

**T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE'DEKİ BAZI ETÇİL MEMELİ TÜRLERİNİN (MAMMALIA:
CARNIVORA) DNA BARKODLAMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aslı YILDIRIM ÖZKURT

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Perinçek Seçkinozan ŞEKER

ARTVİN 2024

TEZ BEYANNAMESİ

Artvin Çoruh Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Türkiye'deki Bazı Etçil Memeli Türlerinin (Mammalia: Carnivora) DNA Barkodlaması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Perinçek Seçkinozan ŞEKER'in sorumluluğunda tamamladığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı taahhüt ederim. Aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

- ☐ Tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.
- ☐ Tezim sadece Artvin Çoruh Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.
- ☐ Tezimin 6 ay süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

.../.../2024

Aslı YILDIRIM ÖZKURT

T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE'DEKİ BAZI YIRTICI MEMELİ TÜRLERİNİN (MAMMALIA:
CARNIVORA) DNA BARKODLAMASI**

Aslı YILDIRIM ÖZKURT

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12/02/2024

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 16/02/2024

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Münir UÇAK

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Perinçek Seçkinozan ŞEKER

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Hayal AKYILDIRIM BEĞEN

ONAY:

Bu Yüksek Lisans Tezi, Artvin Çoruh Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../...tarihinde **oybirliği** ile uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun.../.../... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.../.../.....

Prof. Dr. Çağatay KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Türkiye'deki Bazı Etçil Memeli Türlerinin (Mammalia: Carnivora) DNA Barkodlaması” konusunda yapılan bu çalışma; Artvin Çoruh Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma için beni yönlendiren, çalışmanın hazırlanması süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, çalışma kapsamında örneklerini kullandığım, çalışmanın her aşamasında yardımcı olan değerli danışmanın Dr. Öğr. Üyesi Perinçek Seçkinozan ŞEKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın laboratuvar sürecinde yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar malzemesi desteği sağlayan ve örneklerini kullandığım değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Yesari SELÇUK, Öğr. Gör. Dr. Gökçe Ali KELEŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Hayal AKYILDIRIM BEĞEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleri ile bu çalışmanın hayata geçirilmesinde yardımlarını esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmanın her aşamasıyla araştırmacılara yararlı olmasını dilerim.

Ash YILDIRIM ÖZKURT

Artvin- 2024

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEZ BEYANNAMESİ	I
JÜRİ KABUL TUTANAĞI	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	V
SUMMARY	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM	6
2.1 Örneklerin elde edilmesi	6
2.2 Deneysel çalışmalar	6
2.2.1 Total genomik DNA izolasyonu	6
2.2.2 PCR ile DNA amplifikasyonu	11
2.2.3 Elektroforez çalışmaları	14
2.3 DNA dizilerinin istatistiksel analizi	16
3. BULGULAR	18
3.1 BLAST temelli tanımlama	18
3.2 Filogeni temelli tanımlama	19
4. TARTIŞMA	24
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	26
KAYNAKLAR	27
ÖZGEÇMİŞ	30

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ BAZI ETÇİL MEMELİ TÜRLERİNİN (MAMMALIA: CARNIVORA) DNA BARKODLAMASI

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye’de yaşayan bozayı (*Ursus arctos*), altın çakal (*Canis aureus*) ve kaya sansarı (*Martes foina*) olarak bilinen üç farklı karnivor memeli türünün DNA barkod bölgesi olarak bilinen mitokondriyal DNA’da bulunan sitokrom oksidaz *c* alt ünite I geni (*COI*) dizilendi. Elde edilen DNA dizileri, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) seçeneği kullanılarak, veritabanında mevcut olan diğer türlere ait diziler ile benzerlik bakımından (PI, pairwise identity, ikili benzerlik) karşılaştırıldı. Bunun yanı sıra, *COI* gen dizileri, Neighbour-Joining ve haplotip örgüsü olmak üzere, iki farklı filogenetik analiz yöntemine tabi tutuldu. BLAST sorgusu ve filogenetik analizler sonucunda, çalışılan türlere ait barkodlama bölgelerinin bu türler için taksonomik çalışmalarda karşılaşılan sorunların çözümü için faydalanılabilecek bir moleküler belirteç olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Karnivor memeliler, DNA barkodlama, sitokrom oksidaz *c* alt ünite I geni, BLAST, filogeni, Türkiye

SUMMARY

DNA BARCODING OF SOME CARNIVOROUS MAMMALIA SPECIES (MAMMALIA: CARNIVORA) IN TÜRKİYE

Within the scope of this study, the cytochrome oxidase *c* subunit I gene region (*COI*) of mitochondrial DNA, known as the DNA barcode region, of three different carnivorous mammal species living in Turkey, known as the brown bear (*Ursus arctos*), the golden jackal (*Canis aureus*) and the rock marten (*Martes foina*), was sequenced. The obtained DNA sequences were compared in terms of similarity (PI, pairwise identity, pairwise similarity) with the sequences of other species available in the database using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) option in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. In addition, *COI* gene sequences were subjected to two different phylogenetic analysis methods: Neighbour-Joining and haplotype network. As a result of BLAST query and phylogenetic analyses, it was concluded that the barcoding regions of the studied species could be a molecular marker that can be used to clear the problems encountered in taxonomic studies for these species.

