *Taq* DNA polimeraz enzimi tarafından 5'→3' yönünde okunmaktadır (Innis ve Gelfand 1990, Dieffenbach vd. 1993).

#### **2.8.1.1 Standart PCR (Standart PCR)**

Temel PCR'ı içermektedir. Bir PCR reaksiyonu için, 0.5 ml'lik PCR tüpü içerisinde 100 μl' lik bir reaksiyon oluşturmak için genel olarak aşağıda belirtilen kimyasallar tüpe ilave edilmektedir: Kalıp DNA ( $10^5$ ,  $10^6$  hedef molekül), 20 pmol yukarı yönlü primer, 20 pmol aşağı yönlü primer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3) (20°C), 1.5 mM magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ), 25 mM KCl\*, 0.05 % Tween 20\*, 50 μM dNTPs, 2 unite *Taq* DNA polimeraz enzimi Kalan miktar steril suyla 100 μl ye tamamlanır (Innis ve Gelfand, 1990). \* Bunlar reaksiyona eklenmese de PCR reaksiyonu çalışır.

#### **2.8.1.2 Ters transkriptaz PCR (RT-PCR)**

oğaltılması hedeflenen ribonükleik asit (RNA) nce ters transkriptaz enzimi ile tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya çevrilir ve daha sonra standart PCR kullanılarak çoğaltma işlemi yapılır (Rowhani vd. 1995, MacKenzie vd. 1996, Chandler vd. 1998).

#### **2.8.1.3 Katlı PCR (Multiplex PCR)**

Bu PCR metodunun aslında standart PCR ve RT-PCR'dan çok farklı bir yanı yoktur. Farklı olarak aynı kalıp DNA dizisini çoğaltmak amacıyla aynı reaksiyon içerisine birden fazla primer çifti ilave edilerek çoğaltma işlemi yapılmaktadır. Bu metot ağırlıklı olarak virüs ve viroidlerin genlerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır (Levy vd. 1992, Minafra vd. 1993).

#### **2.8.1.4 Antiserumla sabitleme PCR (Immunocapture PCR)**

PCR veya RT-PCR yapılmadan önce, geni çoğaltılacak virüs steril katı bir yüzey üzerinde o virüse spesifik antiserum kullanılarak sabitlenir. Bu işlemden sonra PCR veya RT-PCR metotlarına devam edilir ve hedef virüsün geni çoğaltılır. Bu metot özellikle bitki virüslerinin hastalıklı dokulardan veya vektör böceklerden izolasyonu ve tanılanması işlemlerinde kullanılmaktadır (Nolasco vd. 1993, Rowhani vd. 1995, Munford ve Seal 1997).

#### **2.8.1.5 İç içe PCR (Nested PCR)**

PCR tekniğinin spesifikliğini artırmak amacıyla Nested PCR ve Heminested PCR metotları geliştirilmiştir. Nested PCR metodunda iki farklı set primer çifti (P1, P2 ve P3, P4) kullanılır. İlk çoğaltma işleminde birinci set P1 ve P2 kullanılır. Bu PCR çoğaltma işlemi sonucunda elde edilen DNA dizisi üzerinde ikinci set P3 ve P4 kullanılarak yeniden çoğaltma işlemi yapılır. İkinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçası birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasından daha kısa ve birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasının içerisinde yer alır. Heminested PCR metodu ise aslında Nested PCR metodunun aynısıdır. Fakat Heminested PCR metodunda ikinci PCR çoğaltma işlemi iki yeni primer ile değil de sadece bir yeni P3 ve bir birinci setten alınan P1 veya P2 ile yapılmaktadır (Spiegel vd. 1996, Rosner vd. 1997).

#### **2.8.1.6 Renkli PCR (Colorimetric PCR)**

Son zamanlarda RT-PCR metodunun spesifikliğini ve enzim ilintili immün test (ELISA) serolojik yönteminin kullanma kolaylığını birleştiren bir methodur. Çoğaltılan DNA parçacıkları yeni bir tüp içerisine ilave edilir. Bu tüp önceden biotin ile işaretlenmiş, çoğaltılan DNA parçacıklarının belirli bir bölgesine spesifik problemlerle kaplanır. Bu problemler üzerindeki biotin, streptavidin ilavesiyle tespit edilir. Daha sonra da digoxigenin veya psoralin işaretleme sistemi kullanılarak çoğaltılan DNA parçacıkları tespit edilir. Eğer sistem hatasız çalışıp hedef gen parçasını çoğalttı ise tüp içerisinde

renk değişimi ortaya çıkmaktadır (Kemp vd. 1989, Walter vd. 1996, Rowhani vd. 1998).

#### **2.8.1.7 Damlatma PCR (Spot PCR)**

Virüs veya viroid içeren hastalıklı bitki özsuyu ya naylon membran üzerine bir damla damlatılır ya da yeni kesilmiş dal veya yaprak parçası membran üzerine bastırılarak özsuyunun membrana geçmesi sağlanır. Bu işlemden sonra bu membran parçasığı bir mikrofütj tüp içerisine konularak RT-PCR işlemi yapılır. Bu teknik özellikle arazi uygulamalarında çok yararlı olmaktadır (La Notte vd.1997).

#### **2.8.1.8 Kademeli sıcaklık düşürme PCR (Touchdown PCR)**

Bu teknik, standart PCR çalışmalarına çok benzemektedir. Bu PCR’da farklı olarak primer sıcaklıkları ilk önce çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziyeye bağlanması amaçlanmaktadır. Primerin bağlanma sıcaklığı ilk önce 65°C tutulmakta ve her döngüde 1°C azaltılarak (10 döngü) 56 °C’ye kadar düşürülmektedir. 56°C’den sonra ise 20-25 döngü yapılarak PCR tamamlanmaktadır. PCR tekniği, DNA dizileri üzerindeki belirli bir bölgenin spesifik olarak tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Don vd. 1991).

#### **2.8.1.9 Canlı hücre belirleyen PCR (Bio PCR)**

Bu teknik, ağırlıklı olarak bitki patojeni bakterilerin canlı olarak tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Tekniğin temeli, hastalıklı dokulardan izole edilen bakterilerin spesifik ya da yarı spesifik ortamlarda geliştirildikten sonra DNA izolasyonu yapılması ve bu DNA’dan PCR reaksiyonu kurulmasına dayanmaktadır (Schaad vd. 1997).

## **2.8.2 oğaltılması istenen DNA dizilerinin bilinmediği durumlarda kullanılan PCR metotları**

Bu tip PCR metotlarında çoğaltılması amaçlanan DNA dizisinin baz dizilimi ya çok az bilinir veya hiç bilinmez. Bu tip baz dizilerini çoğaltmak için farklı PCR metotları geliştirilmiştir.

### **2.8.2.1 RAPD-PCR**

Bu teknik, DNA dizilişi bilinmeyen veya az bilinen DNA fragmentlerinin analizlerinin yapılmasında kullanılmaktadır. Rastgele hazırlanmış 6-10 baz uzunluğundaki oligonükleotid primerleri ile PCR yapılır ve PCR rnleri agaroz jelde yrtlp ethidium bromide ile boyanır. Karşılaştırılan rnekler arasında görünen monomorfik ve polimorfik DNA bantları sayılarak sonuçlar değerlendirilmektedir. RAPD-PCR, genetik çeşitliliğin araştırılmasında, genom haritalamalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır (Cenis 1993).

### **2.8.2.2 Ters PCR (Inverse-PCR)**

Bilinen DNA dizileri kullanılarak, bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır (Ochman *vd.* 1988). Tekniğin temeli, bilinen sekanslara bitişik olarak bulunan fakat bilinmeyen bazlara sahip olan DNA bazlarının çoğaltılmasında kullanılmaktadır. Bilinen diziler ters çevrilerek ie alındığı için bu şekilde adlandırılmaktadır (Triglia *vd.* 1988).

### **2.8.2.3 Kanca PCR (Anchored PCR)**

Bu metot, DNA fragmentinin sadece bir ucunun baz dizilişi bilinip diğer ucunun bilinmediği durumlarda kullanılmaktadır. Baz dizilişi bilinmeyen tarafa universal primerler kullanılırken baz dizilişi bilinen tarafa bir primer sentezlenerek PCR işlemi yapılır. Bu teknik daha çok virüs ve viroidlerin gen dizilişlerinin tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Loh *vd.* 1989).

#### **2.8.2.4 Asimetrik PCR**

Bu PCR metodu, tek iplikçikli DNA dizilerinin üretilmesinde kullanılır. Bu amaçla PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin konsantrasyonları farklı oranlarda (50:1, 100:1 gibi) tutulmaktadır. PCR reaksiyonunda başlangıçtaki primerlerin oranlarının farklı olması elde edilecek üründe farklı oranda çoğaltılmasına sebep olur ve üretilen DNA fragmentlerinden birinin miktarı (başlangıçta fazla olan) çok artar. Aynı zamanda çok miktarda tek iplikçikli DNA dizileri üretilmiş olur. Bu tip tek iplikçikli DNA dizileri klonlama işlemleri ve farklı uygulamalarda kullanılabilir (Scott ve Deahl 1998).

#### **2.8.3 PCR'in diğer tekniklerle birlikte kullanıldığı metotlar**

Bazı moleküler çalışmalar, farklı yöntemlerin birlikte kullanılması ile yapılmaktadır. Bu tekniklerin belli basamaklarında PCR kullanılmaktadır.

##### **2.8.3.1 Çoğaltılan fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (AFLP)**

Bu teknikte, genomik DNA iki restriksiyon enzimi ile kesilmekte, kesilen parçacıklar bu enzimlere uygun bağlayıcılarla bağlanır. Bağlanan DNA parçacıkları, AFLP primerlerine birer baz ilave edilerek ön PCR yapılır. Daha sonra bu primerlerin her birine 2 baz ilave edildikten sonra (primerlerin biri biotin veya <sup>33</sup>P ile işaretlenir) seçici PCR yapılır. Bu PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra X-ray filmi üzerine görüntü aktarılır. Metot, genom haritalarının yapılmasında, genom varyasyonlarının belirlenmesinde yoğun şekilde kullanılmaktadır (Semblat vd. 1998, Tzortzakakis vd. 1999).

##### **2.8.3.2 PCR ürününün enzimle kesilmesi (PCR-RFLP)**

Bazı çalışmalarda PCR ürünleri arasında farklılık görülmez bu durumda PCR ürünleri bir veya birkaç restriksiyon enzimi kullanılarak kesilmektedir. Böylece çalışılan DNA örnekleri üzerinde varsa farklılıklar belirlenebilmektedir (Wetzel vd. 1991).

### **2.8.3.3 Çoğaltılmış DNA dizilerinin enzimle kesilmesi (CAPS)**

Üzerinde çalışılan organizmanın genomuna özgü belli DNA fragmentlerinin sekansı yapılarak bunlara özgü primerler oluşturulmakta ve bu primerlerle PCR yapılmaktadır. PCR ürünlerinden genelde tek bir DNA bandı elde edilmektedir ve bunlar arasında herhangi bir farklılık yoktur. Bu nedenle kesim enzimleri ile PCR ürünleri kesilmekte ve agaroz jelde elektroforez yardımı ile ayrımları sağlanarak farklılık tespit edilmektedir (Jarvis vd. 1994).

### **2.8.3.4 RAPD bantlarının spesifik primere dönüştürülmesi (SCAR)**

Bu teknikte, RAPD sonucu elde edilen DNA bantları klonlanmakta ve DNA baz dizilişleri belirlenmektedir. Bu farklılık gösteren DNA parçacığının bir bölümüne 18-24 baz uzunluğunda spesifik primerler dizayn edilmekte ve PCR çalışmasında kullanılmaktadır. Bu teknik haritalama çalışmalarında, genom kütüphanelerinin taranmasında kullanılmaktadır (Weising vd. 1995)

## **2.9 PCR Kullanım Alanları**

1. DNA'nın dizi analizi ve DNA haritalamasında,
2. İnsan genom projesindeki araştırmalarda,
3. Genetik hastalıkların teşhisinde,
4. DNA parmak izi analizinde,
5. Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde,
6. Allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde,
7. Tarımda (tohum saflığının belirlenmesi),
8. Sistemik ve evrim çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde),
9. Klonlama deneylerinde,
10. Mutageniz çalışmalarında,
11. Fosil DNA çalışmalarında,
12. Gen ifadelerinin karşılaştırılmasında kullanılmaktadır (Birben 2006).

## 2.10 PCR'in Avantajları

1. Hızlı olması
2. Günlük numune çalışma sayısı yüksek olması (~200 numune/gün).
3. Düşük kontaminasyon riski
4. Geniş dinamik aralıkta ürün elde edilebilmesi (10 - 1010 kopya)
5. Tekrarlanabilir olması
6. Sonuçların hesaplanabilir olması

## 2.11 PCR'in Dezavantajları

1. Günümüz teknolojisi ile eşzamanlı maksimum 3 reaksiyon yürütülebilmektedir
2. Yüksek teknik beceri ve teknik destek gerektirir
3. Kullanılan cihaz, teçhizat vs. maliyeti yüksektir.
4. PCR çok gelişmiş bir teknik olmasına rağmen bazı sınırları vardır. Hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilerin gerekli olması ve nispeten kısa bir ürün elde edilmesi bunlardan bazılarıdır ayrıca diğer DNA kaynaklarından çok küçük miktarda bir bulaşma bile sorunlara neden olabilir.
5. Laboratuvar çalışmalarından dökülebilecek deri parçaları, bir fosilden ya da suç mahalinden DNA örneğine buluşabilir. Ve doğru sonuç alınmasını engelleyebilir.
6. PCR reaksiyonu çok dikkatli ve kontrollü yapılmalıdır.

## 2.12 RAPD-PCR

DNA temeline dayalı polimorfizm araştırmaları, hayvan türlerinin genetik analizlerinde ilerleme kaydedilmesini sağlamaktadır. Hayvan popülasyonlarında birbirini tamamlayıcı nitelikte olan mikrosatelit, RFLP gibi farklı moleküler işaretleyiciler kullanılmakla birlikte günümüzde RAPD tekniği de kullanılmaktadır (Devrim ve Kaya 2006).

Williams vd. (1990), bu tekniği ilk kez rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA olarak tanımlamış ve genetik polimorfizmi belirleyen, yeni bir teknik ortaya koymuşlardır. PCR metoduna dayalı olan bu teknikte, rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotit primer

kullanılarak genomik DNA üzerinde belirlenen parçacıklar çoğaltılmakta olup reaksiyonun gerçekleşmesi için araştırılan genomun baz dizimi hakkında herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç yoktur.

RAPD tekniği kullanılarak belirlenen DNA polimorfizmi; agaroz jelde RAPD bandının varlığı ya da yokluğu ile kendini göstermekte ve genomda şekillenen delesyon, insersiyon veya primer bağlanma bölgelerindeki ya da bölgeler arasındaki nükleotit diziliminin farkını yansıtmaktadır. Rastgele primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltabilme potansiyeli ve çoğalan DNA parçacıklarının genetik sınıflara özgü tabiatı RAPD tekniğini genetik uzaklık ve filogenetik araştırmalar için tercih edilir hale getirmiştir. RAPD tekniğinin aşamaları şu şekildedir:

- PCR işleminde kullanılacak olan primerlerin, nükleotid dizileri belli bir kriter olmaksızın rastgele seçilir ve sentezi yapılır.
- Rastgele seçilen bu primerler kullanılarak araştırılan genomik DNA'da PCR uygulamasına başlanır. PCR işlemi sırasında primerler genomik DNA'da simetriği olan bölgelere yapışır ve bu bölgeler geometrik olarak çoğalır.
- Çoğalan bu DNA parçacıkları, elektroforez yöntemiyle agaroz jelde yürütülür.
- Etidyum bromid ya da radyoaktif maddelerle boyanarak molekül büyüklüklerine göre sıralanan ve bantlaşma gösteren DNA parçacıkları değerlendirilerek DNA üzerindeki genetik polimorfizm belirlenir (Devrim ve Kaya 2006).

Standart bir PCR'da, genellikle her biri 18-25 baz uzunluğunda, DNA iplikçiğine spesifik primer kullanılmaktadır. Primerdeki baz diziliş sırası, hedef dizinin yan bölgesindeki DNA dizi bilgisine dayalıdır. Ayrışarak tek iplikçiğe dönüşmüş DNA kalıbındaki bu spesifik bölgelere, PCR'ın yapışma fazında primerler bağlanır ve çoğalacak bölgeleri tanımlar.

RAPD tekniğinin PCR aşamasında ise, rasgele dizilimdeki primerler kullanılmaktadır. Rasgele seçilmiş primerler, RAPD'in yapışma fazı boyunca tamamlayıcısı olan bölgelere bağlanmaktadır. Eğer primerlerden ikisi karşılıklı iplikçiklerdeki kalıba uygun bölgede ve çoğalabilecek mesafede (yaklaşık 2500 veya daha az baz uzunluğu) bağlanırlarsa bu durumda farklı bir parçacık çoğalabilmektedir. Her bir RAPD primeri aynı PCR esnasında, farklı lokuslardan farklı sayılardaki ( 1-10 veya daha fazla) DNA

parçacıklarını çoğaltabilme potansiyeline sahiptir. Diğer bir ifadeyle farklı primerler farklı RAPD polimorfizmlerini ortaya çıkartmaktadır. Amplifikasyon sonucunda oluşan DNA ürünleri agaroz jel elektroforezine tabi tutulur. Örneklerin hepsinde bulunan RAPD bantları monomorfik olarak kabul edilmektedir. Bazı bireylerde bulunmayan veya değişken mobiliteye sahip olanlar ise polimorfik olarak kabul edilmektedir. Elde edilen RAPD bantlarında gözlemlenen polimorfizmlerin, genetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli olduğu kabul edilmiştir (Devrim ve Kaya 2006).

Her bir örneğe ait bant profilleri birbirleri ile karşılaştırıldığında, benzer bant profili gösteren örnekler “genetik anlamda ilişkili” şeklinde yorumlanmaktadır (Ütük vd. 2005).

RAPD polimorfizmleri, primer yapışmasını önleyen bir veya her iki primer bağlanma bölgesindeki dizi farklılığından kaynaklanmaktadır. RAPD polimorfizmleri primer bağlanma bölgesinin varlığını veya bulunduğu bölgeyi etkileyen ve bu bölgeler arası kısmın ölçüsünü değiştiren mutasyonlardan kaynaklanabildiği gibi, amplifikasyonu önleyen mutasyonlardan (delesyon, insersiyon, inversiyon gibi) da kaynaklanabilmektedir. RAPD polimorfizmleri, varyasyon oluşumunda ve nokta mutasyonlarında olduğu gibi, primer bağlayan bölgeler arasındaki alanların farklılıklarından da kaynaklanmaktadır (Devrim ve Kaya 2006).

RAPD dominant genetik marker olarak kabul edilir ve gen haritası çıkarılması çalışmalarında bu hesaba katılır (Çiftçi 2003). Rastgele primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltma potansiyeli ve çoğalan DNA parçacıklarının genetik sınıflara özgü tabiatı RAPD tekniğini genetik uzaklık ve filogenik araştırmalar için tercih edilir hale getirmiştir (Devrim ve Kaya 2006). RAPD metodu populasyon içi genetik polimorfizmin belirlenmesinde, populasyon içi ve populasyonlar arası genetik farklılaşmanın belirlenmesinde, hibridizasyon çalışmalarında, gen coğrafyası çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır ve taksona özgü moleküler markırlar olması durumunda taksonomik konularda bir hayli belirleyicidir (Spiridonova vd. 2008a).

### 2.12.1 RAPD tekniğinin değişkenleri

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır. En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, denatürasyon sıcaklığı, primer konsantrasyonu RAPD tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR'da oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir. RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir. Bu metotta kullanılan primerler 9-10 bç uzunluğundadır. Kullanılan primerlerin, PCR'da kullanılan diğer primerlerde olduğu gibi herhangi bir palindromik dizi içermemesi, %50-80 oranında G+C oranına sahip olması gerekir. RAPD tekniğinde çoğaltma, kullanılan primerin uzunluğuna, primerin G-C içeriğine ve primer dizisindeki tek bir nükleotidin yerine duyarlıdır. Bu teknikte MgCl<sub>2</sub>, dNTP ve *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonlarının çalışılan türe özgü optimum koşullarının belirlenmesi reaksiyonun tekrarlanabilirliği açısından gereklidir (Aydın 2004).

### 2.12.2 RAPD tekniğinin avantaj ve dezavantajları

RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir. Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilir. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. RAPD karakterlerinin sayısı ihtimal olarak sınırsızdır. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu açıdan yakın türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır. Farklı araştırmacılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik problemlerin çözümünde RAPD belirteçlerin kullanımı güçlü bir şekilde savunulmaktadır (Aydın 2004).

Bununla beraber metodun dezavantajları da vardır. RAPD tekniğinde ana güçlük sonuçta oluşan bant profillerinin reaksiyon şartlarındaki varyasyonlara, DNA kalitesine ve PCR ısı profiline çok duyarlı olmasıdır (Devrim ve Kaya 2006).

RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterozigotları teşhis etmek zordur. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden evvel yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Aydın 2004). RAPD metodunun etkinliğinin diğer metodlarla (RFLP ve mikrosatelit) karşılaştırılması Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 RAPD ile RFLP ve mikrosatelit yöntemlerinin karşılaştırılması (Devrim ve Kaya 2006)

<b>Kriterler</b>	<b>RAPD</b>	<b>RFLP</b>	<b>Mikrosatelit</b>
DNA hakkında ön bilgi gereksinimi	-	+	+
Restriksiyon enzimleri ile muamele	-	+	+
PCR uygulaması	+	-	+
Southern hibridizasyonu ve transferi	-	+	-
Agar-jel elektrofezi	+	+	+
Elde edilen polimorfik bant sayısı	Yüksek	Orta	Yüksek
Elde edilen bant özelliği	Dominant	Ko-dominant	Ko-dominant
Maliyet	Düşük	Orta	Orta

### 2.12.3 RAPD tekniğinin uygulama alanları

RAPD belirteç sistemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesinde, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, adli tıp, klinik teşhis,

prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Aydın 2004).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Sistemik laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan dokular, daha önceden toplanmış örnekleredir. Çalışmada kullanılan örnekler Türkiye'nin, Trakya ve Karadeniz bölgelerinden 16 lokaliteden toplanan ve teşhisleri yapılan *Mus* örnekleri (N = 87) ve dış grup olarak kullanılan aynı altfamilyadan *Apodemus* (N = 2) ve Arvicolinae altfamilyasından *Arvicola terrestris* (N = 2) örneklerinden oluşmaktadır. Örnekler Ankara Üniversitesi Omurgalı Hayvan Sistematiği laboratuvarında uygun koşullarda tahnit edilip kas, karaciğer, kalp, böbrek dokuları alınmıştır. Örnekler ait dokular -86°C'de, postlar ise Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Müzesi'nde korunmaktadır. Çeşitli bölgelerden toplanan *Mus* örnekleri çizelge 3.1'de, kullanılan dış gruplar çizelge 3.2'de, örneklerin toplandığı lokaliteleri gösteren harita ise şekil 3.1'de verilmiştir (1 numaralı örnek çalışmadan çıkarılmıştır).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı lokaliteler

Sıra No	Kayıt No	Tür ismi	Bölge
1	3963	<i>Mus</i>	Beykoz- İSTANBUL
2	3947	<i>M. domesticus</i>	Körübatı- DÜZCE
3	3948	<i>M. domesticus</i>	Körübatı- DÜZCE
4	3936	<i>M. domesticus</i> *	Samandere- DÜZCE
5	4224	<i>M. domesticus</i> *	Hacıyakup köyü- DÜZCE
6	3950	<i>M. domesticus</i> *	Samandere- DÜZCE
7	3900	<i>M. domesticus</i> *	Akçakoca-DÜZCE
8	3893	<i>M. domesticus</i> *	Saka köyü-ZONGULDAK
9	3953	<i>M. domesticus</i> *	Karaelmas Ü.- ZONGULDAK
10	3894	<i>M. domesticus</i>	Karaelmas Ü. - ZONGULDAK
11	3952	<i>M. domesticus</i>	Karaelmas Ü.- ZONGULDAK
12	4090	<i>M. domesticus</i>	Çerdek köyü-BARTIN
13	4091	<i>M. domesticus</i>	Çerdek köyü-BARTIN
14	4053	<i>M. domesticus</i> *	Çerdek köyü-BARTIN

\*: Bant profillerine göre belirlenen türler.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı lokaliteler (devam)

Sıra No	Kayıt No	Tür ismi	Bölge
15	4051	<i>M. domesticus</i> *	Çerdek köyü-BARTIN
16	4092	<i>M. domesticus</i> *	BARTIN
17	2805	<i>M. domesticus</i>	Kurupelit-SAMSUN
18	2806	<i>M. domesticus</i>	Kurupelit-SAMSUN
19	3411	<i>M. domesticus</i>	Gelemen-SAMSUN
20	3412	<i>M. domesticus</i>	Gelemen-SAMSUN
21	5119	<i>M. domesticus</i>	Kavak-SAMSUN
22	5120	<i>M. domesticus</i>	Kavak-SAMSUN
23	2876	<i>M. domesticus</i> *	Kurupelit-SAMSUN
24	2878	<i>M. domesticus</i> *	Kurupelit-SAMSUN
25	3781	<i>M. domesticus</i>	Fatsa-ORDU
26	3782	<i>M. domesticus</i>	Fatsa-ORDU
27	3783	<i>M. domesticus</i>	Fatsa-ORDU
28	3853	<i>M. domesticus</i>	Fatsa-ORDU
29	3426	<i>M. macedonicus</i>	Efrili-ORDU
30	3429	<i>M. macedonicus</i>	Efrili-ORDU
31	3854	<i>M. macedonicus</i>	Efrili-ORDU
32	3470	<i>M. macedonicus</i> *	Efrili-ORDU
33	3833	<i>M. domesticus</i>	Kesap-GİRESUN
34	3834	<i>M. domesticus</i>	Kesap-GİRESUN
35	3857	<i>M. domesticus</i> *	Kesap-GİRESUN
36	3855	<i>M. domesticus</i> *	Kesap-GİRESUN
37	3856	<i>M. domesticus</i> *	Kesap-GİRESUN
38	3830	<i>M. domesticus</i>	Sürmene-TRABZON
39	3836	<i>M. domesticus</i>	Sürmene-TRABZON
40	3858	<i>M. domesticus</i>	Yomra-TRABZON
41	3859	<i>M. domesticus</i>	Yomra-TRABZON
42	3835	<i>M. domesticus</i> *	Sürmene-TRABZON
43	3837	<i>M. domesticus</i> *	Sürmene-TRABZON
44	3771	<i>M. domesticus</i>	İkizdere-RİZE
45	3772	<i>M. domesticus</i>	İkizdere-RİZE
46	3793	<i>M. domesticus</i>	Ardeşen-RİZE
47	3819	<i>M. domesticus</i>	İkizdere-RİZE
48	3826	<i>M. domesticus</i> *	İkizdere-RİZE

\*: Bant profillerine göre belirlenen türler.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı lokaliteler (devam)

Sıra No	Kayıt No	Tür ismi	Bölge
50	3792	<i>M. domesticus</i> *	Ardeşen-RİZE
51	3358	<i>M. domesticus</i> *	İkizdere-RİZE
52	3364	<i>M. domesticus</i> *	İkizdere-RİZE
53	3823	<i>M. domesticus</i>	Borçka-ARTVİN
54	3824	<i>M. domesticus</i>	Borçka-ARTVİN
55	3839	<i>M. domesticus</i>	Hopa-ARTVİN
56	3840	<i>M. domesticus</i>	Borçka-ARTVİN
57	3817	<i>M. domesticus</i> *	Borçka-ARTVİN
58	3809	<i>M. domesticus</i> *	Hopa-ARTVİN
59	3804	<i>M. domesticus</i> *	Hopa-ARTVİN
60	3376	<i>M. domesticus</i> *	Ardanuç-ARTVİN
61	3770	<i>M. domesticus</i> *	Borçka-ARTVİN
62	5461	<i>M. macedonicus</i>	EDİRNE
63	5462	<i>M. macedonicus</i>	EDİRNE
64	5464	<i>M. macedonicus</i>	Değirmenyani k.-EDİRNE
65	5465	<i>M. macedonicus</i>	Değirmenyani k.-EDİRNE
66	2457	<i>M. macedonicus</i>	Pınarhisar-KIRKLARELİ
67	2458	<i>M. macedonicus</i>	Pınarhisar-KIRKLARELİ
68	4360	<i>M. domesticus</i> *	Pınarhisar-KIRKLARELİ
69	4361	<i>M. domesticus</i> *	Demirköy- KIRKLARELİ
70	4364	<i>M. domesticus</i> *	Pınarhisar-KIRKLARELİ
71	4365	<i>M. macedonicus</i> *	Pınarhisar-KIRKLARELİ
72	2402	<i>M. macedonicus</i> *	Pınarhisar-KIRKLARELİ
73	2371	<i>M. macedonicus</i> *	Pınarhisar-KIRKLARELİ
74	5457	<i>M. macedonicus</i>	Büyükkarıştıran-TEKİRDAĞ
75	5458	<i>M. macedonicus</i>	Büyükkarıştıran-TEKİRDAĞ
76	4362	<i>M. domesticus</i>	Yuvalı-TEKİRDAĞ
77	4363	<i>M. domesticus</i>	Yuvalı-TEKİRDAĞ
78	4226	<i>M. domesticus</i> *	Gerede-BOLU
79	3944	<i>M. domesticus</i> *	Abant-BOLU
80	4220	<i>M. domesticus</i>	Mudurnu-BOLU
81	4221	<i>M. domesticus</i>	Mudurnu-BOLU
82	5888	<i>M. domesticus</i> *	Eskiçağa-BOLU

\*: Bant profillerine göre belirlenen türler.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı lokaliteler (devam)

Sıra No	Kayıt No	Tür ismi	Bölge
83	4772	<i>M. macedonicus</i>	Suluova-AMASYA
84	4819	<i>M. macedonicus</i>	Suluova-AMASYA
85	4886	<i>M. macedonicus</i> *	Suluova-AMASYA
86	5884	<i>M. macedonicus</i> *	Kullar-İZMİT
87	5887	<i>M. macedonicus</i> *	Kullar-İZMİT

\*: Bant profillerine göre belirlenen türler.

Çizelge 3.2 Çalışmada dış grup olarak kullanılan türlerin laboratuvar kayıt numaraları ve örneklerin toplandığı lokaliteler.

Sıra No	Kayıt No	Tür ismi	Bölge
88	5300	<i>Apodemus</i>	Çataldere-RİZE
89	5299	<i>Apodemus</i>	Çataldere-RİZE
90	4583	<i>A. terrestris</i>	KIRŞEHİR
91	4564	<i>A. terrestris</i>	KIRŞEHİR



Şekil 3.1 Türkiye’den *Mus*, *Apodemus* ve *Arvicola terrestris* örneklerinin toplandığı bölgeler. (*Mus domesticus*: ■ , *Mus macedonicus*: ■ , *Apodemus*: ● , *Arvicola terrestris*: ● )

### 3.2 Yöntem

DNA izolasyonu için, tüm örneklerin (*Mus* 87, *Arvicola* 2, *Apodemus* 2) ependorf tüplere konularak -86°C’de saklanan böbrek dokuları kullanıldı. Tüm dokulardan total DNA izole edildikten sonra, RAPD-PCR yöntemi ile amplifiye edilen DNA örnekleri, agaroz jel elektroforezinde koşturuldu.

### 3.3 DNA İzolasyonu

16 popülasyondan alınan *Mus* örneklerinin böbrek dokusundan DNA izole edildi. Dış grup olarak kullanılan örneklerin önceki çalışmalarda izole edilmiş olan DNA’ları kullanıldı. Bu işlemde daha önceden Doyle ve Doyle (1991)’un DNA izolasyon metodunun uyarlanmasıyla elde edilen setil Trimetil Amonyum Bromür (CTAB) DNA izolasyon metodu kullanıldı. Metot aşağıda belirtildiği gibi sırasıyla uygulandı:

Küçük parçalara ayrılan doku örnekleri ependorf tüpüne konulduktan sonra üzerine 300 µl CTAB (Kloroform, Tris-HCl, EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit), NaCl)

tamponu eklenip mümkün olduğu kadar homojen bir sıvı elde edinceye kadar tek kullanımlık havaneli ile ezildi. Homojenata sırasıyla 300 µl CTAB ve 50 µl βME (β-Merkapto etanol) eklenip ependorf tüp hafifçe karıştırıldı. Karışım 65°C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi. 500 µl kloroform: izoamil alkol (C: IAA) (24:1) ilave edilip karışım süte benzer bir kıvama gelinceye kadar hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm'de +4°C' de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen dokuların içinde olduğu ependorf tüpleri, aynı eğik açıda olacak şekilde buza yerleştirildi. DNA üstteki sıvı tabakada olacağından üst faz pipetle çekildi ve ayrı bir ependorf tüpüne konuldu. 500 µl -20°C'de soğutulmuş izopropanol tüplere eklendi ve tüpler yavaşça karıştırıldı. -80°C'de 30 dk bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet 2 kere %70, 1 kere de %100'lük etil alkol ile yıkandı. Ependorf tüpündeki pelletler laminar flow kabinde en az 1 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan DNA'nın üzerine 200 µl Tris- EDTA (TE) tamponu ilave edilerek 37°C'de 1 saat DNA'nın çözünmesi sağlandı. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.3.1 İzolasyonda kullanılan çözeltiler

#### CTAB Tamponu

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 (Toplam hacim steril distile su (H<sub>2</sub>O) ile 100 ml' ye tamamlandı)

#### TE Tamponu pH: 8.0

Tris Base çözeltisi (1M) : 1 ml

EDTA (0,5 M) : 20 µl

Tris Base : 1M pH: 8.0

EDTA : 0.5M pH: 8.0

NaCl : 5M

### 3.4 DNA Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen 91 DNA örneğinin spektrofotometre (Agilent 2100 Bioanalyser NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer) ile ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümden alınan DNA miktarı ve saflığı sonuçlarının tamamı çizelge 3.3’de gösterildiği gibidir. Bir böbreğin yarısından izole edilen DNA miktarları 542,0 ng/µl ile 9149,9 ng/µl arasında, saflıkları ise 1,85 ile 2,11 arasındadır. DNA örnekleri çalışma boyunca -20°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinden elde edilen DNA’ ların spektrofotometre ile ölçüm sonuçları.

Sıra No	Kayıt No	Lokalite	ng/ µl *	260/ 280 **
1	3963	Beykoz- İSTANBUL	998,3	2
2	3947	Körübatı- DÜZCE	1935,1	2
3	3948	Körübatı- DÜZCE	1569,3	1,99
4	3936	Samandere- DÜZCE	2216,5	1,99
5	4224	Hacıyakup köyü- DÜZCE	1347,2	2
6	3950	Samandere- DÜZCE	2296,1	2,11
7	3900	Akçakoca-DÜZCE	1751,8	2,05
8	3893	Saka köyü-ZONGULDAK	368,1	1,98
9	3953	Karaelmas Ü.- ZONGULDAK	2715,5	2
10	3894	Karaelmas Ü.- ZONGULDAK	4489	1,98
11	3952	Karaelmas Ü.- ZONGULDAK	2161,9	2,01
12	4090	Çerdek köyü-BARTIN	674,7	1,98
13	4091	Çerdek köyü-BARTIN	1444,8	2,03
14	4053	Çerdek köyü-BARTIN	1705,7	2,03
15	4051	Çerdek köyü-BARTIN	2058,3	2,01
16	4092	BARTIN	975,4	2,01
17	2805	Kurupelit-SAMSUN	2290,7	1,96
18	2806	Kurupelit-SAMSUN	1823,4	2,02
19	3411	Gelemen-SAMSUN	1235,8	1,91

\* : 1 µl’ deki ng cinsinden DNA miktarı

\*\* : Spektrofotometrede 260/280 nm’ de okutulan DNA’ nın saflık derecesi

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinden elde edilen DNA'ların spektrofotometre ile ölçüm sonuçları.

Sıra No	Kayıt No	Lokalite	ng/ µl *	260/ 280 **
20	3412	Gelemen-SAMSUN	1011,8	1,94
21	5119	Kavak-SAMSUN	3426,4	1,85
22	5120	Kavak-SAMSUN	1227,6	2
23	2876	Kurupelit-SAMSUN	1181,9	1,95
24	2878	Kurupelit-SAMSUN	3553,7	2
25	3781	Fatsa-ORDU	1522,7	1,97
26	3782	Fatsa-ORDU	2168,8	2
27	3783	Fatsa-ORDU	1989,5	1,99
28	3853	Fatsa-ORDU	737,7	2,02
29	3426	Efrili-ORDU	981,4	1,91
30	3429	Efrili-ORDU	2849,2	1,91
31	3854	Efrili-ORDU	1043,3	1,97
32	3470	Efrili-ORDU	1913,1	1,99
33	3833	Kesap-GİRESUN	1298,9	1,98
34	3834	Kesap-GİRESUN	2045,2	2
35	3857	Kesap-GİRESUN	542	2,07
36	3855	Kesap-GİRESUN	1081,1	1,95
37	3856	Kesap-GİRESUN	1578,2	1,95
38	3830	Sürmene-TRABZON	2506,2	1,99
39	3836	Sürmene-TRABZON	9149,9	1,96
40	3858	Yomra-TRABZON	2198	1,97
41	3859	Yomra-TRABZON	2116	1,99
42	3835	Sürmene-TRABZON	1670,2	2
43	3837	Sürmene-TRABZON	1855,6	1,98
44	3771	İkizdere-RİZE	1997,5	2
45	3772	İkizdere-RİZE	5199,2	1,99
46	3793	Ardeşen-RİZE	1374,3	2
47	3819	İkizdere-RİZE	1461,7	1,94
48	3826	İkizdere-RİZE	1798,4	2,01

\* : 1 µl' deki ng cinsinden DNA miktarı

\*\* : Spektrofotometrede 260/280 nm' de okutulan DNA' nın saflık derecesi

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinden elde edilen DNA'ların spektrofotometre ile ölçüm sonuçları.

Sıra No	Kayıt No	Lokalite	ng/ µl *	260/ 280 **
49	3794	Ardeşen-RİZE	940,8	1,94
50	3792	Ardeşen-RİZE	1335,5	2,11
51	3358	İkizdere-RİZE	2463,3	1,97
52	3364	İkizdere-RİZE	1040,7	1,94
53	3823	Borçka-ARTVİN	1103,1	2,01
54	3824	Borçka-ARTVİN	2410,4	2,02
55	3839	Hopa-ARTVİN	1550,7	2,02
56	3840	Borçka-ARTVİN	1611	2,05
57	3817	Borçka-ARTVİN	1600,3	1,89
58	3809	Hopa-ARTVİN	678,5	1,86
59	3804	Hopa-ARTVİN	1064,2	1,99
60	3376	Ardanuç-ARTVİN	1474,5	1,99
61	3770	Borçka-ARTVİN	2059,1	2,01
62	5461	EDİRNE	1536,6	1,99
63	5462	EDİRNE	1690,5	1,97
64	5464	Değirmenyani k.-EDİRNE	1392,4	1,97
65	5465	Değirmenyani k.-EDİRNE	4377,3	1,99
66	2457	Pınarhisar-KIRKLARELİ	2390,9	1,98
67	2458	Pınarhisar-KIRKLARELİ	3608,9	1,99
68	4360	Pınarhisar-KIRKLARELİ	2093,6	2,04
69	4361	Demirköy- KIRKLARELİ	1443,8	2,01
70	4364	Pınarhisar-KIRKLARELİ	2336,9	1,98
71	4365	Pınarhisar-KIRKLARELİ	1374,6	1,98
72	2402	Pınarhisar-KIRKLARELİ	1281,3	1,95
73	2371	Pınarhisar-KIRKLARELİ	767,8	1,95
74	5457	Büyükkarıştıran- TEKİRDAĞ	1065,7	1,96
75	5458	Büyükkarıştıran- TEKİRDAĞ	2069,9	2
76	4362	Yuvalı-TEKİRDAĞ	1577,5	2,03

\* : 1 µl' deki ng cinsinden DNA miktarı

\*\* : Spektrofotometrede 260/280 nm' de okutulan DNA' nın saflık derecesi

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan *Mus* örneklerinden elde edilen DNA'ların spektrofotometre ile ölçüm sonuçları.

Sıra No	Kayıt No	Lokalite	ng/ µl *	260/ 280 **
77	4363	Yuvalı-TEKİRDAĞ	792,5	1,99
78	4226	Gerede-BOLU	1679,7	2
79	3944	Abant-BOLU	1793,3	2
80	4220	Mudurnu-BOLU	1175,6	1,97
81	4221	Mudurnu-BOLU	1569	2,04
82	5888	Eskiçağa-BOLU	2500,1	1,97
83	4772	Suluova-AMASYA	2335,9	2,01
84	4819	Suluova-AMASYA	1694,9	2,02
85	4886	Suluova-AMASYA	2390,6	2,03
86	5884	Kullar-İZMİT	1576,5	2,02
87	5887	Kullar-İZMİT	1721,7	2,02

\* : 1 µl' deki ng cinsinden DNA miktarı

\*\* : Spektrofotometrede 260/280 nm' de okutulan DNA' nın saflık derecesi

Çizelge 3.4 Çalışmada dış grup olarak kullanılan *Apodemus* ve *Arvicola terrestris* örneklerinden elde edilen DNA'ların spektrofotometre ile ölçüm sonuçları

Sıra No	Kayıt No	Tür Adı	Lokalite	ng/ µl*	260/ 280 **
88	5300	<i>Apodemus</i>	Çataldere-RİZE	986,3	1,98
89	5299	<i>Apodemus</i>	Çataldere-RİZE	843,6	2,02
90	4583	<i>A.terrestris</i>	KIRŞEHİR	1235,8	2,11
91	4564	<i>A.terrestris</i>	KIRŞEHİR	1870,6	2,07

\* : 1 µl' deki ng cinsinden DNA miktarı

\*\* : Spektrofotometrede 260/280 nm' de okutulan DNA' nın saflık derecesi

### 3.5 RAPD Primerleri

Çalışmamızda kullanılan RAPD primerleri, rastgele seçilmiş 10 bazlık primerlerdir. Bunlar Operon A (OPA), Operon B (OPB), Operon D (OPD) ve Operon J (OPJ) serisi primerleridir (Thermo Electron). Toplam 64 primer ile ön deneme yapılmış ve bunlar arasında en iyi sonuç veren 18 tanesi çalışmalarda kullanılmıştır. Seçilen bu 18

primerden de 1 tanesi (OPA-03) ile RAPD tekniğinin tekrar edilebilirliğini test etmek amacıyla tekrar çalışması yapılmıştır. Primerler G+C içeriği %60–70 olacak şekilde seçilmiştir. Çalışmada kullanılan örnekler çizelgede baz dizileri verilen primerler ile taranmıştır (Çizelge 4.1).