Keywords: Carnivore mammals, DNA barcoding, cytochrome oxidase *c* subunit I gene, BLAST, phylogeny, Türkiye

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. İzole edilen DNA'ların NanoDrop spektrofotometre değerleri	10
Tablo 2. Artvin'den elde edilen örneklerle ait ilk 10 sıradaki BLAST eşleşmeleri	18
Tablo 3. <i>COI</i> gen dizilimine göre haplotip listesi	22
Tablo 4. <i>COI</i> gen dizilimine göre türler arasındaki K2P mesafesine göre hesaplanan genetik uzaklıklar ve standart hata değerleri.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnvitrogen PureLink™ Genomik DNA mini izolasyon kiti	7
Şekil 2. DNA izolasyonun kiti ve DNA izolasyonunda kullanılan araç gereçler.....	7
Şekil 3. DNA izolasyonunda kullanılan ultrasantrifüj cihazı	9
Şekil 4. DNA izolasyon kitinde bulunan tampon çözeltiler	9
Şekil 5. DNA izolasyon kitinde bulunan kolon ve tüpler.....	10
Şekil 6. PCR reaksiyon koşulları.....	12
Şekil 7. Gradyent PCR için kuyucuk sıcaklıkları (A-H arası)	13
Şekil 8. Gradyent PCR sonuçları.....	13
Şekil 9. Güç kaynağı ve elektroforez tankı.....	14
Şekil 10. Jel görüntüleme sistemi	15
Şekil 11. PCR ile çoğaltılan <i>COI</i> gen bölgesinin jel elektroforezi.....	16
Şekil 12. BioEdit programında <i>COI</i> gen bölgesinin konsensus dizisinin oluşturulması.....	17
Şekil 13. K2P mesafesi temel alınarak oluşturulan Neighbour-Joining filogenetik ağacı ..	20
Şekil 14. Türler arasındaki evrimsel ilişkileri gösteren haplotip örgüsü.....	21

KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
π	Nükleotid Çeşitliliği
°C	Santigrat Derece
μ l	Mikrolitre
μ mol	Mikromol
A	Adenin
C	Sitozin
dATP	Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	Deoksisitidin Trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleotid Ttrifosfat
dGTP	Deoksiguanozin Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
dTTP	Deoksitimidin Trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
K2P	Kimura 2-Parametresi
G	Guanin
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
MA	Molekül Ağırlığı
n	Örnek sayısı
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
NJ	Neighbour Joining (Komşu Birleştirme)
pH	Power of Hydrogen (Hidrojen Gücü)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RNase	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

rRNA	Ribosomal RNA
T	Timin
TAE	Tris asetat EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
tRNA	Transfer RNA



1. GİRİŞ

Mitokondriyal DNA memeli hayvanlar üzerine yapılan sistematik çalışmalarda sıklıkla kullanılan önemli bir mikroevrimsel filogenetik belirteçtir. Mitokondriyal DNA'nın sahip olduğu anne tarafından (maternal) kalıtılması, genetik rekombinasyonun olmaması, hücre içinde yüksek kopya sayının olması ve yüksek mutasyon hızı gibi bazı özellikler moleküler belirteç olarak bu molekülü önemli derecede kıymetli kılmaktadır (Avice, 2001). Mitokondriyal DNA'nın yapısı ve organizasyonu memeliler arasında büyük oranda benzerlik gösterirken, uzunluk bakımından türler arasında farklılık gösterebilir. Memelilerde mitokondriyal DNA yaklaşık olarak 16.600 nükleotid uzunluğundadır. Mitokondriyal DNA çift iplikçikten oluşan halkasal yapıli bir genomdur. Bu halkasal genomda, molekül ağırlıklarının farklı olmasından dolayı dışta bulunan ağır iplikçik Heavy (H), içte bulunan hafif iplikçik de Light (L) olarak isimlendirilmiştir. Memeli mitokondriyal genomunda toplam 37 gen kodlanır. Bunlardan, iki ribozomal RNA (*12S rRNA* ve *16S rRNA*), 14 transfer RNA (tRNA) ve 12 protein kodlayan gen (PCG) ağır (H) iplikçik üzerinde yer alır. Hafif (L) iplikçikte ise sekiz tRNA (*tRNA^{Gln}*, *tRNA^{Ala}*, *tRNA^{Asn}*, *tRNA^{Cys}*, *tRNA^{Tyr}*, *tRNA^{Ser2}*, *tRNA^{Glu}* ve *tRNA^{Pro}*) ve tek bir protein kodlayan gen (*ND6*) bulunur. Ağır iplikçik üzerinde bulunan *tRNA^{Phe}* ve *tRNA^{Pro}* genleri arasında, mitokondriyal genomun organizasyonundan sorumlu olan ve protein kodlamayan bir bölge olan kontrol bölgesi bulunur (Taanman, 1999, Pakendorf ve Stoneking, 2005).

Yakın zamana kadar farklı memeli türlerinin filogenisi ve sistematigi üzerine yapılan birçok çalışmada, mitokondriyal DNA'nın sitokrom *b* (*CYTB*), NADH dehidrojenaz 1 (*ND1*), 12S ribozomal RNA (*12s rRNA*), 16S ribozomal RNA (*16S rRNA*) gibi protein kodlayan bazı genlerin yanı sıra, protein kodlamayan ve mitokondriyal genomun organizasyonundan sorumlu olan kontrol bölgesi (CR) dizileri yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu çalışmalara ilaveten, günümüzde artık türlerin filogenileri ve sistematik durumları üzerine yapılan çalışmalar tüm mitokondriyal genom

dizilimlerini sıkça kullanmaya başlamıştır (Kankılıç ve ark. 2018, Karacan ve ark. 2020, İbiş ve ark. 2024, Şeker 2024).

Bunlara ilaveten 2000’li yılların başında, mitokondriyal genomun sitokrom *c* oksidaz alt ünite I geninin (*COI*), bir barkod gen olarak hayvanlar alemi için küresel ölçekte bir biyolojik tanımlama sisteminin merkezini oluşturabileceği üzerine önemli bulgular elde edilmiştir (Hebert ve ark. 2003a). Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada öncelikli olarak, üst taksonomik kategorilerde bulunan canlıların az sayıda örneklemesinden elde edilen *COI* profillerinin (barkod bölgelerinin), çoğunlukla yeni analiz edilen taksonları uygun şube veya takıma atadığını göstermişlerdir. İkinci olarak, tür düzeyindeki tanımlamaların, kapsamlı *COI* profilleri oluşturularak elde edilebileceğini ortaya koymuşlardır. Çalışmaya konu olan yakın akraba 200 Lepidoptera (pul kanatlılar) türünün, her birinden tek bir bireyin analizine dayalı olarak elde edilen model bir *COI* profilinin, sonraki örneklerin doğru şekilde tanımlanmasında %100 başarılı olduğu gösterilmiştir. Böylece mitokondriyal DNA’nın *COI* gen dizilimine dayanan ve DNA barkodlama sistemi olarak öne sürülen bu tür bir tanımlama sisteminin tamamen geliştirildiğinde, güvenilir, uygun maliyetli ve türlerin tanımlanmasıyla ilgili mevcut sistematik sorunlara erişilebilir bir çözüm getirebilecek bir *COI* tanımlama sistemi olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu barkodlama sisteminin, aynı zamanda yaşamın çeşitliliğine ve moleküler evrimin kurallarına ilişkin önemli yeni yaklaşımlar da üretebileceğini ifade etmişlerdir. Müteakip bir diğer çalışmada elde edilen sonuçlar, *COI* genindeki dizi farklılıklarının, Cnidaria (sölenterler) dışındaki tüm hayvan filumlarındaki yakın akraba türlerin ayrımını düzenli olarak mümkün kıldığını göstermiştir (Hebert ve ark. 2003b). Tür teşhisindeki bu yüksek yüzdeli başarının, çoğu hayvan grubunda *COI* geninin dizilimin yüksek oranda farklı olduğu anlamına geldiği ifade edilmiştir.

Mitokondriyal DNA *COI* gen dizilimi temel alınarak geliştirilen bu barkodlama sisteminin bazı avantajları vardır. Bu sistem, standartlaştırılmış ve yüksek teknoloji tanımlama araçları sağlayarak sistematığın çıktılarını mümkün olan en geniş son kullanıcı topluluğuna sunar; örnek olarak biyotıp alanında parazitler ve vektörlerin tanımlanması, tarım alanında zararlıların tanımlanması ve nesli tükenmekte olan türlerin uluslararası ticaretinin önlenmesi verilebilir. Bunun yanı sıra, taksonomistlerin

üzerindeki muazzam tanımlama yükünü hafifletmek, böylece taksonomistlerin sınırlandırılması, aralarındaki ilişkilerin çözülmesi ve yeni türlerin keşfedilip tanımlanması gibi daha ilgili görevlere odaklanabilmelerine yardımcı olur. Aynı türün çeşitli yaşam evrelerini eşleştirmede fayda sağlar (örneğin fideler, larvalar) ve genel halk için bir biyolojik okuryazarlık aracı sağlar (Savolainen ve ark. 2005).