### 3.6 RAPD-PCR

Bu çalışmada PCR amplifikasyonunda daha önceden Kaya ve Neale (1995) (Çizelge 3.5) tarafından uygulanan PCR döngü programının, bazı değişikliklerle laboratuvar koşullarına uyarlanan şekli kullanılmıştır. Çalışmada Thermo Electron Px2 Thermal Cycler marka PCR cihazı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan PCR döngü programı çizelge 3.6’da gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.5 Kaya ve Neale (1995) tarafından uygulanan PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	95°C	1 dakika	1
Denaturasyon	94°C	1 dakika	40
Bağlanma	37°C	1 dakika	
Uzama	72°C	2 dakika	
Son Uzama	72°C	15 dakika	1

Çizelge 3.6 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	95°C	1 dakika	1
Denaturasyon	94°C	1 dakika	45
Bağlanma	36°C	2 dakika	
Uzama	72°C	2 dakika	
Son Uzama	72°C	15 dakika	1

PCR optimizasyonu için herhangi bir yöntem denenmemiş olup laboratuvarımızda daha önceden optimize edilmiş olan yöntem kullanılmıştır. Bu çalışma için daha önce optimize edilen yöntemdeki reaksiyon karışımı aşağıda belirtilen miktarlarda aynen uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan reaksiyon karışımı;

1 µl DNA örneği,

2.5 µl tampon (750mM Tris-HCl ph: 8.8, 200mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>; Fermentas, Ukrayna),

0,3 µl (100 ünite) *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas, Ukrayna),

4 µl dNTP karışımı (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

2 µl 2mM MgCl<sub>2</sub>,

1 µl (1pmol) primer (Thermo Electron) den oluşmaktadır.

Toplam hacim 14.2 µl steril distile H<sub>2</sub>O ile 25 µl'ye tamamlanmıştır.

### 3.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri 5 µl yükleme tamponuyla (%40'lık sükröz, xylene cyanol FF ve Bromophenol Blue) karıştırılarak %1.5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Jeller 1X Trisma Base, Glacial Asetic Asid, EDTA (TAE) tamponunda 70 Voltta 4 saat yürütüldükten sonra 5µg/ml'lik etidyum bromid solusyonu ile 30 dakika boyanmış ve UV ışığı altında (KODAK Jel Görüntüleme Sistemi) görüntülenmiştir.

### 3.8 Jellerin Yorumlanması

Amplifikasyon ürünleri görsel olarak değerlendirilmiştir. Tüm bantlar değerlendirmeye alınmıştır. RAPD bantlarının büyüklüğünü belirlemek amacıyla 100–3000 baz çifti (bç) arasındaki bantları içeren DNA standardı (Generuler™ 100 base pair Plus DNA Ladder Fermentas) kullanılmıştır.

Çalışılan örneklerde bantlar var olma ve olmama durumuna göre değerlendirilmiştir. Var olan her bir haploit bant için "1" rakamı, olmayan bant için ise "0" rakamı kullanılmıştır.

### 3.9 Veri Analizleri

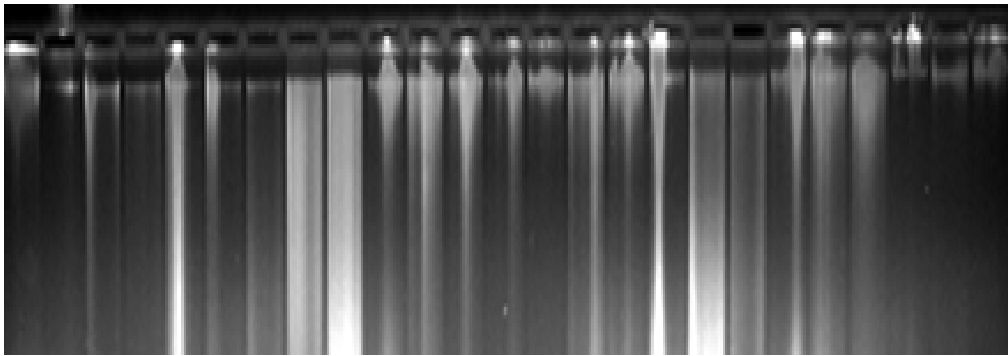
Veri dosyaları POPGENE (Yeh vd. 1997)'de analiz edilecek şekilde hazırlanmıştır. Her örnek için gözlenen allel sayısı, etkili allel sayısı Nei'nin genetik çeşitliliği (1987) ve Shanon information indeksi hesaplanmıştır. Ek olarak popülasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu ve tüm popülasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu Hardy-Weinberg beklentilerine göre hesaplanmıştır.

Alt popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü Nei (1987)'ye göre hesaplanmıştır. Gen akışı =  $0,5 \cdot (1 - \text{nispi genetik farklılaşma değeri}) / (\text{nispi genetik farklılaşma değeri})$  formülü kullanılarak her lokus için nesil başına göçlerin ortalama sayısını ve lokuslar arasındaki ortalama değeri hesaplamak için nispi genetik farklılaşma değeri kullanılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

16 lokaliteden toplanan 87 *Mus*, 2 *Arvicola* ve 2 *Apodemus* örneğinden izole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. DNA'ların varlığı belirlendikten sonra nanodrop spektrofotometrede ölçülerek saflık dereceleri ve miktarları belirlenmiştir (Çizelge 3.3-3.4). Şekil 4.1'de *Mus* örneklerinin bir bölümünün total DNA'larının agaroz jel üzerindeki görüntüsü verilmiştir. Toplanan 91 örnek tüm denemelerde kullanılmıştır ancak 1. örnek İstanbul lokalitesindeki tek örnek olduğu için analizlerden çıkarılmıştır.

RAPD-PCR çalışmalarında az sayıda ( $N = 4$ ) örnek ile 64 primer kullanılarak ön deneme yapılmış ve bunlardan en iyi sonuç veren 18 tanesi seçilerek tüm örnekler bu primerler ile çalışılmıştır. RAPD tekniğinin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla çalışılan primerlerin 1 (OPA-03) tanesi ile tüm örnekler kullanılarak tekrar çalışması yapılmış ve benzer sonuç alınmıştır. PCR işleminden sonra amplifikasyon ürünleri %1.5'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Bu 18 RAPD markerinden çalışılan tüm örnekler için 230 bant elde edilmiştir. Tüm örnekler için her bir primerden elde edilen bant sayısı çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Tüm örnekler için bant sayısının OPA-03 primerinde en düşük (6 adet), OPD-03 primerinde ise en yüksek (18 adet) olduğu belirlenmiştir.

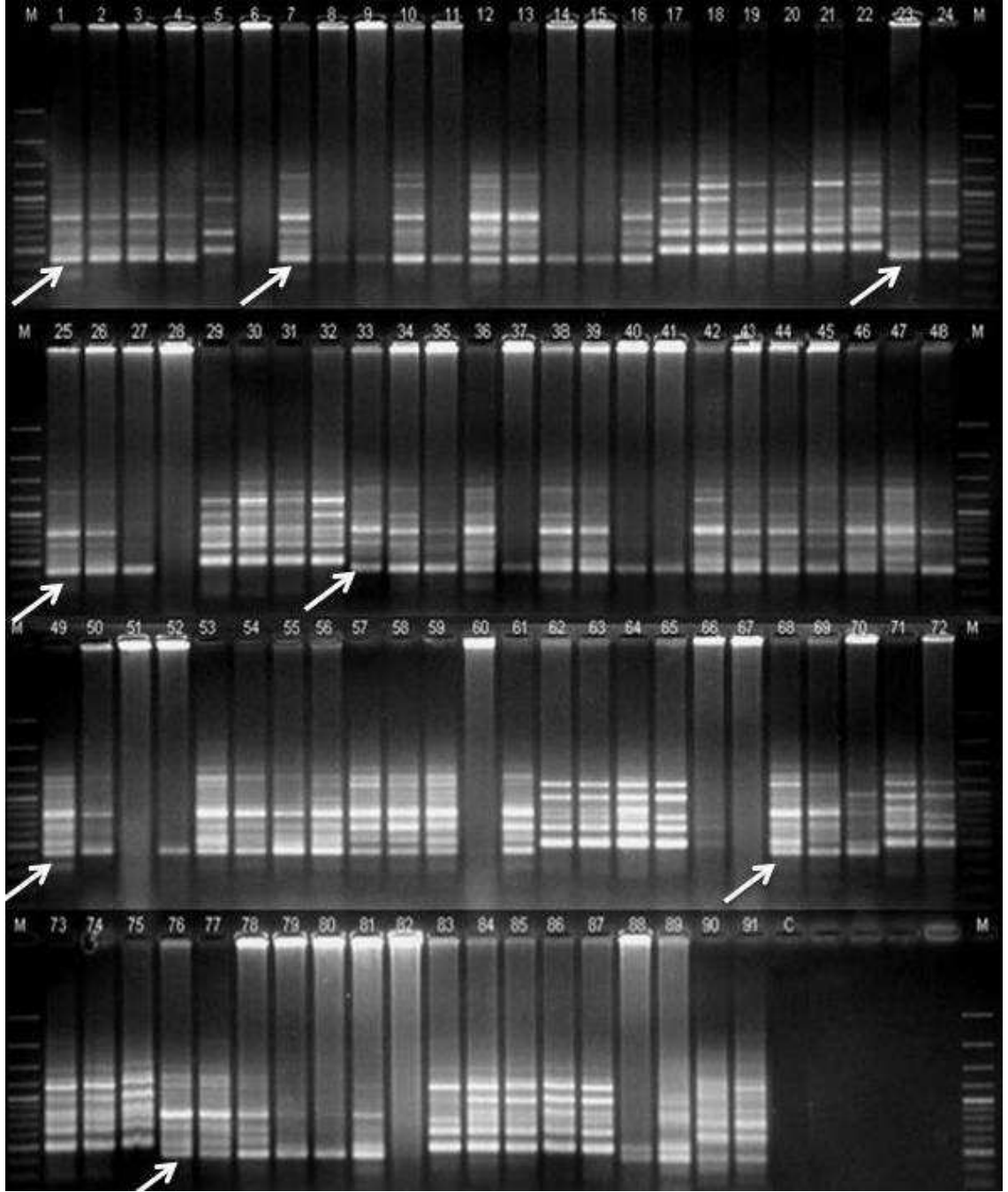


Şekil 4.1 Çalışılan *Mus* örneklerinin bir bölümünün total DNA'larının agaroz jel üzerindeki görüntüsü.

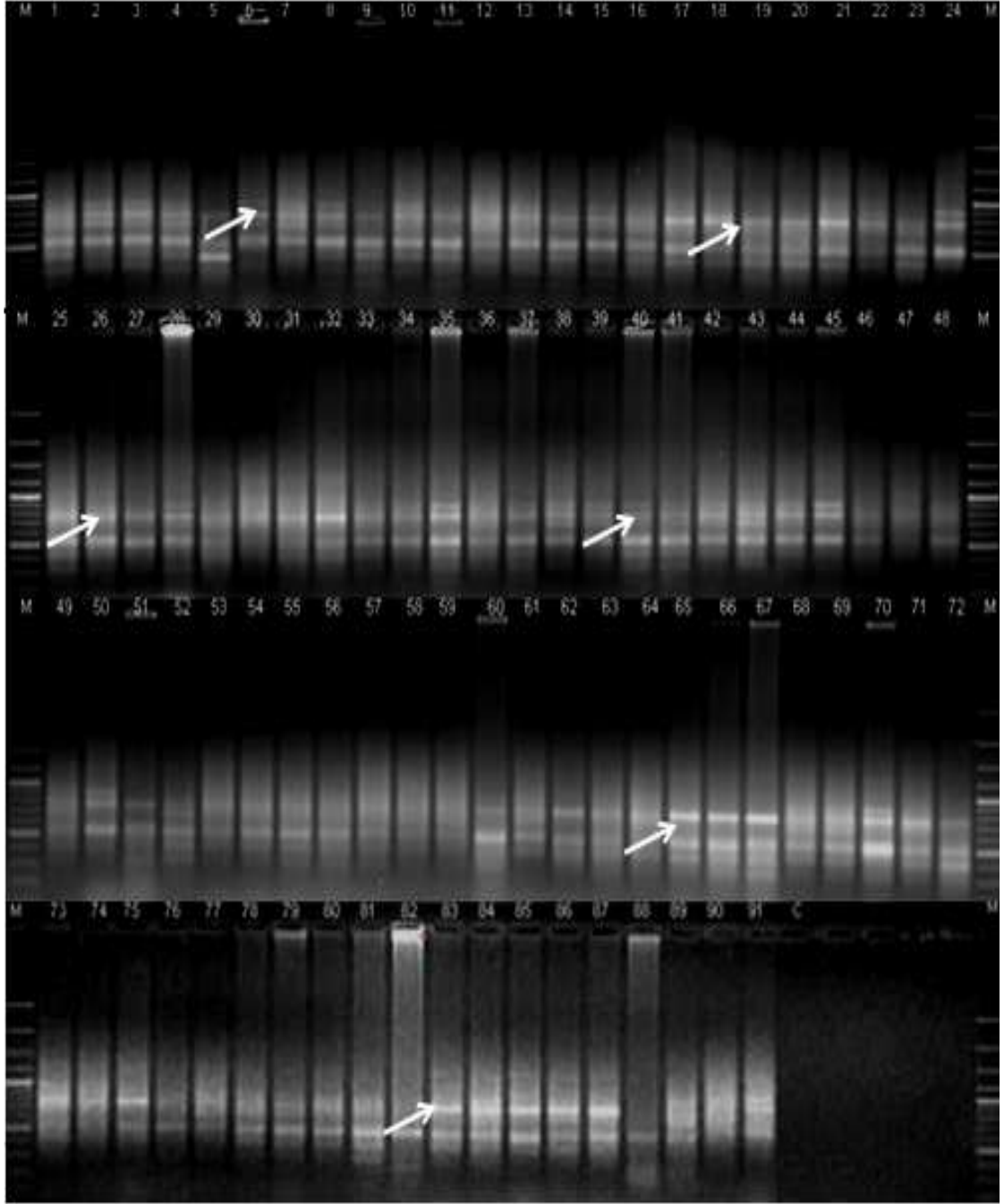
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan primerler ve her bir primerden elde edilen bant sayısı

Primer	Sekans (5' →3')	Tüm örnekler için bant sayısı
OPA-01	CAGGCCCTTC	10
OPA-03	AGTCAGCCAC	6
OPA-08	GTGACGTAGG	16
OPA-09	GGGTAACGCC	13
OPA-10	GTGATCGCAG	8
OPA-11	CAATCGCCGT	10
OPA-15	TTCCGAACCC	11
OPB-08	GTCCACACGG	14
OPB-12	CCTTGACGCA	9
OPB-17	AGGGAACGAG	16
OPB-18	CCACAGCAGT	15
OPD-03	GTCGCCGTCA	18
OPD-07	TTGGCACGGG	16
OPD-13	GGGGTGACGA	13
OPJ-09	TGAGCCTCAC	13
OPJ-12	GTCCCGTGGT	15
OPJ-14	CACCCGGATG	15
OPJ-19	GGACACCACT	12

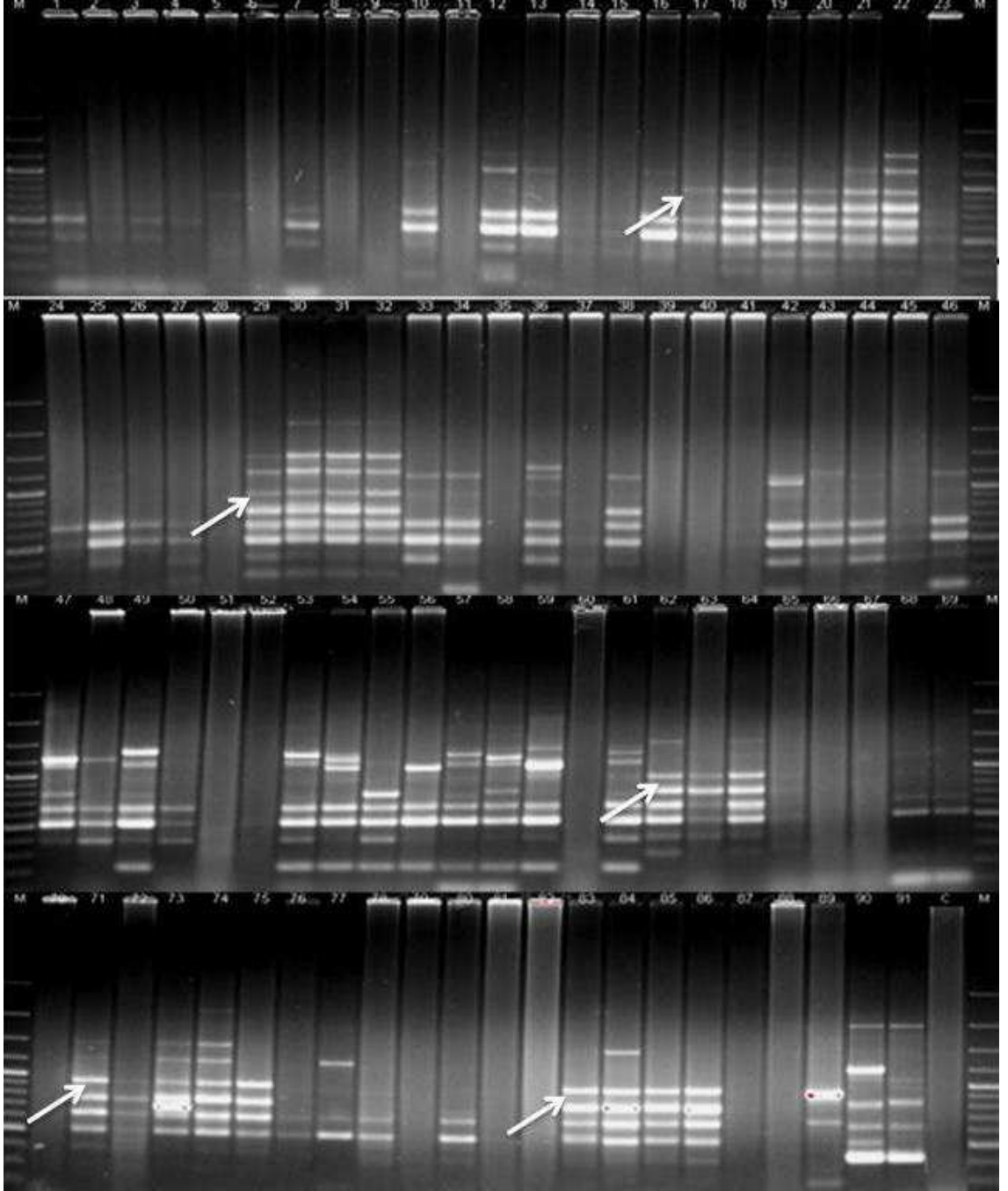
Çalışılan 18 primer ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4.2 – 4.19’da gösterilmiştir. Jeller üzerindeki oklar; *Mus* cinsine ve *M. domesticus* ile *M. macedonicus*’a özgü bantları işaret etmektedir.



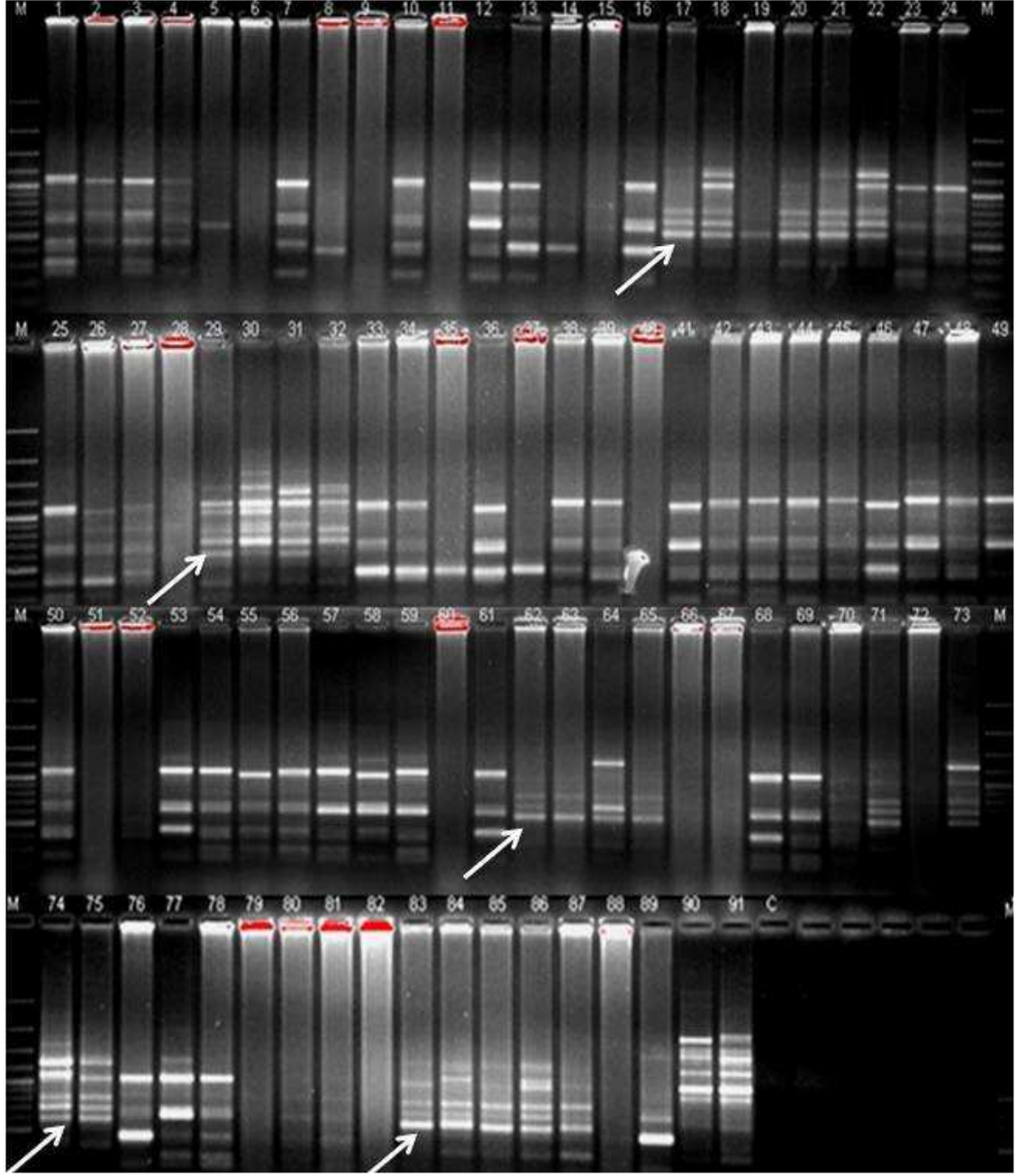
Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-01 (5'- CAGGCCCTTC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. domesticus*'a özgü bant).