Sonuç olarak DNA barkodlama, günümüzde bir organizmanın DNA'sındaki bir veya daha fazla standartlaştırılmış kısa genetik işaretleyiciyi kullanarak onu belirli bir türe ait olarak tanımlayan taksonomik bir yöntem olarak kullanılması şeklinde tanımlanmaktadır. Bu amaçla kısa genetik işaretleyici olarak *COI* geninin nükleotid dizilimi kullanılmaktadır. Bu gen toplamda 1545 nükleotid uzunluğundadır ve bu genin yaklaşık olarak 650 nükleotid uzunluğundaki kısmı barkod gen bölgesi olarak bilinir. Bu yöntem, yani DNA barkodlama sayesinde bilinmeyen DNA örnekleri, bir referans kütüphanesi ile karşılaştırmaya dayalı olarak kütüphanede kayıtlı olan türlere göre kolaylıkla tanımlanabilir. Ayrıca, DNA barkodlama Linnaean taksonomik sistemini daha erişilebilir hale getirecek ve ekoloğlara, doğa korumacılara ve zararlıların, istilacı türlerin kontrolü ve gıda güvenliğinden sorumlu kurumların çeşitliliğine fayda sağlayacaktır. Örnekleri bilinen türlere atamanın yanı sıra, DNA barkodlama, taksonomistlerin örnekleri hızlı bir şekilde teşhis edebilmelerine olanak tanıyarak ve yeni türleri temsil edebilecek farklı taksonları vurgulayarak yeni türlerin keşif hızını artıracaktır. DNA barkodlama, yeteneklerini bu yollarla artırarak taksonomistlere büyük ölçüde kolaylık sunan bir sistemdir (Hebert ve ark. 2003a, Hebert ve ark 2003b).

Bunun için “The Barcode of Life Data System” (BOLD, Yaşam Barkodu Veri Sistemi) olarak bilinen bir veritabanı geliştirilmiştir. Bu veritabanı, DNA barkod verilerinin birleştirilmesini ve kullanılmasını destekleyen çevrimiçi bir çalışma alanıdır. Bilimsel topluluk için iş birliğine dayalı bir merkez olarak iş görür ve genel olarak vatandaşlar için kamu kullanımına açık bir kaynaktır (URL-1). Bugün itibari ile (6 Şubat 2024) bu veritabanına barkod gen dizilimi girilmiş 3909 memeli türü bulunmaktadır, bunlardan 212’si karnivor memeli türlerine ait barkod gen dizilimidir.

Karnivor memeliler, etçil memeliler olarak bilinirler ve plasentalı memelilerin Carnivora olarak bilinen takımını oluştururlar. Carnivora takımı kedigiller (Feliforma) ve köpekgiller (Caniforma) olarak bilinen iki alt takıma ayrılır. Carnivora takımı yaklaşık olarak 279 tür içerir. Bu takımın temsilcileri oldukça soğuk olan kutuplardan kurak çöllere kadar çok çeşitli habitatlara uyum sağlamışlardır. Ülkemizde karnivor memeliler 16 farklı türle temsil edilir (Can, 2004). Bu türlerin filogenisi ve sistematigi üzerine çok sayıda moleküler çalışma bulunmaktadır. Kızıl tilki, *Vulpes vulpes*'in genetik çeşitliliği ve filocoğrafyasını üzerine mitokondriyal DNA sitokrom *b* geninin kısmi dizilerinin kullanıldığı ve yakın zamanda yapılan bir çalışmada Türkiye'de yaşayan tilki popülasyonlarının yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğu ve başlıca iki haplotip grubuna ayrıldığı belirlenmiştir (İbiş ve ark. 2014). Benzer amaçlarla Türkiye'de yaşayan altın çakal *Canis aureus* popülasyonlarının mitokondriyal DNA kontrol bölgesinin kısmi dizilerine dayalı olarak yapılan analizler, bu türün Türkiye'deki popülasyonlarının nispeten yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ortaya göstermiştir (İbiş ve ark. 2015). Bir diğer çalışmada, Aksöyek ve ark. (2017), Türkiye ve İran'dan Canidae familyasında yer alan üç farklı karnivor türünün (*Canis lupus*, *Canis aureus*, *Vulpes vulpes*) DNA barkodlamasını yapmışlar ve her üç türün benzersiz barkod dizilerinin olduğunu ve dizilerin hiçbirinin bu türler arasında paylaşılmadığını ortaya koymuşlardır. Kızıl tilkiler üzerine mitokondriyal DNA kontrol bölgesi dizileri kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise, genetik analizler İran ve Türk popülasyonlarında dikkate değer bir genetik varyasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır (Telcioğlu ve ark. 2019).