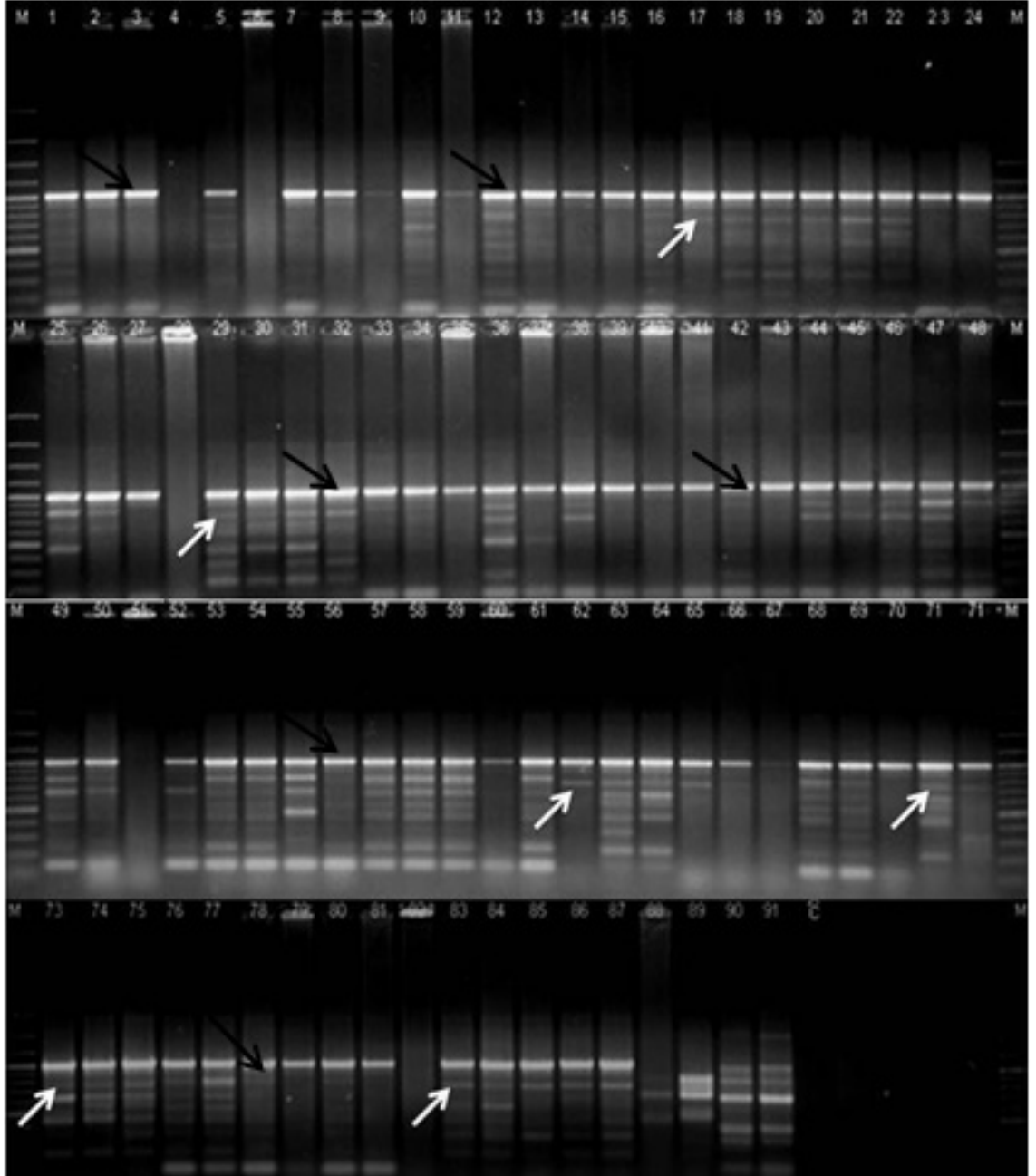
Şekil 4.3 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-03(5'-AGTCAGCCAC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *Mus* cinsine özgü bant).



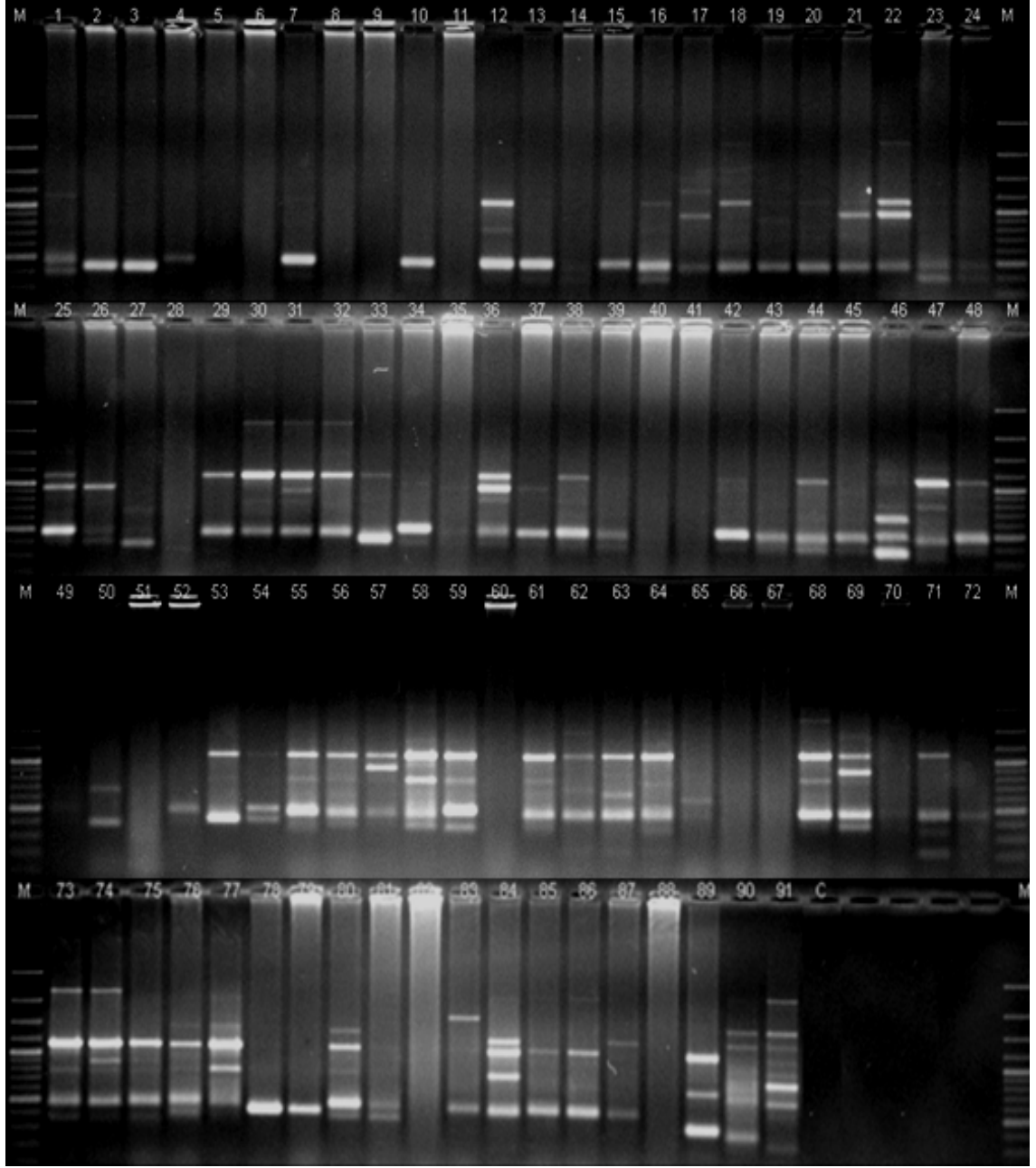
Şekil 4.4 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-08 (5'-GTGACGTAGG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).



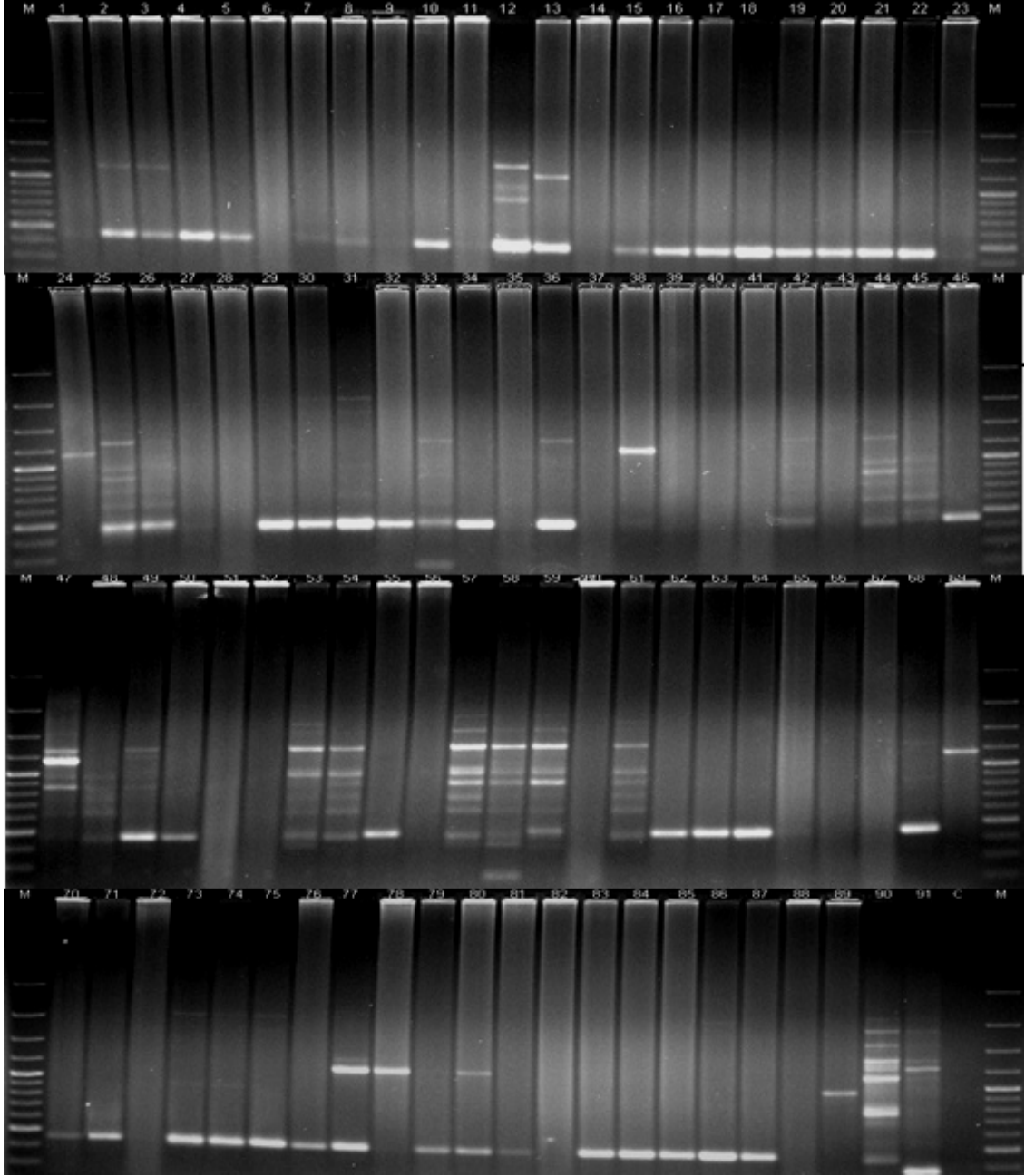
Şekil 4.5 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-09 (5'-GGGTAACGCC-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).



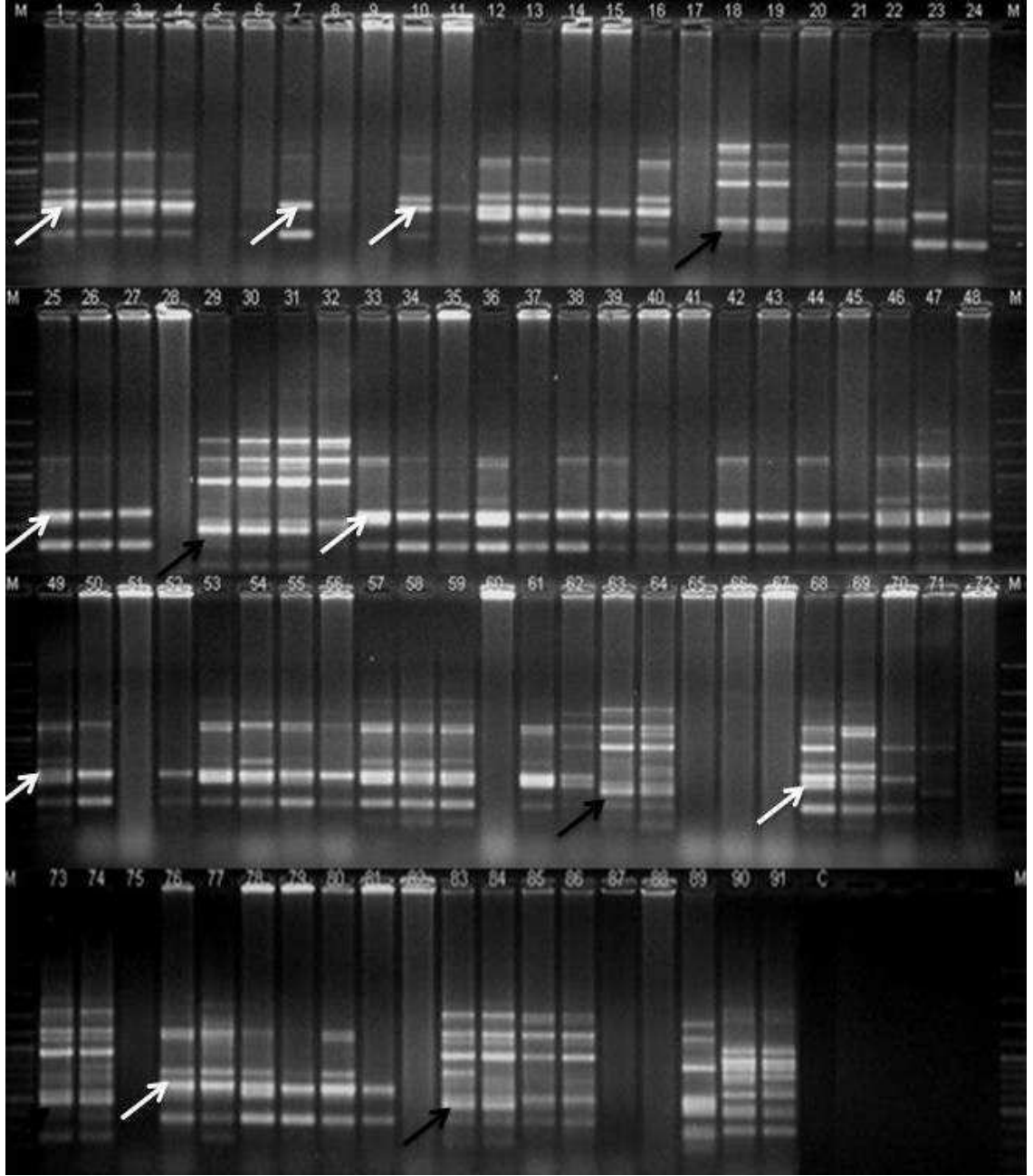
Şekil 4.6 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-10 (5'-GTGATCGCAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (siyah ok: *Mus* cinsine özgü bant, beyaz ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).



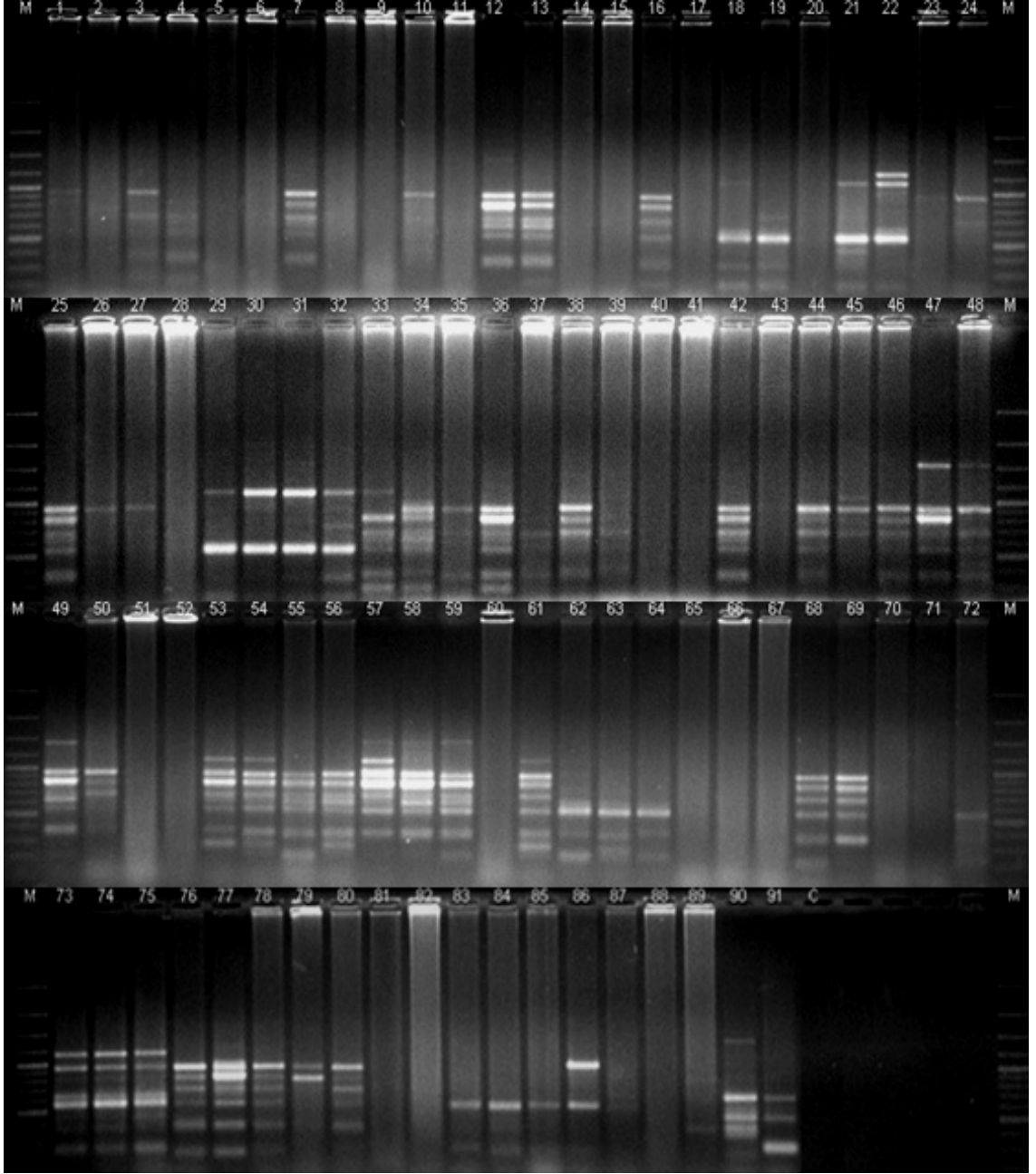
Şekil 4.7 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-11 (5'- CAATCGCCGT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris*.



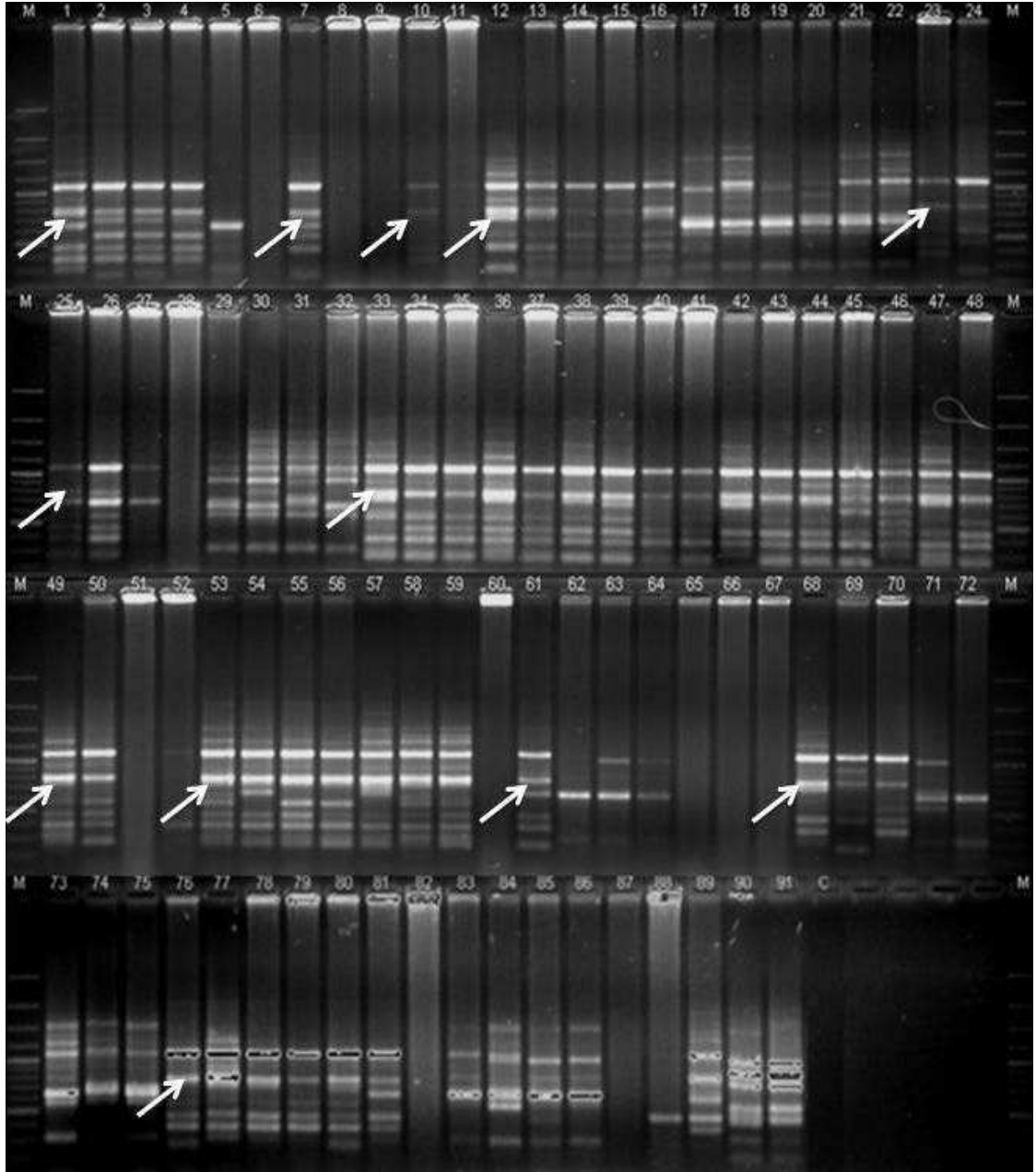
Şekil 4.8 Çalışmada kullanılan örneklerin OPA-15 (5'- TTCCGAACCC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris*.



Şekil 4.9 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-08 (5'-GTCCACACGG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. domesticus*'a özgü bant siyah ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).



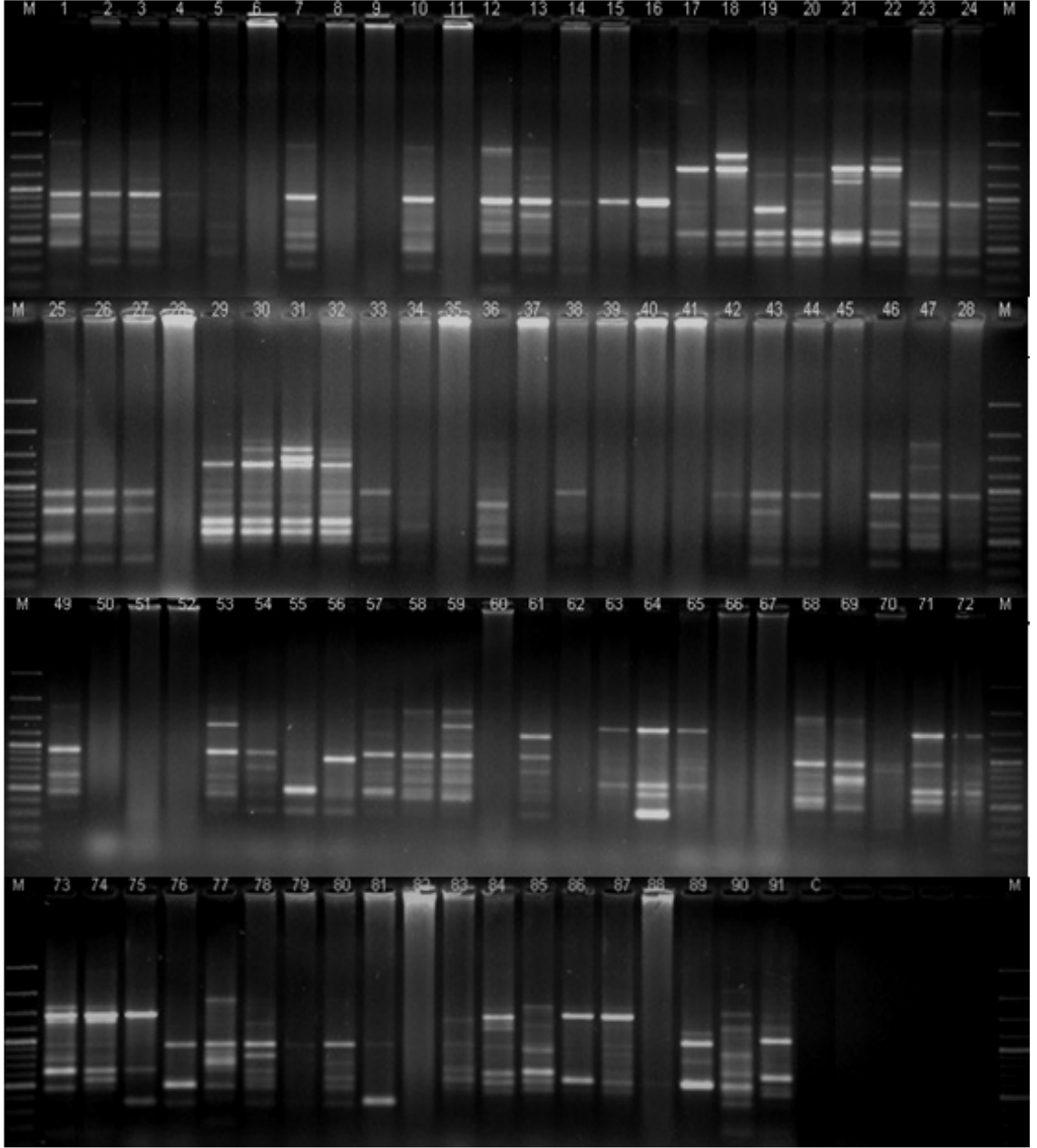
Şekil 4.10 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-12 (5'-CCTTGACGCA-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris*.



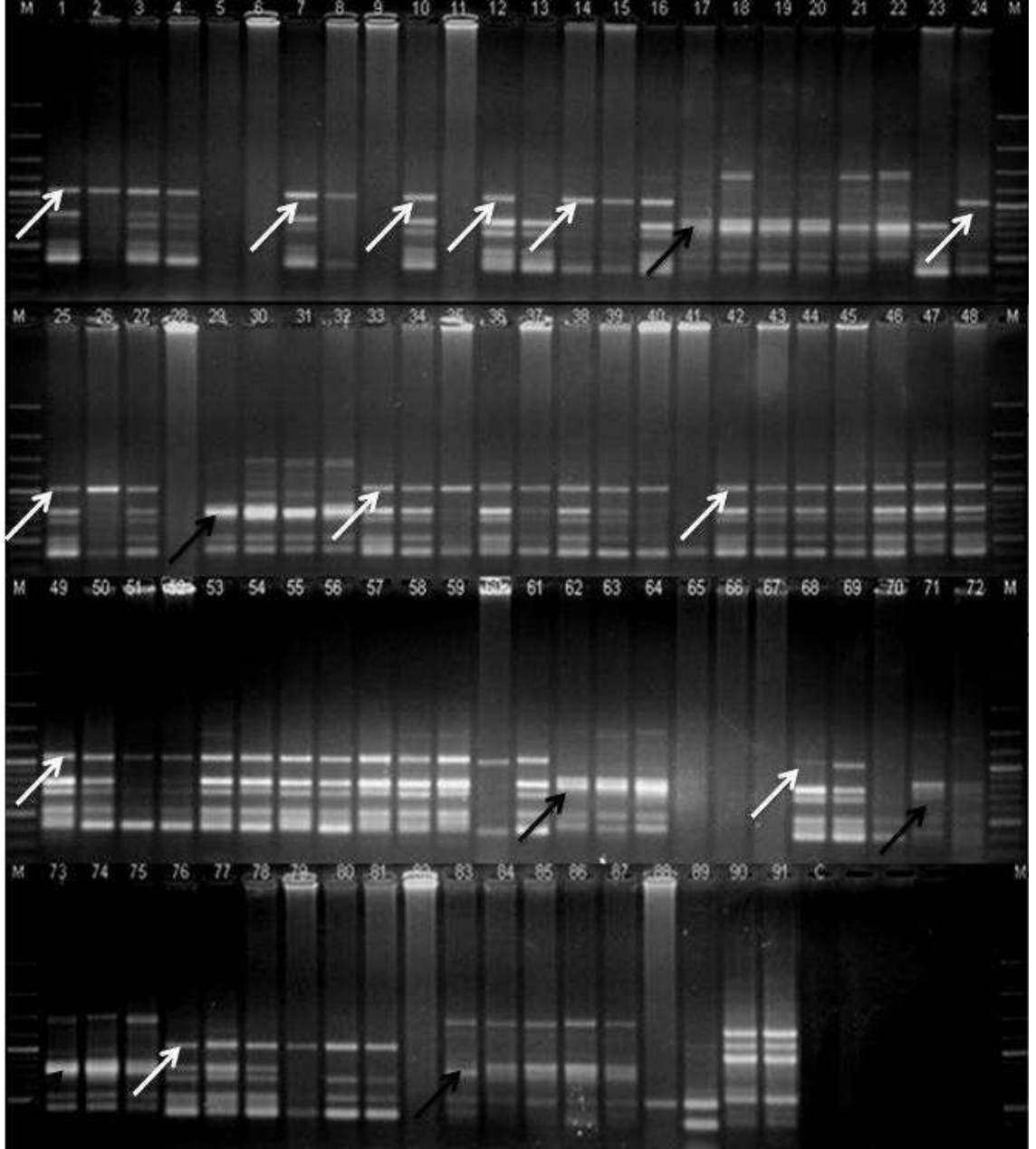
Şekil 4.11 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-17 (5'-AGGGAACGAG-3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. domesticus*'a özgü bant).



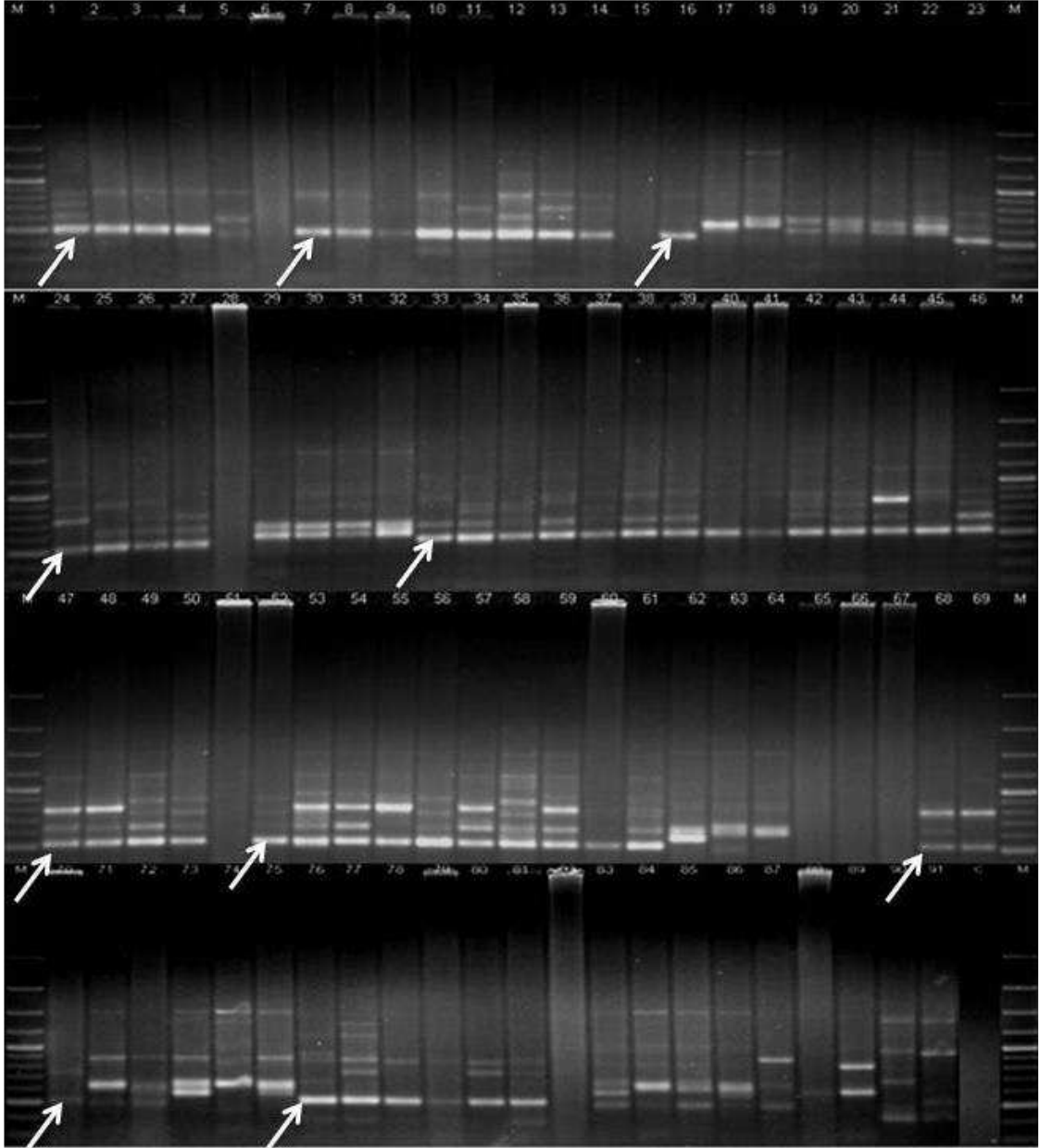
Şekil 4.12 Çalışmada kullanılan örneklerin OPB-18 (5'- CCACAGCAGT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (siyah ok: *Mus* cinsine özgü bant beyaz, ok: *M. domesticus*'a özgü bant).



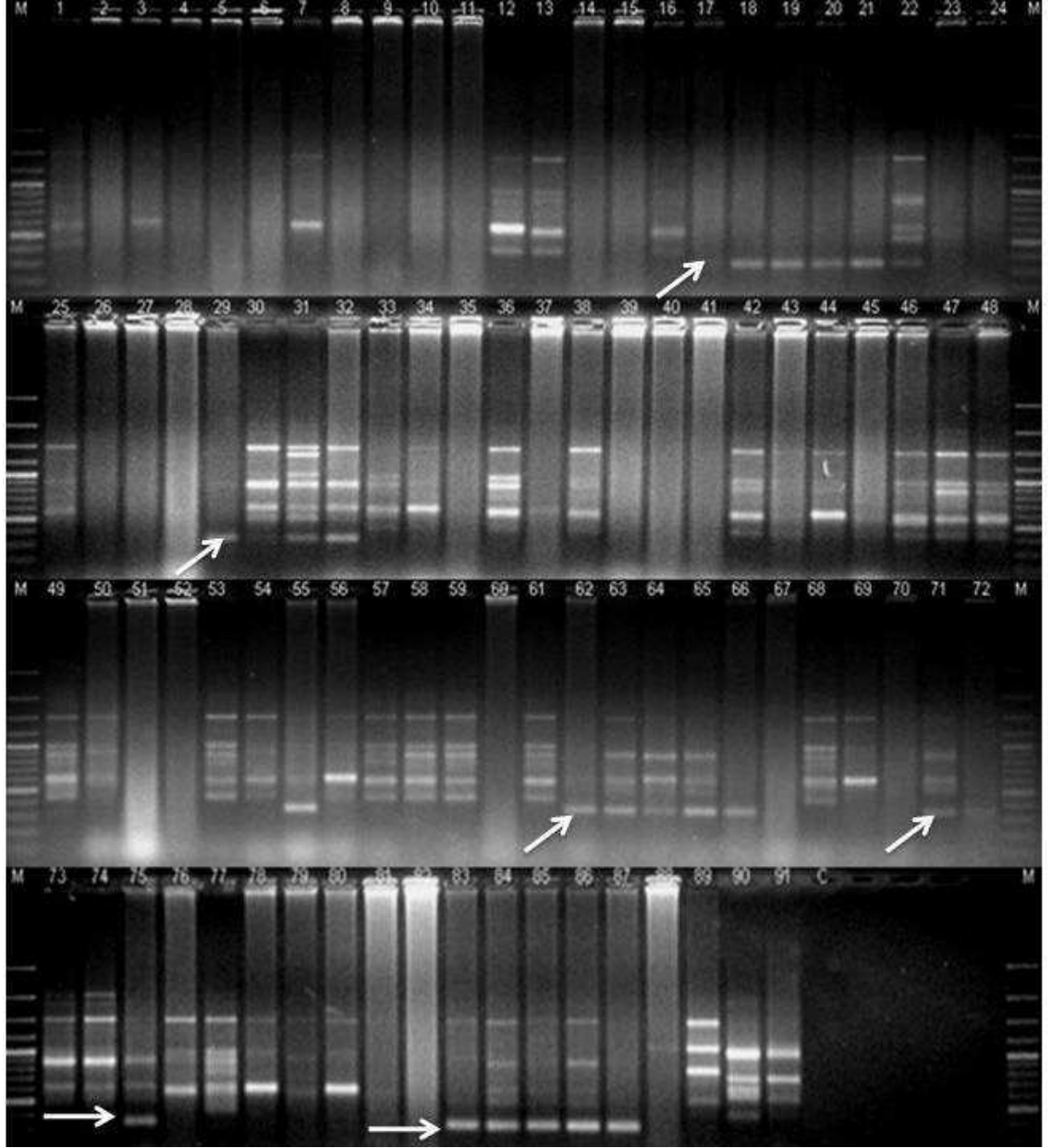
Şekil 4.13 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-03 (5'- GTCGCCGTCA -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris*.



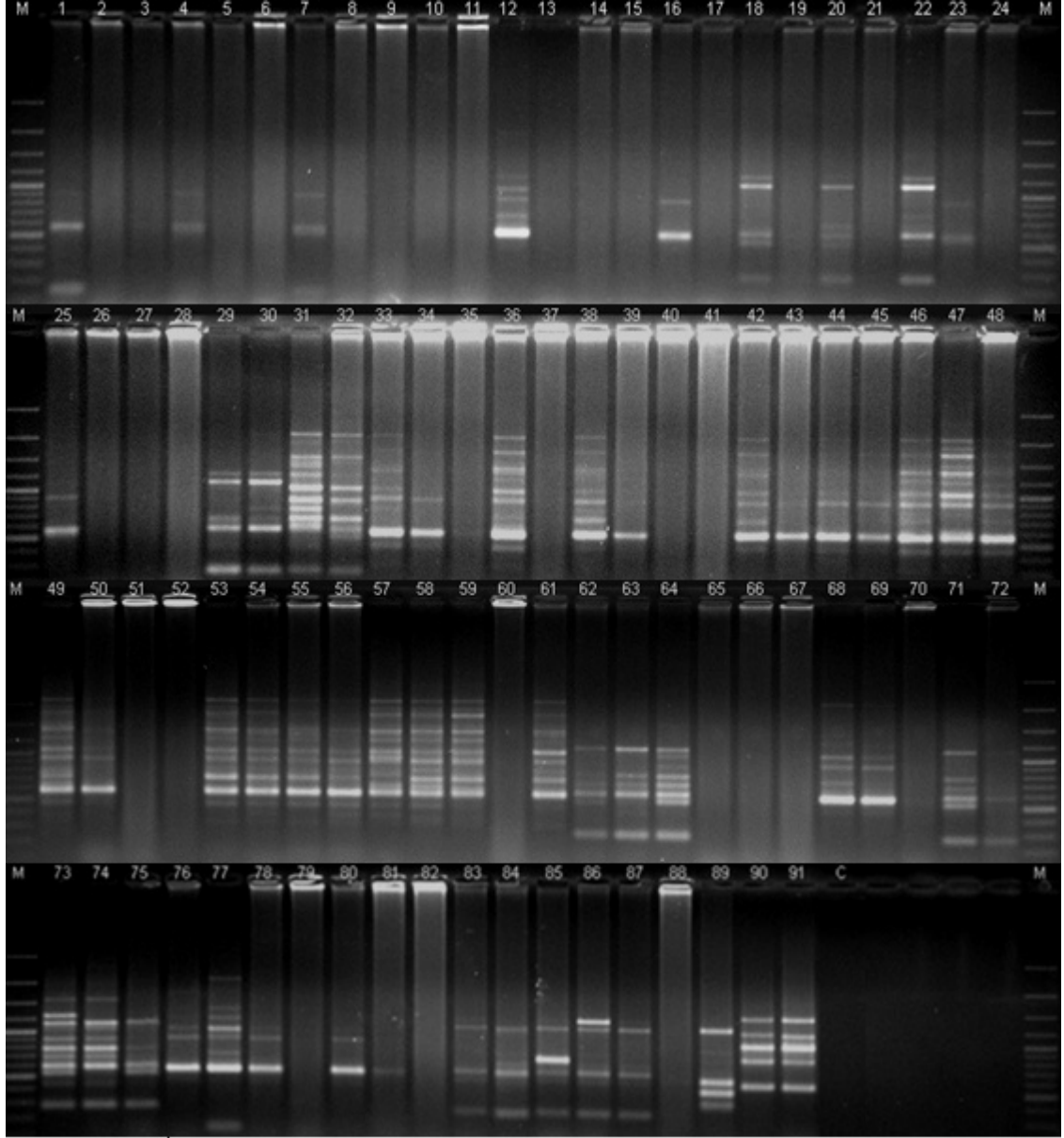
Şekil 4.14 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-07 (5'-TTGGCACGGG -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. domesticus*'a özgü bant, siyah ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).