Bu çalışmalara ilaveten, yaklaşık olarak son 20 yıllık süreçte, farklı canlı gruplarında yer alan ikiz ya da gizli türleri (sibling tür, kriptik tür) açığa çıkarmak ve farklı coğrafyalardaki türleri tanımlamak amacıyla COI dizilerine dayalı DNA barkodları, taksonomik sorunların çözümüne destek sağlamak amacıyla moleküler bir belirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Sığırlar, primatlar, yarasalar gibi memelilerin yanı sıra pul kanatlılar, halkalı solucanlar, balıklar ve kuşlar gibi canlı grupları üzerine yapılan çalışmalar bu amaçla yapılan barkodlama çalışmalarına örnek olarak verilebilir (Lorenz ve ark. 2005, Ward ve ark. 2005, Kerr ve ark. 2007, Clare ve ark.

2007, Lara ve ark. 2010, Cai ve ark. 2011, Maturana ve ark. 2011, Mutanen ve ark. 2015).

Yukarıda verilen literatür verileri ışığında, bu çalışma Türkiye’de yaşayan bazı karnivor memeli türlerinin (*Ursus arctos*, *Canis aureus* ve *Martes foina*) sitokrom oksidaz *c* alt ünite I (*COI*) gen dizilerine dayalı olarak mitogenomdaki barkodlama bölgelerini belirlemeyi amaçlamıştır. Böylece Türkiye’de yaşayan karnivor memelilerin genetik yapılarına ilişkin bilgilerin ortaya konulmasıyla beraber, çalışılan türlerin sistematığıne, filogenisine ve ülkemiz biyolojik çeşitliliğine katkı sağlanarak korumaya biyolojisine yönelik çalışmalar için bir alt yapı oluşturulacaktır.



2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1 Örneklerin elde edilmesi

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan örnekler tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Perinçek Seçkinozan ŞEKER, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Yesari SELÇUK ve Öğr. Gör. Dr. Gökçe Ali KELEŞ tarafından Artvin il ve ilçeleri arasındaki muhtelif karayollarında araç çarpması sonucu ölmüş karnivor memeli türlerinden elde edildi. Çalışmada Artvin ilinden elde edilen üç farklı karnivor memeli türüne (*Ursus arctos*, *Canis aureus* ve *Martes foina*) ait dokular kullanıldı.

2.2 Deneysel çalışmalar

Tezin deneysel aşamaları BİLTEKMER’de (Artvin Çoruh Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalar iki aşamalı olarak yürütüldü. Birinci aşamada örneklerle ait dokulardan total genomik DNA izolasyonu yapıldı. İkinci aşamada ise hücre dışı koşullarda DNA amplifikasyonuna olanak sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *COI* gen bölgesinin çoğaltımı gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonundan sonra elde edilen PCR ürünleri *COI* gen bölgesinin dizileme reaksiyonları için MSM Ürün ve Hizmet (İstanbul) firmasına gönderildi (URL-2).

2.2.1 Total genomik DNA izolasyonu

Total genomik DNA izolasyonu, İnvitrogen PureLink™ Genomik DNA mini izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu DNA izolasyon kiti memeli hücrelerinden ve dokularından total genomik DNA'yı izole etmek amacıyla kullanılmaktadır (Şekil 1 ve Şekil 2).