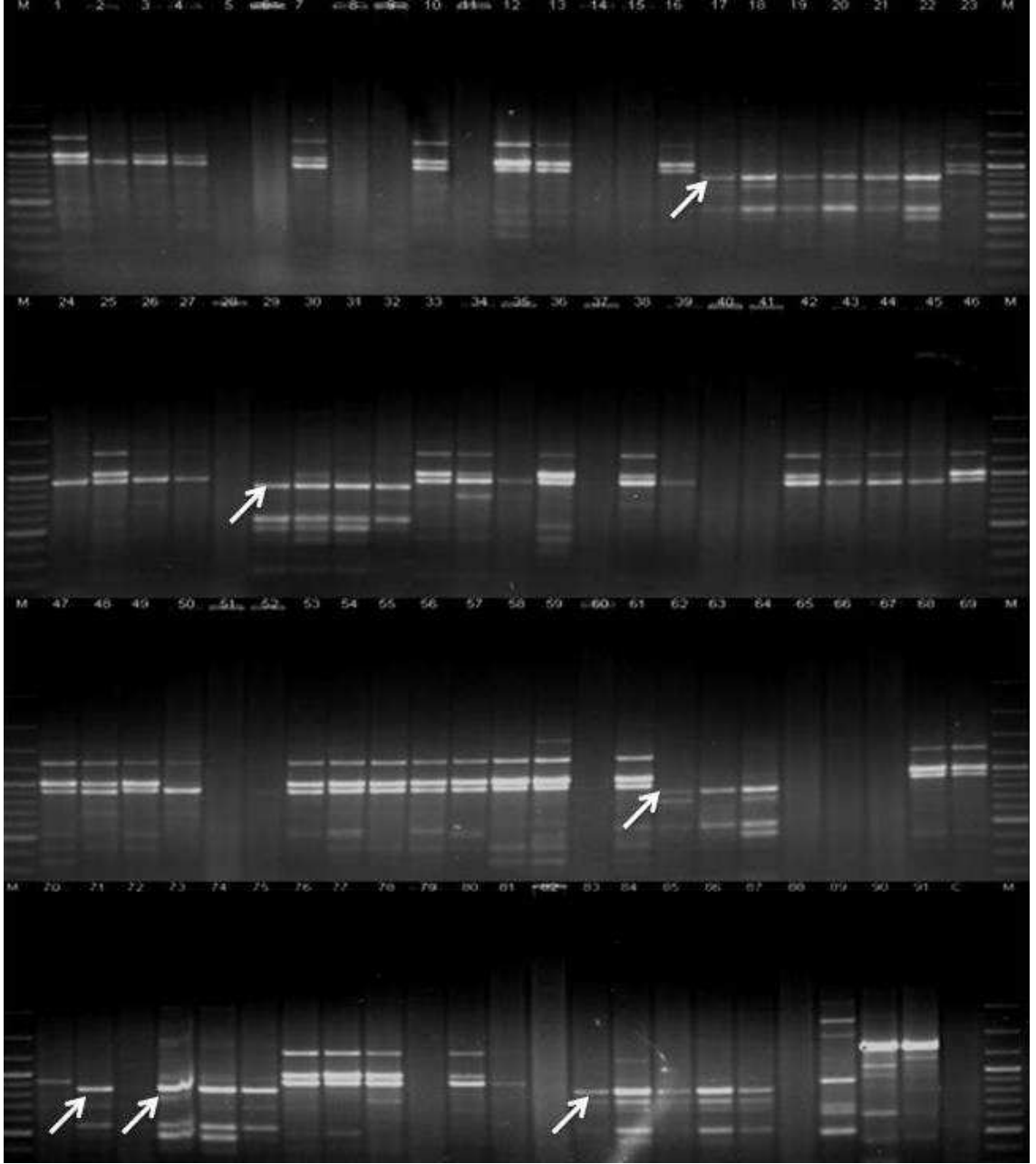
Şekil 4.15 Çalışmada kullanılan örneklerin OPD-13 (5'-GGGGTGACGA -3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. domesticus*'a özgü bant).



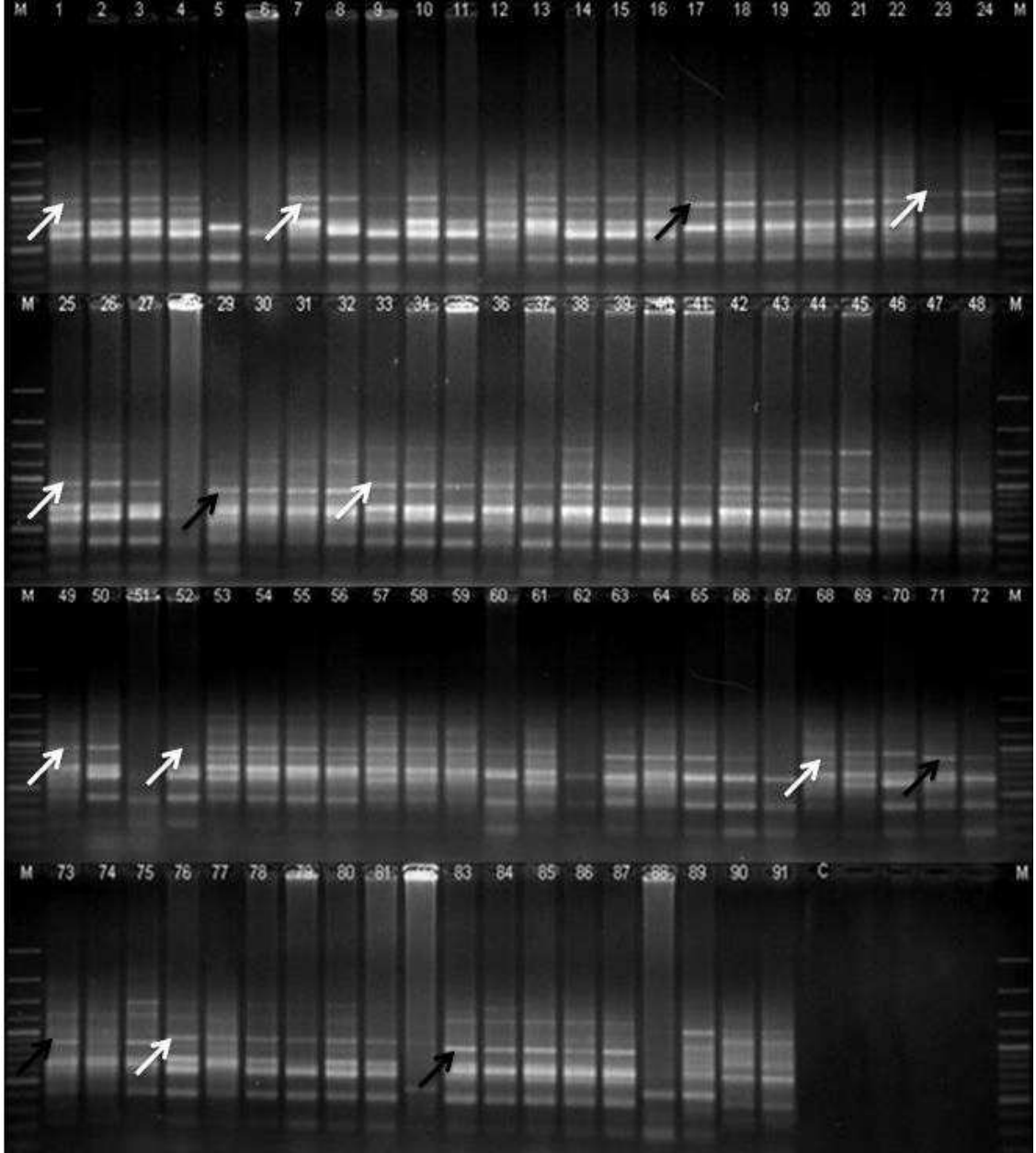
Şekil 4.16 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-09 (5'- TGAGCCTCAC- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bç DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).



Şekil 4.17 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-12 (5'- GTCCCGTGGT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris*.



Şekil 4.18 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-14 (5'- CACCCGGATG- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).



Şekil 4.19 Çalışmada kullanılan örneklerin OPJ-19 ( 5'-GGACACCACT- 3') primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü  
M: marker (100 bp DNA Ladder, Fermentas), C: Negatif kontrol. *Mus* örnekleri: 1: İstanbul, 2-7: Düzce, 8-11: Zonguldak, 12-16: Bartın, 17-24: Samsun, 25-32: Ordu, 33-37: Giresun, 38-43: Trabzon, 44-52: Rize, 53-61: Artvin, 62-65: Edirne, 66-73: Kırklareli, 74-77: Tekirdağ, 78-82: Bolu, 83-85: Amasya, 86-87: İzmit, 88-89: *Apodemus*, 90-91: *Arvicola terrestris* (beyaz ok: *M. domesticus*'a özgü bant, siyah ok: *M. macedonicus*'a özgü bant).

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz 18 primer arasından; 4 primer sadece *M. domesticus*, 5 primer ise sadece *M. macedonicus* için spesifik bantlar vermiştir. OPB-08, OPD-07 ve OPJ-19 primerleri aynı jel üzerinde 2 tür için spesifik bantlar vermektedir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Türe özgü ayırdedici primerler (*d- M. domesticus* ve *m- M. macedonicus* alt simgeler bantların moleküler ağırlıklarını göstermektedir)

Primer	Sekans (5' → 3')	Türlere Özgü Bantlar	Bantların gösterildiği şekiller
OPA-01	CAGGCCCTTC	$d_{400-500}$	Şekil 4.2
OPA-03	AGTCAGCCAC	-	
OPA-08	GTGACGTAGG	$m_{900-1000}$	Şekil 4.4
OPA-09	GGGTAACGCC	$m_{600}$	Şekil 4.5
OPA-10	GTGATCGCAG	$m_{700-800}$	Şekil 4.6
OPA-11	CAATCGCCGT	-	
OPA-15	TTCCGAACCC	-	
OPB-08	GTCCACACGG	$d_{600}, m_{500}$	Şekil 4.9
OPB-12	CCTTGACGCA	-	
OPB-17	AGGGAACGAG	$d_{700-800}$	Şekil 4.11
OPB-18	CCACAGCAGT	$d_{700-800}$	Şekil 4.12
OPD-03	GTCGCCGTCA	-	
OPD-07	TTGGCACGGG	$d_{1100-1200}, m_{800}$	Şekil 4.14
OPD-13	GGGGTGACGA	$d_{500}$	Şekil 4.15
OPJ-09	TGAGCCTCAC	$m_{300-400}$	Şekil 4.16
OPJ-12	GTCCCGTGGT	-	
OPJ-14	CACCCGGATG	$m_{800-900}$	Şekil 4.18
OPJ-19	GGACACCACT	$d_{900-1000}, m_{800-900}$	Şekil 4.19

RAPD-PCR metodu ile *Mus* cinsi ile dış grupların da ayrımı belirlenmiştir. OPA03, OPA10 ve OPB18 primerleri ile elde edilen; A03-700-800, A10-1000 ve B18-300-400 bantları *Mus* cinsi için spesifik bantlardır (Şekil 4.3, Şekil 4.6, Şekil 4.12).

Çalışmamızda kullanmak üzere 15 popülasyondan topladığımız *Mus* (N = 86) örneklerinin bazılarının hangi türe dahil olduğu bilinmemektedir (Çizelge 3.1).

Kullanmış olduğumuz RAPD-PCR metodu ile amplifiye edilen DNA'ların jel üzerindeki profillerine göre bu örneklerin hangi türe ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ).

Çizelge 4.3 RAPD-PCR yöntemi ile belirlenen *Mus* örnekleri

Lokalite	Örnek No	Kayıt No	Tür
Düzce	4	3936	<i>Mus domesticus</i>
	5	4224	
	6	3950	
	7	3900	
Zonguldak	8	3894	<i>Mus domesticus</i>
	9	3952	
Bartın	14	4053	<i>Mus domesticus</i>
	15	4051	
	16	4092	
Samsun	23	2876	<i>Mus domesticus</i>
	24	2878	
Ordu	32	3470	<i>Mus macedonicus</i>
Giresun	35	3857	<i>Mus domesticus</i>
	36	3855	
	37	3856	
Trabzon	42	3835	<i>Mus domesticus</i>
	43	3837	
Rize	48	3826	<i>Mus domesticus</i>
	49	3794	
	50	3792	
	51	3358	
	52	3364	

Çizelge 4.3 RAPD-PCR yöntemi ile belirlenen *Mus* örnekleri (devam)

Lokalite	Örnek No	Kayıt No	Tür
Artvin	57	3817	<i>Mus domesticus</i>
	58	3809	
	59	3804	
	60	3376	
	61	3770	
Kırklareli	68	4360	<i>Mus domesticus</i>
	69	4361	
	70	4364	
	71	4365	<i>Mus macedonicus</i>
	72	2402	
Bolu	73	2371	
	78	4226	<i>Mus domesticus</i>
	79	3944	
82	5888		
Amasya	85	4886	<i>Mus macedonicus</i>
İzmit	86	5884	<i>Mus macedonicus</i>
	87	5887	

#### 4.1 İstatistik Analizi Sonuçları

İstatistik analizleri için POPGENE Microsoft Window-based Freeware for Population Genetics Analysis, Version 1.31 (Yeh vd. 1997) programı kullanılmıştır. Popgene programı ile oluşturulan genetik mesafe katsayıları (Nei, 1978) kullanılarak MEGA 4.0 (Tamura vd. 2007) programı ile UPGMA ağacı ile çizilmiştir.

**Na** : Her örnek için gözlenen allel sayısı

**Ne** : Etkili allel sayısı

**Nm** : Gen akışı

**H** : Nei'nin genetik çeşitliliği (1987)

**I** : Shannon information indeksi

- H<sub>S</sub>** : Populasyondaki bir bireyin beklenen heterozigotluğu  
**H<sub>T</sub>** : Tüm populasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu  
**G<sub>ST</sub>** : Alt populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın nisbi büyüklüğü  
**D** : Nei'nin genetik mesafe değeri (1978)

*Mus* populasyonlarının POPGENE programı ile yapılan genetik varyasyon (Nei 1987) analizleri çizelge 4.4'de, genetik farklılaşma (Nei 1987) değerleri çizelge 4.5'de, genetik mesafe ve genetik benzerlik (Nei 1978) hesaplamaları ise Çizelge 4.6'da, tüm populasyonlar arasındaki genetik mesafe verilerine göre elde edilen dendrogram (Nei 1978) ise Şekil 4.20'de verilmektedir.

Nei (1987)'ye göre *Mus* populasyonları için hesaplanan ortalama genetik çeşitlilik değeri  $H = 0,1093$  (polimorfik lokus yüzdesi, %P= 4,7) (Çizelge 4.4), genetik farklılaşmayı gösteren  $G_{ST}$  değeri 0.7084 ve populasyonlar arasındaki gen akışını ifade eden  $N_m$  değeri 0.2059 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).

*Mus* türlerini ayrı ayrı değerlendirdiğimizde *Mus domesticus* populasyonları için hesaplanan genetik farklılaşma değerleri, Samdun-*d* populasyonunda en düşük  $H = 0,0382$  (%P= 8,70), Artvin-*d* populasyonunda ise bu değer en yüksek seviyededir  $H = 0,1591$  (%P= 40,87). *Mus macedonicus* için; İzmit-*m* populasyonunda en düşük  $H = 0,0360$  (%P= 8,70), Kırklareli-*m* populasyonunda ise bu değer en yüksek seviyededir  $H = 0,1019$  (%P=2739), (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 *Mus* populasyonlarının genetik varyasyon analizleri (Nei 1987)

Lokalite	Örnek Sayısı	Na	Ne	H	I	P	%P
Düzce - <i>d</i>	6	1,2826	1,2133	0,1168	0,1689	65	28,26
Zonguldak- <i>d</i>	4	1,1238	1,0805	0,0475	0,0703	25	10,87
Bartın- <i>d</i>	5	1,2565	1,1622	0,0940	0,1400	59	25,65
Samsun- <i>m</i>	6	1,2652	1,1704	0,0972	0,1442	61	26,52
Samsun- <i>d</i>	2	1,0922	1,0652	0,0382	0,0557	20	8,70
Ordu- <i>m</i>	4	1,2130	1,1658	0,0905	0,1303	49	21,30
Ordu- <i>d</i>	4	1,2130	1,1600	0,0886	0,1284	49	21,30
Giresun- <i>d</i>	5	1,2609	1,1752	0,1003	0,1479	60	26,09
Trabzon- <i>d</i>	6	1,2304	1,1526	0,0876	0,1294	53	23,04
Rize- <i>d</i>	9	1,4043	1,2605	0,1490	0,2205	93	40,43
Artvin- <i>d</i>	9	1,4087	1,2838	0,1591	0,2325	94	40,87
Edirne- <i>m</i>	4	1,1435	1,1059	0,0587	0,0853	33	14,35
Kırklareli- <i>m</i>	5	1,2739	1,1725	0,1019	0,1519	63	27,39
Kırklareli- <i>d</i>	3	1,2478	1,1886	0,1041	0,1506	57	24,78
Tekirdağ- <i>m</i>	2	1,1043	1,0738	0,0432	0,0631	24	10,43
Tekirdağ- <i>d</i>	2	1,1217	1,0861	0,0504	0,0736	28	12,17
Bolu- <i>d</i>	5	1,2000	1,1366	0,0772	0,1136	46	20,00
Amasya- <i>m</i>	3	1,1478	1,0998	0,0574	0,0847	34	14,78
İzmit- <i>m</i>	2	1,0870	1,0615	0,0360	0,0526	20	8,70
<b>Ortalama</b>	<b>86</b>	<b>0,2683</b>	<b>0,2048</b>	<b>0,1093</b>	<b>0,0927</b>	<b>10,8</b>	<b>4,7</b>

*m*: *Mus macedonicus*, *d*: *Mus domesticus*.

Çizelge 4.5 *Mus* populasyonları için genetik farklılaşma analizi (Nei 1987).

Örnek Sayısı	HT	HS	GST	Nm
86	0.2675	0.0780	0.7084	0.2059

*Mus* populasyonları için; Nei (1978)'ye göre hesaplanan genetik mesafe değerleri (D) 0.0259 ile 0.4280 arasındadır. *M. domesticus* örneklerinden oluşan populasyonları kendi içinde analiz ettiğimizde; genetik olarak en yakın populasyonların Giresun-*d* ve Trabzon-*d* (0.0259), birbirine en uzak populasyonların ise Ordu-*d* ve Zonguldak-*d* (0.4160) populasyonları olduğu görülmüştür. *M. macedonicus* örneklerinden oluşan

populasyonları da kendi içinde analiz ettiğimizde; genetik olarak en yakın populasyonların İzmit-*m* ve Amasya-*m* (0.0291), birbirine en uzak populasyonların ise Tekirdağ-*m* ve Ordu-*m* (0.3164) populasyonları olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).