Şekil 1. Invitrogen PureLink™ Genomik DNA mini izolasyon kiti



Şekil 2. DNA izolasyonun kiti ve DNA izolasyonunda kullanılan araç gereçler

Bu izolasyon kiti içinde yer alan protokolün aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibi uygulandı. Öncelikle kuru ısı bloğu 55°C sıcaklığa ayarlandı. Sonrasında örnekler için yaklaşık 25 mg kadar kıyılmış dokular hazırlandı ve mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Tüpe içine 180 µl PureLink™ Genomik sindirim tamponu ve 20 µl kadar Proteinaz K ilave edildi. Dokuların sindirimi tamamlanana kadar ara sıra vorteksleme işlemi gerçekleştirildi ve dokular 55°C'de kuru ısı bloğunda gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, sindirim kalıntılarını uzaklaştırmak için lizat oda sıcaklığında 3 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüjlendi (Şekil 3). Santrifüjden sonra, süpernatant yeni, steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Lizata 20 µl RNaz A ilave edildi, kısa bir vorteksleme yapılarak tamamen karışması sağlandı. Sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika süresince inkübe edildi. Lizata 200 µl PureLink™ Genomik sindirim tamponu eklendi. Vortekslenerek homojen bir çözelti elde edildi. Sonraki aşamada, lizata 200 µl %96-100 etil alkol eklendi ve homojen bir karışım elde etmek için vorteksleme yapılarak karışması sağlandı (Şekil 4). Sindirim aşamasından sonra saflaştırma aşamasına geçildi. Bu aşamada öncelikli olarak izolasyon kiti ile gelen Toplama Tüpündeki PureLink™ Döndürme Kolonuna PureLink™ Genomik sindirim tamponu ve etil alkol ile hazırlanan lizat (~650 µl) eklendi, sonra 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Daha sonra, döndürme kolonu yeni, temiz bir PureLink™ Toplama tüpüne konuldu (Şekil 5). Etil alkol ile hazırlanmış 500 µl hacmindeki birinci Yıkama Tamponu kolona eklendi, sonrasında 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Sonrasında, döner kolon yeni, temiz bir PureLink™ toplama tüpüne konuldu. Etanol ile hazırlanmış 500 µl hacmindeki ikinci Yıkama Tamponu kolona eklendi ve 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Döndürme kolonu steril 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpü içine konuldu. Sonrasında, kolona yaklaşık 100 µl PureLink™ Genomik Yıkama Tamponu ilave edildi. Bu işlem daha fazla miktarda DNA elde etmek amacıyla bir kez daha tekrar edildi. Son olarak, oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon gerçekleştirildi ve sonrasında 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüjlendi. Böylece saflaştırılmış genomik DNA elde edildi. Elde edilen saflaştırılmış DNA PCR işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmek üzere dondurucuya kaldırıldı.



Şekil 3. DNA izolasyonunda kullanılan ultrasantrifüj cihazı



Şekil 4. DNA izolasyon kitinde bulunan tampon çözeltiler



Şekil 5. DNA izolasyon kitinde bulunan kolon ve tüpler

İzole edilen DNA'ların miktar ve kalitesi NanoDrop spektrofotometre kullanılarak kantitatif olarak ölçüldü.

Tablo 1. İzole edilen DNA'ların NanoDrop spektrofotometre değerleri

Örnek Numarası	Tür	Miktar (ng/μl)	A260/A280	A260/A230	A260	A280
1	<i>Ursus arctos</i>	7,8	1,58	1,55	0,16	0,10
2	<i>Canis aureus</i>	18,5	1,57	0,60	0,37	0,24
4	<i>Martes foina</i>	4,1	1,69	2,67	0,008	0,05

2.2.2 PCR ile DNA amplifikasyonu

Çalışmaların ikinci aşamasında, sitokrom oksidaz *c* alt ünite I geni (*COI*) polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Folmer ve ark. (1994) tarafından metazoolar için geliştirilen LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') ve HC02198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') ileri ve geri primerleri PCR reaksiyonunda *COI* gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanıldı. Toplam hacim 46 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR'da kullanılan bileşenler, hacimleri ve özellikleri şu şekildedir; 33,7 µl ddH₂O, 0,3 µl Thermo Scientific *Taq* DNA Polymerase (5 U/µL), 5 µl 10X *Taq* Buffer with (NH₄)₂SO₄ MgCl₂ (25 mM), 1 µl Thermo Scientific dNTP Mix (her biri 10 mM konsantrasyonda) 3 µl ileri primer, 3 µl geri primer. Örnek DNA'sının hacmi 4 µl olarak PCR tüplerine ilave edildi. Nihai reaksiyon karışımları Biorad PCR cihazına yerleştirildi. 95 °C'de 5 dakika olacak şekilde ayarlanan ön denatürasyonu takip eden ve toplamda 35 döngü olan reaksiyon koşulları; denatürasyon 95 °C'de 1 dakika, primer bağlanması 47 °C'de 1,5 dakika ve uzama 72 °C'de 1 dakika ve son uzama 72 °C'de 5 dakika şeklinde programlandı (Şekil 6). Primerlerin optimum bağlanma sıcaklığını tespit etmek amacıyla PCR çalışmalarına başlamadan önce gradiyent PCR yapıldı. Sonuç olarak optimum bağlanma sıcaklığının 47 °C olduğu tespit edildi (Şekil 7, Şekil 8).