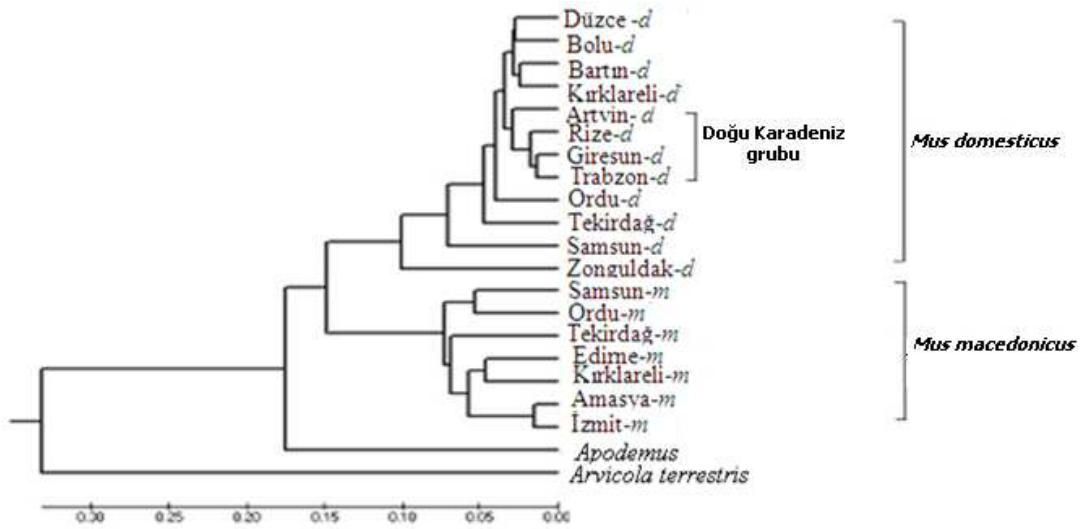
Genetik benzerlik verileri genetik mesafe değerleri ile uyumlu çıkmıştır. *M. domesticus* populasyonları için; Giresun-*d* ve Trabzon-*d* populasyonları en fazla benzerlik gösteren populasyonlarken (0.9715), Ordu-*d* ve Zonguldak-*d* populasyonları genetik benzerlik değerleri (0.6597) bakımından birbirine en uzak populasyonlardır. *M. macedonicus* populasyonları içinde; İzmit-*m* ve Amasya-*m* populasyonları en fazla benzerlik gösteren populasyonlarken (0.9713), Tekirdağ-*m* ve Ordu-*m* populasyonları genetik benzerlik değerleri (0.7288) birbirine en uzak populasyonlardır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Genetik mesafe (alt diagonal) ve genetik benzerlik (üst diagonal) hesaplamaları (Nei 1978)

LOKALİTE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. Düzce- <i>d</i>	****	0.8146	0.9525	0.8072	0.8713	0.9376	0.7455	0.9479	0.9298	0.9338	0.8994	0.8014	0.8145	0.9349	0.7374	0.8819	0.9472	0.7835	0.7689	0.7777	0.5727
2.Zonguldak- <i>d</i>	0.2051	****	0.8273	0.6821	0.8314	0.8166	0.6597	0.8214	0.8307	0.8349	0.8136	0.6921	0.6949	0.8156	0.6540	0.7928	0.8037	0.6948	0.6787	0.6288	0.5042
3. Bartın- <i>d</i>	0.0487	0.1896	****	0.7572	0.8902	0.9273	0.7398	0.9450	0.9426	0.9490	0.9271	0.7467	0.7719	0.9542	0.7211	0.9200	0.9497	0.7503	0.7306	0.6917	0.5248
4. Samsun- <i>m</i>	0.2142	0.3826	0.2782	****	0.7526	0.7757	0.8994	0.7836	0.7601	0.7659	0.7345	0.8949	0.8916	0.7602	0.8387	0.7137	0.7734	0.9017	0.8751	0.7200	0.5004
5. Samsun- <i>d</i>	0.1378	0.1846	0.1163	0.2842	****	0.8606	0.7087	0.8734	0.8797	0.8803	0.8377	0.6995	0.7023	0.8732	0.6518	0.8463	0.8702	0.7347	0.7106	0.6652	0.4965
6.Ordu- <i>m</i>	0.0644	0.2026	0.0754	0.2540	0.1501	****	0.7440	0.9333	0.9302	0.9316	0.8870	0.7671	0.7769	0.9164	0.7288	0.8877	0.9323	0.7831	0.7559	0.7261	0.5520
7.Ordu- <i>d</i>	0.2938	0.4160	0.3014	0.1060	0.3443	0.2957	****	0.7680	0.7492	0.7523	0.7391	0.8604	0.8445	0.7409	0.8460	0.7035	0.7288	0.8633	0.8220	0.6621	0.4807
8. Giresun- <i>d</i>	0.0535	0.1967	0.0566	0.2438	0.1353	0.0690	0.2640	****	0.9744	0.9621	0.9400	0.7665	0.7738	0.9386	0.7164	0.9141	0.9462	0.7859	0.7569	0.7179	0.5259
9. Trabzon- <i>d</i>	0.0727	0.1855	0.0592	0.2743	0.1282	0.0723	0.2888	0.0259	****	0.9715	0.9325	0.7552	0.7739	0.9367	0.7166	0.9209	0.9509	0.7775	0.7483	0.7045	0.5349
10. Rize- <i>d</i>	0.0684	0.1805	0.0523	0.2667	0.1275	0.0708	0.2846	0.0386	0.0289	****	0.9615	0.7579	0.7758	0.9494	0.7209	0.9173	0.9376	0.7701	0.7504	0.7113	0.5408
11. Artvin - <i>d</i>	0.1060	0.2063	0.0757	0.3085	0.1770	0.1199	0.3023	0.0619	0.0699	0.0392	****	0.7422	0.7465	0.9273	0.7047	0.9104	0.8951	0.7342	0.7242	0.6784	0.5146
12. Edirne- <i>m</i>	0.2214	0.3680	0.2920	0.1110	0.3573	0.2652	0.1503	0.2659	0.2808	0.2772	0.2981	****	0.9117	0.7661	0.8699	0.7317	0.7590	0.8986	0.8977	0.7463	0.5108
13.Kırklareli- <i>m</i>	0.2051	0.3641	0.2589	0.1147	0.3534	0.2525	0.1690	0.2565	0.2564	0.2539	0.2924	0.0924	****	0.7826	0.9078	0.7375	0.7749	0.8862	0.8894	0.7389	0.5297
14. Kırklareli- <i>d</i>	0.0673	0.2039	0.0469	0.2741	0.1356	0.0873	0.2999	0.0634	0.0654	0.0520	0.0755	0.2665	0.2451	****	0.7160	0.9111	0.9429	0.7718	0.7632	0.7213	0.5501
15. Tekirdağ- <i>m</i>	0.3046	0.4247	0.3270	0.1760	0.4280	0.3164	0.1673	0.3335	0.3332	0.3273	0.3500	0.1393	0.0968	0.3341	****	0.7322	0.7117	0.8600	0.8481	0.6689	0.4484
16. Tekirdağ- <i>d</i>	0.1256	0.2322	0.0834	0.3373	0.1669	0.1191	0.3517	0.0898	0.0824	0.0864	0.0939	0.3123	0.3044	0.0931	0.3116	****	0.9313	0.7464	0.7217	0.6785	0.4852
17. Bolu- <i>d</i>	0.0543	0.2185	0.0516	0.2569	0.1391	0.0701	0.3164	0.0553	0.0504	0.0644	0.1109	0.2757	0.2550	0.0588	0.3401	0.0711	****	0.7747	0.7540	0.7253	0.5400
18. Amasya- <i>m</i>	0.2440	0.3642	0.2873	0.1035	0.3083	0.2445	0.1470	0.2409	0.2516	0.2612	0.3089	0.1069	0.1209	0.2591	0.1508	0.2925	0.2553	****	0.9713	0.7261	0.4937
19.İzmit- <i>m</i>	0.2627	0.3876	0.3138	0.1334	0.3417	0.2799	0.1960	0.2785	0.2899	0.2871	0.3226	0.1079	0.1173	0.2702	0.1647	0.3262	0.2824	0.0291	****	0.7198	0.4822
20. <i>Apodemus</i>	0.2514	0.4640	0.3686	0.3285	0.4077	0.3200	0.4124	0.3315	0.3503	0.3407	0.3880	0.2926	0.3025	0.3266	0.4022	0.3879	0.3212	0.3201	0.3288	****	0.5438
21. <i>Arvicola</i>	0.5575	0.6848	0.6448	0.6923	0.7002	0.5942	0.7325	0.6426	0.6257	0.6147	0.6644	0.6718	0.6355	0.5977	0.8021	0.7231	0.6162	0.7058	0.7294	0.6091	****

*m*: *Mus macedonicus*, *d*: *Mus domesticus*, 0.4160 en yüksek genetik mesafe değeri, 0.0259 en düşük genetik mesafe değeri

Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramı ilk olarak 2 dala ayrılmıştır. İlk dal *Arvicola terrestris*'i, ikinci dal aynı altfamilyadan olan *Mus* ve *Apodemus* u oluşturmaktadır. *Mus* örnekleri ise 2 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan biri *M. domesticus* diğeri ise *M. macedonicus* örneklerini içermektedir. *M. domesticus*'u oluşturan grupta, içine Giresun-Trabzon-Rize ve Artvin'i alan Doğu Karadeniz örneklerini içeren bir kümelenme görülmüştür.



*m*: *Mus macedonicus*, *d*: *Mus domesticus*.

Şekil 4.20 Çalışılan tüm populasyonlara ait genetik mesafe değerleriyle oluşturulmuş dendogram (Nei 1978)

Nei (1987)'ye göre, *M. domesticus* ve *M. macedonicus* türleri için ayrı ayrı genetik varyasyon analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda; *M. domesticus* türünde Nm değeri 0.2752 iken, *M. macedonicus* türünde ise bu değer 0.1532'dir (Çizelge 4.7- 4.8). Bu değerlere göre; *M. domesticus* populasyonları arasında gen akışının *M. macedonicus* populasyonlarına oranla daha fazla olduğu görülmektedir. GST değeri ise; *M.macedonicus* populasyonları için 0.7655 iken, *M. domesticus* için 0.6450'dir (Çizelge 4.7- 4.8). Bu sonuçlar da *M. macedonicus* populasyonlarında genetik farklılaşmanın *M. domesticus*'a oranla daha fazla olduğu göstermektedir.

Çizelge 4.7 *M. domesticus* populasyonları için genetik farklılaşma analizi (Nei 1987)

Örnek Sayısı	HT	HS	GST	Nm
60	0.2435	0.0864	0.6450	0.2752

Çizelge 4.8 *M. macedonicus* populasyonları için genetik farklılaşma analizi (Nei 1987)

Örnek Sayısı	HT	HS	GST	Nm
26	0.2793	0.0655	0.7655	0.1532

## 5. TARTIŞMA

Bugüne kadar bir çok morfolojik, ekolojik, karyolojik ve moleküler genetik çalışmalar *Mus* cinsinin sistematüğini, yayılışını ve filogenetik ilişkilerini anlamak için yapılmıştır (Hsu vd. 1978, Nance vd. 1990, Mishra vd. 2002, Gözcelioğlu vd. 2005, Çolak vd. 2006, Spiridonova vd. 2008a, Spiridonova vd. 2008b). Morfoloji, morfometri, allozim analizleri ve mtDNA kontrol bölge dizileri çeşitli bölgelerdeki *Mus* cinsine ait türlerin teşhislerinde kullanılmıştır. Ancak bu cinsin çok farklı coğrafik alanlarda yaşaması ve farklı genetik analiz metotlarının kullanımı yüzünden cinsle ilgili birçok taksonomik problemler çözülmeden kalmıştır (Hsu vd. 1978, Nance vd. 1990, Mishra vd. 2002, Gözcelioğlu vd. 2005, Çolak vd. 2006, Spiridonova vd. 2008a, Spiridonova vd. 2008b).

Çolak vd. (2006) morfolojik verilere dayanarak Türkiye’de *M. domesticus* ile *M. macedonicus*’un yayılış gösterdiğini ortaya koymuşlardır ve iki türü ayırt edici morfolojik özellikleri tanımlamışlardır. Araştırmacıların sonuçlarında; zygomatik indeks (ZI) *M. domesticus*’da 0.32-0.47, *M. macedonicus*’ta ise 0.60-0.85 olarak belirlenmiştir. Baş+Gövde/kuyruk (H+B/T) indeksi *M. domesticus*’da 0.87-1.05 iken *M. macedonicus*’ta 1.08-1.78 arasında değiştiği saptanmıştır. Diğer bir ayırt edici özellik olarak; parietal kemiklerin ventral kenarlarının *M. domesticus*’da zikzak, *M. macedonicus*’ta ise düz ya da öne doğru girinti yapmış biçimde olduğu tespit edilmiştir. Bakulum ve phallus özellikleri ise *M. domesticus*’u *M. macedonicus*’tan ayırmamıştır. Gözcelioğlu vd. (2005) ise yapmış oldukları çalışmada; morfolojik, morfometrik, karyolojik ve izositrat dehidrogenaz enzim sistemi özellikleri yönünden, Türkiye’de Bolu ve çevresindeki illerde toplamış oldukları örnekleri incelemişlerdir. *M. domesticus* ve *M. macedonicus* bireylerini ayırt etmişlerdir. Bu çalışmada *M. domesticus* ve *M. macedonicus*’un Karadeniz ve Trakya’da yayılış gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz RAPD-PCR metodu ile bu iki tür birbirinden ayrılmış ve her iki araştırmacının (Çolak vd. (2006), Gözcelioğlu (2005)) da sonuçları desteklenmiştir.

Spiridonova vd. (2008a), Eski Sovyetler Birliği bölgesindeki 29 lokalitedeki (N:180) *M. musculus* türünün 6 alt türü arasında yapmış olduğu çalışmada; *M. m. wagneri* için 9

primer, *M. m. domesticus* için 4 primer, *M. m. gansuensis* için 1 primer, *M. m. musculus*, *M. m. castaneus*, *M. m. bactrianus* için 2 primeri spesifik moleküler markırlar olarak saptamışlardır. Araştırmacılar alttürler arası genetik farklılık seviyelerini değerlendirerek, *M. m. castaneus*- *M. m. domesticus*, *M. m. musculus*- *M. m. gansuensis*'i birbirine çok benzeyen alttürler olarak belirlemişlerdir. *M. m. wagneri*'nin ise diğer alttürlerden çok farklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu tez çalışmasında ise; 3 primer (A03<sub>700-800</sub>, A10<sub>1000</sub> ve B18<sub>300-400</sub>) *Mus* cinsi için, 7 primer (A01- *d*<sub>400-500</sub>, B08- *d*<sub>600</sub>, B17- *d*<sub>700-800</sub>, B18- *d*<sub>700-800</sub>, D07- *d*<sub>1100-1200</sub>, D13- *d*<sub>500</sub>, J19- *d*<sub>900-1000</sub>) *M. domesticus* için ve 8 primer (A08- *m*<sub>900-1000</sub>, A09- *m*<sub>600</sub>, A10- *m*<sub>700-800</sub>, B08- *m*<sub>500</sub>, D07- *m*<sub>800</sub>, J09- *m*<sub>300-400</sub>, J14- *m*<sub>800-900</sub>, J19- *m*<sub>800-900</sub>) *M. macedonicus* için spesifik moleküler belirteç olarak belirlenmiştir.

Spiridonova vd. (2008b) Rusya'da 10 farklı lokaliteden topladıkları alttürler ile yapmış olduğu çalışmada; RAPD belirteçleri (OPA-10, OPA-12, OPA-16, OPC-02, OPC-05, OPC-07, OPC-08, OPD-05, OPD-06) ile alttürlerin coğrafik dağılımları, genetik çeşitliliği, genetik farklılığı ve akrabalık ilişkilerini belirlemişlerdir. Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan dendogram 2 dala ayrılmış; ilk dal *M. m. wagneri* alttürünü verirken, ikinci dal ise kendi içinde doğu ve batı popülasyonlarını veren iki dala ayrılmıştır. Ev farelerinin alttüre özgü RAPD- belirteçlerinin coğrafik dağılımı tek bir bireyin 4 farklı alttürün karakterlerini taşıyabileceğini göstermiştir. Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında; 16 lokaliteden toplam 90 örnekle çalışılmıştır. Kullanmış olduğumuz 18 primerin, 12 tanesi *Mus* türlerinin ayırımında belirgin rol oynarken, 3 primer ise 2 *Mus* türünde de ortak bantlarla bu türleri dış grup olarak kullanılan türlerden ayırmıştır. Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramı *Mus* cinsini *M. domesticus* ve *M. macedonicus* olarak iki gruba ayırmıştır. Spiridonova (2008b)'nin çalışmasında RAPD belirteçleri alttürleri doğu ve batı olmak üzere iki gruba ayırdığı gibi çalışmamızda *M. domesticus* popülasyonları da belirgin bir şekilde Doğu Karadeniz kümelenmesi göstermiştir. Bunun nedenleri arasında, ilk olarak coğrafik yapının etkili olduğu düşünülebilir. Çünkü Doğu Karadeniz bölgesi, Batı ve Orta Karadeniz bölgelerine oranla daha sık dağlara sahiptir ve kıyı ile iç kesimler arasında bariyer oluşturmaktadır. İkinci olarak bu bölgenin iklimsel özelliklerinin diğer bölgelere oranla daha sert olması Doğu kladının ayrılmasında etkili olabilir.

Gündür (2008) Türkiye'nin Trakya ve Batı Karadeniz bölgelerindeki *Mus* 'larla yapmış olduğu tez çalışmasında kullandığı allozim tekniği ile *M. domesticus* ile *M. macedonicus*'u birbirlerinden ayırmıştır. Ayırıcı karakter olarak *Idh-2* lokusu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan RAPD analizi ile de *Mus* türlerini birbirinden ayıran profiller belirlenmiştir. RAPD verileri ile oluşan sonuçlar; allozim analizi, morfolojik analiz (Çolak vd. 2006) ve mtDNA analiz (Gündüz vd. 2000b) sonuçları ile tutarlı sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar, RAPD tekniğinin tür ayırımında kullanılabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada Karadeniz ve Trakya'da yayılış gösteren *Mus* cinsine ait iki tür RAPD-PCR metodu ile analiz edilmiştir. Yayılış alanı dikkate alındığında Trakya ile Karadeniz arasında boğazlar *Mus* cinsi bireyleri için önemli bir bariyer görüntüsü vermektedir. Ancak yapılan bu çalışmada insanlarla bir arada yaşayan ve taşınabilir özellikte olan *M. domesticus*'un Trakya ve Karadeniz populasyonları arasında önemli bir fark gözükmemektedir. Şekil 4.20'de de görüldüğü gibi Trakya *M. domesticus* örnekleri Batı Karadeniz bölgesinde yer alan Düzce- Bolu- Bartın populasyonları ile aynı kümede yer almaktadır. Doğu ve Batı populasyonlarından oluşan kümeye sırayla Tekirdağ, Orta Karadenizden Samsun populasyonu ve Batı Karadenizden Zonguldak populasyonu bağlanmaktadır. *Mus* örneklerinin insanlar tarafından taşınabilirliği nedeniyle (Gündüz vd. 2005) boğazların bu türde gen akışını kesmede etkili olmadığını ortaya koymaktadır.

Zonguldak populasyonunun Batı Karadeniz kladını oluşturan Düzce- Bolu- Bartın populasyonlarına bağlanmaması, ayrı bir dal oluşturmasının sebebinin Zonguldak bölgesinin farklı coğrafik yapısından kaynaklandığını düşündürmektedir (Helvacı vd. 2011)

Genetik mesafe değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramında her iki türün de Trakya populasyonları Karadeniz populasyonları ile birlikte kümelenmiştir. *M. domesticus* türü için insan etkileri bunun sebebi olabilirken, yabani tür olan *M. macedonicus* için boğazların bariyer olabileceği beklenmesine karşın UPGMA dendrogramında bu türün Trakya ve Karadeniz populasyonları bir arada kümelenmesinin sebeplerinin araştırılması için daha fazla örnek ve farklı metotlar kullanılması gerekmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız primerler ile jeldeki bant profillerinden iki tür birbirinden rahatlıkla ayırt edilmesine rağmen, Spiridonova (2008b)'nın çalışmasında olduğu gibi tür içi alt populasyonları profillerden ayırt edecek spesifik bantlar tespit edilememiştir. Bunun için primer sayısının artırılması yararlı olabilecektir.

Sonuç olarak bu çalışmada Trakya ve Karadeniz bölgesinde *Mus* cinsine ait *M. domesticus* ve *M. macedonicus*'un yayılış gösterdiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada kullanılan RAPD belirteçleri, *Mus* türlerini birbirinden ayırmada ayırıcı karakter olarak ortaya çıkmıştır. *M. domesticus* için 7 primer ve *M. macedonicus* için 8 primer ayırıcı profiller vermiştir. RAPD belirteçleri türlerin ayırımında belirleyici iken altpopulasyonların ayırımında yeterli olmamıştır. Trakya ve Karadeniz populasyonlarının taksonomik statülerinin daha iyi belirlenmesi ve boğazların etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için çok sayıda örneğin incelenmesi ve daha fazla genetik belirteçin (mtDNA, Mikrosatellit ve nükleer DNA) birlikte kullanılarak analiz edilmesi uygun olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Auffray, J.C., Vanlerberghe, F. and Britton-Davidian, J. 1990a. The house Mouse progression in Eurasia: a paleontological and archaeozoological approach. *Biological Journal of the Linnean Society.*, Vol. 41, pp. 13-25.
- Auffray, J.C., Tchernov, E., Bonhomme, F., Heth, G., Simpson, S. and Nevo, E., 1990b. Presence and ecological distribution of *Mus spretoides* and *Mus musculus domesticus* in Israil Circum-Mediterranean vicariance in the genus *Mus*. *Z. Saugetierkd*, Vol. 55, pp. 1-10.
- Anonymous. 2011. Web sitesi: [http://en.wikipedia.org/wiki/Mus\\_spretus](http://en.wikipedia.org/wiki/Mus_spretus), Erişim Tarihi: 24.04.2011.
- Anonymous.2011. Web sitesi: <http://www.pharmaceuticalTechnology.com/roche/roche6.html>, Erişim Tarihi: 30.04.2011.
- Anonymous.2011. Web sitesi: <http://www.pharmaceuticaltechnology.com/roche/roche7.html>, Erişim tarihi: 30.04.2011
- Anonymous.2011. Web sitesi: <http://www.pharmaceuticalTechnology.com/roche/roche8.html>, Erişim Tarihi: 30.04.2011.
- Aydın, Ö. 2004. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. *Dumlupınar Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol.6, pp. 113-130.
- Birben, E. 2006. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimeraz chain reaction). *Astım Allerji İmmünoloji*, Vol.4(2), pp. 92-94.
- Bonhomme, F., Catalan, J., Gerasimov, S., Orsini, P. and Thaler, L. 1983. Le complexe d'espèces du genre *Mus* en Europe centrale et orientale. I-Génétique. *Z. Säugetierkunde*, Vol. 48, pp.78-85.
- Bonhomme, F., 1986. Evolutionary relationships in the Genus *Mus*. *Curr. Topics. Micro. Immunol.*,Vol. 127, pp. 19-34.
- Boursot, P., Auffray, J.-C., Britton-Davidian, J. and Bonhomme, F., 1993. The evolution of house mice. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, Vol. 24, pp. 119-52.
- Boursot, P., Din, W. Anand, R., Darviche, D., Dod, B., von Deimling, F., Tahwar, GP. and Bonhomme, F., 1996. Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA pyhogeny. *Journal of Evolutionary Biology*, Vol.9, pp. 391-415.
- Bozikova, E., Munclinger, P., Teeter, K.C., Tucker, P.K., Macholan, M. and Pialek, P.,

2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: a comparison of two transects. Biological Journal of the Linnean Society., Vol. 84, pp. 363-78.
- Buckie, A. P. and Smith, R.H. 1994. Rodents pests and their control, CAB int. Pres 405 pages, London.
- Bulatova, N. and Kotenkova, E., 1990. Variants of the Y-Chromosome in sympatric taxa of *Mus* in southern USSR. Boll. Zool., Vol.57, pp. 357-60.
- Bulatova, N. S. H., Nadjafova, R. S. and Kozlovsky, A. I. 1991. Cytotaxonomic analysis of species of the genera *Mus*, *Apodemus* and *Rattus* in Azerbaijan. Z.zool.Syst. Evolut.-forsch., Vol. 29, pp. 139-153
- Cenis, J.L. 1993. Identification of four major Meliodogyne spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). Phytopathology, Vol.83, pp. 76-80.
- Chandler, D.P., Wagnon, C.A. and Bolton, H. 1998. Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. Applied and Environmental Microbiology, 64 (2), 669-677.
- Çiftçi, Y. 2003. Balıkçılık ve Su Ürünlerinde Kullanılan Genetik Marker Sistemleri-II. Yunus Araştırma Bülteni, Vol.4(2), pp. 13-16.
- 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 Raporu (BAP-96050306), Ankara, pp. 59.
- Çolak, E., Yiğit, N., Sözen, M., Çolak, R., Özkurt, Ş., Kankılıç, T. and Kankılıç, T. 2006. The morphological Analysis of *Mus domesticus* and *Mus macedonicus* (Mammalia: Rodentia) in Turkey. Turkish. J. of Zoology, Vol.30, pp. 309-317.
- Demeke, T. and Adams, F.P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. BioTechniques, Vol.12, pp. 332-335.
- Demirsoy, A. 1998. Yaşamın Temel Kuralları. Omurgalılar/Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler). Meteksan, Ankara. ISBN: 975-7746-02-9.
- Dev, V. G., Miller, D. A., Tantravahi, R., Schreck, R. R., Roderick, T. H., Erlanger, B. F. and Miller, O. J. 1975. Chromosome markers in *Mus musculus*: Differences in C-banding between the subspecies *M. m. musculus* and *M. m. molossinus*. Chromosoma Vol. 53, pp. 335-344.
- Devrim, A.K. ve Kaya, N. 2004. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg, Vol. 10(2), pp. 209-214.