Şekil 6. PCR reaksiyon koşulları



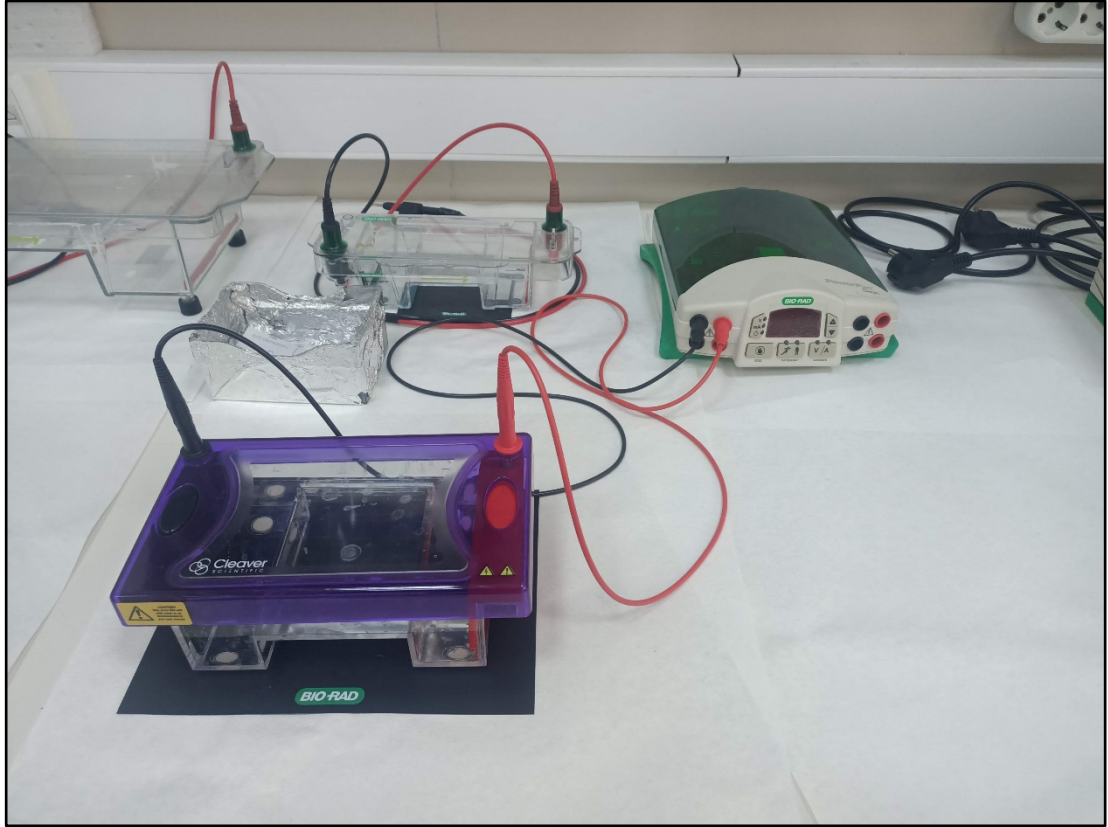
Şekil 7. Gradyent PCR için kuyucuk sıcaklıkları (A-H arası)



Şekil 8. Gradyent PCR sonuçları

2.2.3 Elektroforez çalışmaları

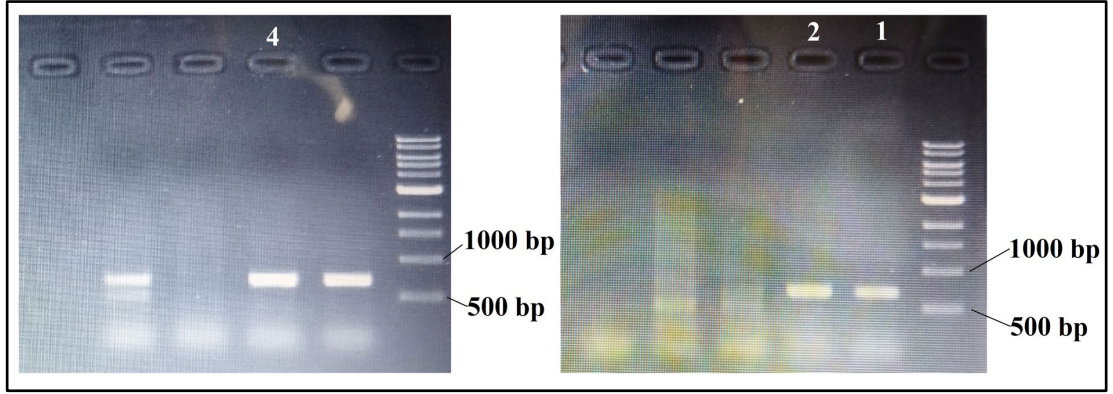
PCR aşamasından sonra *COI* gen bölgesinin uygun şekilde çoğalıp çoğalmadığı elektroforez yöntemi ile kontrol edildi. Bu işlem için öncelikle 0,50 gram agaroz 50 ml Tris-asetat-EDTA (1X TAE) içinde mikrodalgada çözdürüldü ve jel hazırlandı. Jelin biraz soğuması beklendikten sonra içine 2,5 µl görüntüleme boyası eklendi, sonrasında elektroforez tankına döküldü ve katılaşması bekledi. Jel katılaştıktan sonra, parafilm üzerinde 5 µl izleme boyası ve 5 µl PCR ile çoğaltılan DNA karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. DNA'lar 80 voltta 45 dakika elektroforez işlemi ile jel üzerinde koşturuldu (Şekil 9) ve Biorad görüntüleme sistemi (Şekil 10) ile görüntülendi. Şekil 11, Görüntüleme sistemi kullanılarak, amplifiye olmuş ürünlerinin elektroforez çalışmaları sonrası jel üzerindeki PCR bantlarını göstermektedir.