- Devrim, A.K. ve Kaya, N. 2006. RAPD Tekniği ve Biyokimya Alanındaki Kullanımı. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg, Vol. 12(1), pp. 97-101.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J. and Dveksler, G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. PCR Methods and Applications, pp. 530-537.
- Din, W., Anand, R., Boursot, P., Darviche, D., Jouvin-Marche, B., Dod, B., Jouvin Marche, E., Orth, A., Talwar, GP., Cazenave, PA. and Bonhomme, F., 1996. Origin and radiation of the house mouse: clues from nuclear genes. Journal of the Evolutionary Biology., Vol. 9, pp. 519-39.
- Don, R.H., Cox., P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. and Mattick, J.S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res., Vol. 19, pp. 4008.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, Vol. 12(1), pp. 13-15.
- Ellerman, J. R. 1948. Key to the rodents of South-West Asia in the British Museum Collection. Proc. Zool. London., Vol. 118, pp.765-816.
- Ellerman, J. R., and Morrison- Scott T. C. S. 1951. Checklist of the Palearctic and Indian mammals 1758. Trustees of the British Museum (Natural History), London, pp. 810.
- Erlich, H. A., Gelfand, D. H. and Sninsky, J. J. 1991. Recent advances in polymerase chain reaction. Science, Vol.252, pp. 1643-1650.
- Evans, E.P., Lyon, M.F. and Dalglish, M., 1967. A mouse translocation giving a metacentric marker chromosome. Cytogenetics, Vol. 6, pp. 105-19.
- Gropp, A., Tettenborn, U., and Lehmann, E. 1969. Chromosomenuntersuchungen bei der Tabakmaus (*M. poschiavinus*) und bei Tabakmaus-Hybriden. Experientia, Vol. 25, pp. 875.
- Gropp, A., Winking, H., Zech, L. and Muller, H., 1972. Robertsonian chromosomal variation and identification of metacentric chromosomes in feral mice. Chromosoma, Vol. 39, pp.511-35.
- Gözcelioğlu, B., Çolak, R., Çolak, E. and Yigit, N., 2005. A study on *Mus domesticus* Ruddy, 1772 and *Mus macedonicus* Petrov and Ruzic, 1983 (Mammalia: Rodentia) distributed along the line of Ankara, Bolu and Zonguldak. Türk J. Zool., Vol. 29, pp.133-40.
- Günduru, U. 2008. “Batı Karadeniz ve Trakya’da Yayılış Gösteren *Mus* L., 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsinin Allozim Varyasyonları”. Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Guenet J., and Bonhomme F. 2003. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends in genetic* Vol. 19, pp. 1.
- Gündüz, I., Tez, C. and Searle, J.B., 2000a. House mice with metacentric chromosomes in the Middle East. *Hereditas*, Vol. 133, pp. 175-77.
- Gündüz, I., Tez, C., Malikov, V., Vazir, A., Polyakov, A.V. and Searle J.B., 2000b. Mitochondrial DNA and chromosomal studies of wild mice (*Mus*) from Turkey and Iran. *Heredity*, Vol. 84, pp. 458-67.
- Gündüz, I., Rambau, R.V., Tez, C. and 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 Soc.*, Vol. 84, pp. 473-85.
- Hadidi A, Levy, L. and 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.
- Harrison, D. L. and Bates., P.J.J. 1991. The mammals of Arabia. 2nd ed. Harrison Zool. Mus., Sevenoaks. i-xvi, 354.
- Hauffe, H.C. and Pialek, J., 1997. Evolution of the chromosomal races of *Mus musculus domesticus* in the Rhaetian Alps: the roles of whole arm reciprocal translocation and zonal raiation. *Biological Journal of the Linnean Society*, Vol. 62, pp. 255-78.
- Helvacı, Z., Renaud, S., Ledevın, R., Adriaens, D., Çolak, R., Kankılıç, T., Kandemir, İ., Yiğit, N. and Çolak,E., 2011. Cryptic diversity in Asiatic populations of the edible dormouse (*Glis glis*): a morphometric insight. *Biological Journal of the Linnean society (incelemede)*.
- Henson J. M. and Frech, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 31, pp. 81-109.
- Hoogstraal, H., 1959. Biological observations on certain Turkish, *Haexaphysalis ticxs* (Ixodoinaea, Ixodionea). *J. Prasi.*, Vol. 45, pp. 227-32.
- Hsu, T.C., Markvonk, A. and Marshall, J.T., 1978. G- band patterns of six species of mice belonging to the subgenus *Mus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, Vol. 20, pp. 304-07.
- Innis, M.A. and 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., pp. 3-12.

- Ivanitskaya, E., Gorlov, I., Gorlov, O. and Nevo, E. 1996. Chromosome markers for *Mus macedonicus* (Rodentia, Muridae) from Israel. *Hereditas*, Vol. 124, pp. 145-150.
- Jarvis, P., C. Lister, V. Saabo, and C. Dean 1994. Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, Vol. 24, pp. 685-687
- Karslı, T., Karabağ, K. ve Şahin, E. 2006. DNA Marker Yöntemleri ve Hayvancılıkta Kullanımı. 100. Yıl Üniversitesi II. Ulusal Zooteknik Öğrenci Kongresi'nde Yayımlanan Poster özeti.
- Kaya, Z. and Neale, D. B. 1995. Linkage Map Based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in *Pinus brutia*. *Silvae Genetica*, Vol. 44, pp. 110-116.
- Kemp, D.J., Smith, D.B., Foote, S.J., Samaras, N. and Peterson, M.G. 1989. Clorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Prac. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 86, pp. 2423-2427.
- Kuru, M. 1999. Omurgalı Hayvanlar. Palme Yayıncılık, Ankara. ISBN: 975-7477-52-4.
- Krystufek, B., Macholan, M., 1998. Morphological differantation in *Mus spicilegus* and the taxonomic status of mound-building from the Adriatic coast of Yugoslavia. *J. Zool., Lond.*, Vol. 245, pp.185-96.
- Kwok, S., Chang, S-Y., Sninsky, J.J. and Wang, A. 1994. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications*, pp. 539-547.
- La Notte, P., Minafra, A. and Sandarelli, P. 1997. A spot-PCR technique for the detectionof phloem-limited grapvine viruses. *Journal of Virological Methods*, Vol. 66, pp. 103-108.
- Leonard, A. and Dectnudt, G.H. 1967. A new marker for chromosome studies in the house mouse. *Nature*, Vol. 214, pp. 504-505.
- Levy, L., Hadidi, A. and Garsey, S.M. 1992. Reverse transcription-polymerase chain reaction asays for the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, Vol. 2, pp. 800.
- Loh, E.Y., JElliot, .F., Cwirla, S., Lanier L. and Davis, M.M. 1989. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor chain. *Science*, Vol. 243, pp. 217-223.
- Lundrigan, B.L., Jansa, S. and Tucker, P.K. 2002. Phylogenetic relationships in the genus *Mus* based on maternally, paternally, and bi-parentally inherited characters. *Systematic Biology*, Vol. 51, pp. 410-431.

- Macholan, M., Zima, J. 1994. *Mus domesticus* in western Bohemia: a new mammal for the Czech Republic. *Folia Zool.*, Vol. 43, pp. 39-41.
- MacKenzie, D.J, McLean, M.A., Mukerji S. and Green, M. 1996. Improved RNA Extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease*, Vol. 81, pp. 222-226.
- Marshall, J. T., Sage, R. D. 1981. Taxonomy of the house mouse. *Symp. Zool. Soc. London*, Vol. 47, pp. 15-25.
- Marshall, J. T. 1986. Systematics of the genus *Mus*. *Curr. top. in Microbiol. Immunol.*, Vol. 127, pp. 12-18.
- Matsuda, Y., Chapman, V.M., 1991. Insitu analysis of centromeric satellite DNA segregating in *Mus* species crosses. *Mamm. Genome*, Vol. 1, pp. 71-77.
- Mezhzherin, S. V., Kotenkova, Elena V. and Mikhailenko, A. G. 1998. The house mice, *Mus musculus* s. l., hybrid zone of Transcaucasus. *Z. Säugetierkunde* Vol. 63, pp. 154-168.
- Milishnikov, A.N., Lavrenchenko, L.A., and Lebedev, V.S., 2004. Origin of the house mice (Superspecies complex *Mus musculus* sensu lato) from the Transcaucasia Region: A new look at dispersal routes and evolution. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 40 (9), pp. 1011-26.
- Minafra, A., Hadidi, A. and Sandarelli, P. 1993. Sensitive immunocapture and multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of grapevine leafroll associated virus III and grapevine virus B, 11<sup>th</sup> Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), (Abstr.), pp. 137.
- Mishra, M., Dubey, N., Totey, S.M., Bhat, K.V., Babu, S., Awasthi-Kalia, M., Anand, R.K., 2002. Phylogenetic relationships and genetic polymorphisms in wild Indian mice. *Biomolecular Engineering*, Vol. 18, pp. 281-88.
- Moriwaki, K., 1986. Molecular and cytogenetical differentiation of *Mus musculus* species. *Tokyo Univ. Tokyo Press*, pp. 221-26.
- Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, April, pp. 56-61.
- Munford, R.A and Seal, S.E. 1997. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *Journal of Virological Methods*, Vol. 69, pp. 73-79.
- Mursaloglu, B., 1978. Türkiye Kemiricileri (Mammalia: Rodentia). (Yayınlanmamış TÜBİTAK raporu, TBAG-52).

- Musser, G. and Carleton., M., 1993. Mammals Species of the world, Family Muridae., pp. 501-753.
- Nachman, M.W., Boyer, S.N., Searle, J.B. and Aquando, C.F., 1994. Mitochondrial DNA variation and the evolution of Robertsonian chromosomal races of house mice, *Mus domesticus*. Genetics, Vol. 136, pp. 1105-20.
- Nance, V., Vanlerberghe, F., Nielsen, J.T., Bonhomme, F. and Britton-Davidian, J., 1990. Chromosomal introgression in house mice from the hybrid zone between *M. m. domesticus* and *M. m. musculus* in Denmark. Biological Journal of the Linnean Society, Vol. 41, pp. 215-227.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity ve genetic distance from a small number of individuals. Genetics, Vol. 89, pp. 583–590.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Uni. Press, New York.
- Nolasco, G., C. de Blas, V. Torres and F. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. Journal of Virological Methods, Vol. 45, pp. 201-218.
- Nowak, R. 1999. *Walker's Mammals of the World, vol. 2*. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.
- Ochman, H., Gerber, A.S. and Hartl, D.L. 1988. Genetic application of an inverse polymerase chain reaction. Genetics, Vol. 120, pp. 621.
- Ognev, S. I. 1947. Mammals of the U.S.S.R. and adjacent countries. Vol. V. Rodents. Moscova, pp. 1-662.
- Orsini, P. 1982. Facteurs régissant la répartition des souris en Europe: Intérêt du modèle souris pour une approche des processus évolutifs. Thèse 3ème Cycle, Université Montpellier II.
- Orth, A., Auffray, J-C. and Bonhomme, F., 2002. Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse *Mus macedonicus* reveal multiple glacial refuges south of Caucasus. Heredity, Vol. 89, pp. 353-57.
- Özkan, B. 1995. Gökçeada ve Bozcaada Adalarının Kemiricileri. Doktora tezi. Trakya Üniversitesi, s. 96-108.
- Özsu, N. 2011. “İç Anadolu Bölgesin’de Yayılış Gösteren *Mus* L., 1758 (Mammalia: Rodentia) Cinsinin Morfolojik Analizi”. Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Petrov, B. and Ruzic, A., 1983. Proc. Fauna SR Serbia, Serbian Acad. Sci. and Arts, Belgrade, Vol. 2, pp. 177.
- Petrov, B., and Ruzic, A., 1985. Taxonomy and distribution of members of the genus *Mus* (Rodentia: Mammalia) in Yugoslavia. Proceeding on the fauna of SR Serbia., Vol. 3, pp. 209-43.
- Pialek, J., Hauffe, H.C. and Searle, J.B., 2005. Chromosomal variation in the house mouse. Biological Journal of the Linnean Society, Vol. 84, pp. 535-563.
- Prager, E.M., Orrego, C. and Sage, R.D., 1998. Genetic variation and phylogeography of central Asian and other house mice, including a major new mitochondrial lineage in Yemen. Genetics, Vol. 150, pp. 835-61.
- Rosner, A., Maslenin, L. and Sara, S. 1997. The use of short and long PCR products for improved detection of prunus necrotic ringspot virus in woody plants. Journal of Virological Methods, Vol. 67, pp. 135-141.
- Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile L.S., Daubert, S.D. and Golino, D.A.1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. Phytopathology, Vol. 85, pp. 347-352.
- Rowhani, A., Biardi, L., Routh, G., Daubert, S.D. and Golino, D.A..1998. Development of a sensitive colorimetric-PCR Assay for detection of viruses in woody plants. Plant Disease, Vol. 82, pp. 1-15.
- Sage, R. D. 1981. Wild mice in the mouse in medical research. Academic Press, New York, Vol.1, pp. 39-90
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich. H. A. and Arnheim, N.1985. Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, Vol. 230, pp. 1350-1354.
- Schaad N.W., Hendson, M.,Kumagai, L., Matsumoto, T., Forster, R.L. and Efstathios, H. 1997. Assessment of the reliability of a bio-pcr test for routine detection of *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola in commercial seed beans. <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000008/04/0000080497.html>.
- Scott, D. and Deahl, K. L. 1998. The differentiation of *Phytophthora* species that are pathogenic on potatoes by an asymeric PCR combined with single-strand conformation polymorphism analysis. Lett. Appl. Microbiol., Vol. 27, pp. 39-44.
- Schwarz, E. and Schwarz, H. K. 1943. The wild and commensal stocks of the house mouse, *Mus musculus*. J. Mammal., Vol. 24, pp. 59-72.

- Searle, J.B., 1993., Chromosomal hybrid zones in Eutherian Mammals. In Hybrid zones and the Evolutionary Process (ed. R.G. Harrison). Oxford University Press New York, pp. 309-353.
- Semblat, J.P., Wajnberg, E., Dalmaso, A., Abad, P. and Castagnone- Sereno, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology*, Vol. 7, pp. 119-125.
- Slijepcevic, P., 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion Chromosoma, Vol. 107, pp. 136-40.
- Spiegel, S., Scot, S.W., Bowman-Vance, V., Tam, Y., Galiakparov, N.N. and A. Rosner. 1996. Improved detection of *Prunus* necrotic ringspot virus by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 102, pp. 681-685.
- Spiridonova, L. N., Korobitsyna, L. V., Yakimenko and Bogdanov, A. S. 2008a. Genetic Differentiation of Subspecies of the House Mouse *Mus musculus* and Their Taxonomic Relationships Inferred from RAPD-PCR Data. *Russian Journal of Genetics*, vol. 44 (6), pp. 732-739.
- Spiridonova, L. N., Korobitsyna, L. V., Yakimenko and Bogdanov, A. S. 2008b. Genetic Diversity of the House Mouse *Mus musculus* and Geographic Distribution of Its Subspecies-Specific RAPD Marker on the Territory of Russia. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 44 (5), pp. 674-685.
- Stainer, H.M. and Vauk, G., 1966. Säugetiere aus dem dem Beysehir-Gebiet (Wil. Konya- Kleinasien). *Zool. Anz.*, Vol. 176, pp. 98-102.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Kanehisa, T. and Moriwaki, 1990. Variation in the distribution of silver staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mice, *Mus musculus*. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 7, pp. 271-83.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.*, Vol. 24, pp. 1596-1599
- Thaler, L., Bonhomme, F. and Britton-Davidian, J., 1980. Molecular population genetics of mice. Significance of the Mediterranean Basin. *Hereditas*, Vol. 89, pp. 149.
- Thaler, L., Bonhomme, F. and Britton-Davidian, J. 1981. Processes of speciation and semi-speciation in the house mouse. *Symp. zool. Soc. Lond.*, Vol. 47, pp. 27-41.
- Triglia, T., Peterson, M.G. and Kemp, D.J 1988. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 16, pp. 8186-8190.

- Tryfonopoulos, G., Chondropoulos, B. and Fraguedakis-Tsolis, S. 2005a. Allozyme polymorphism among 14 populations of the house Mouse, *Mus musculus domesticus*, from Greece. *Biochemical genetics*, 43, Nos. ½
- Tryfonopoulos, G., Chondropoulos B. and Fraguedakis-Tsolis, S. 2005b. Mitochondrial DNA polymorphisms of the house Mouse *Mus musculus domesticus* from Greece, focusing on the Robertsonian chromosomal system of north-west Peloponnese. *Biological Journal of the Linnean Society*, Vol. 84, pp. 643–651.
- Türkyılmaz, S. ve Esendal, Ö.M. 2002. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, Vol. 8(1), s.71-76
- Tzortzakakis, E.A. Blok, V.C. Phillips, M.S. and Trudgill, D.L. 1999. Variation in root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in Crete in relation to control with resistant tomato and pepper. *Nematology*, Vol. 1 (5), pp. 499-506.
- Ütük, A.E., Şimşek, S. ve Köroğlu, E. 2005. *Echinococcus* Cinsinin Moleküler Genetik Karakterizasyonu, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, Vol. 29 (3), s. 171-176.
- Walter, N.G., Schwille, P. and Manfred, E. 1996. Fluorescence correlation analysis of probe diffusion simplifies quantitative pathogen detection by PCR. *Prac. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 93, pp. 1205-12810.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. 1992. The polymerase chain reaction In: *Recombinant DNA*. Second Edition. New York, pp. 79-98.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. *DNA Fingerprinting in plants and fungi*. CRS Press. Florida.
- Wetzel, T., T. Candresse, M. Ravelonandro and J. Dunez. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33, 355-365.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18 (22), pp. 6531.
- Wilson, D. E. and Reeder, D. M., 2005. *Mammal species of the world*. Smithsonian Institution Press. Washington. USA.
- Winking, H., Nielsen, K., Gropp, A., 1980. Variable position of NORs in *Mus musculus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, Vol. 26, pp. 158-64.
- Vinogradov, B. S. and Argyropulo, A. I. 1941. *Fauna of the U.S.S.R. Mammals* Translated from Russian, Moscow, Leningrad, pp. 1-230.

- Yang, X., Hadidi, A. and Garnsey, S.M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of *citrus exocortis* and *cachexia* viroids from infected *citrus* hosts. *Phytopathology*, Vol. 82, pp. 279.
- Yeh, C.F., Yang, R. and Boyle, T. 1997. POPGENE Version 1.31. Windows-based Software for Population Genetics Analysis.
- Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Miyashita, N., Matsushima, Y., Shi, L. M., Cho, W. S., Zhen, X. L., Tagashira, Y. 1988. Hybrid origin of Japanese mice *Mus musculus molossinus*: evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 5, pp. 63-78.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Serra ANGIN

Doğum yeri : Samsun

Doğum Tarihi: 09.04. 1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Samsun Milli Piyango Anadolu Lisesi (1995–2002)

Lisans : Gazi Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2003–2007)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Şubat 2009- Temmuz 2011)

### Çalışmış olduğu kurum:

Interlab Laboratuar Ürünleri San. ve Tic. A.Ş (01.02.2010-01.11.2010)

### Kongre:

20. Uluslararası Biyoloji Kongresi. (Katılımcı) 2010, Haziran.