Şekil 9. Güç kaynağı ve elektroforez tankı



Şekil 10. Jel görüntüleme sistemi

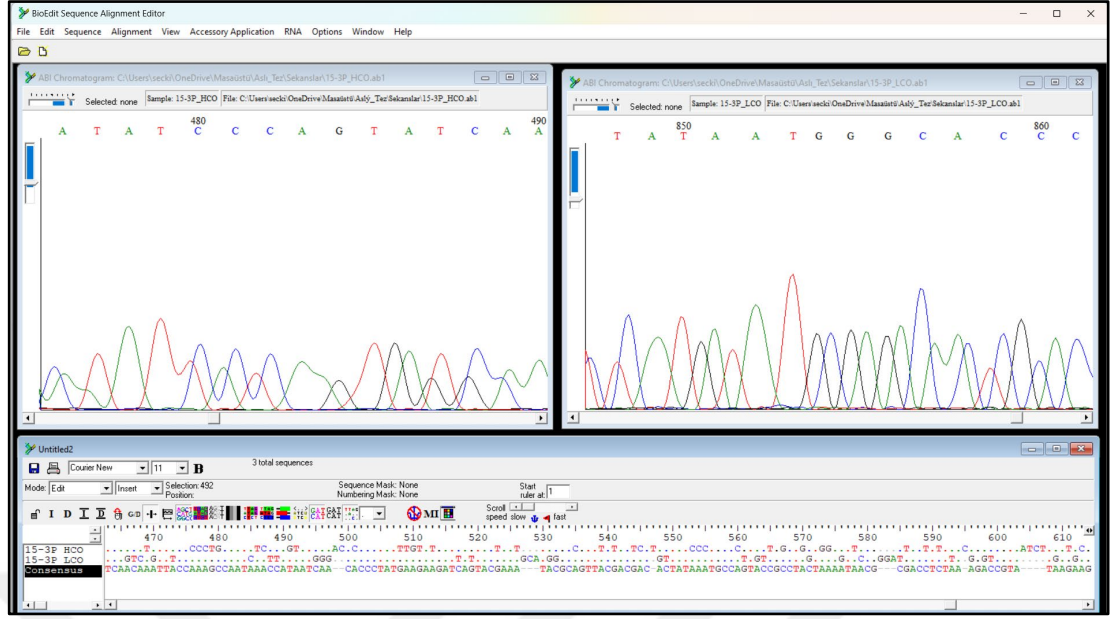


Şekil 11. PCR ile çoğaltılan *COI* gen bölgesinin jel elektroforezi

2.3 DNA dizilerinin istatistiksel analizi

DNA dizilemeden kromatogram formatında gelen *COI* gen dizileri BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999) programı kullanılarak düzenlendi. Her bir dizinin kalitesini kontrol etmek için, her bir nükleotide karşılık gelen tepe noktaları (pikler) incelendi ve düşük kaliteli DNA dizilerinin uçlarının kırılması ve forward (ileri) ve reverse (geri) primerlere ait DNA okumalarının hizalanmasının ardından bir konsensüs DNA dizisi elde edildi. (Şekil 12). Konsensüs dizileri, NCBI veritabanındaki BLAST arama aracı kullanılarak varsayılan parametreler uygulanarak tanımlandı.

Türler arasındaki evrimsel ilişkiler MEGA X (Kumar ve ark., 2018) programı ile analiz edildi. Kimura 2-parametresine (K2P) göre hesaplanan türler arasındaki genetik uzaklıklar temel alınarak Neighbour-Joining (Komşu birleştirme) filogenetik ağacı elde edildi (Kimura, 1980). Filogenetik ağacın güvenilirliği 1000 tekrarlı bootstrap (Felsenstein, 1985) istatistiği ile test edildi. Veri setindeki diziler temel alınarak DnaSP v6 (Rozas ve ark., 2017) yazılımı ile haplotip listesi oluşturuldu. Haplotiplere dayalı olarak, median-joining haplotip örgüsü Network 10.2 programı ile belirlendi (Bendelt ve ark., 1999).



Şekil 12. BioEdit programında *COI* gen bölgesinin konsensus dizisinin oluşturulması

3. BULGULAR

3.1 BLAST temelli tanımlama

Artvin'den elde edilen üç farklı karnivor memeli türü, *Ursus arctos* (bozayı, 1 numaralı örnek), *Canis aureus* (altın çakal, 2 numaralı örnek) ve *Martes foina* (kaya sansarı, 4 numaralı örnek) örneğinin mitokondriyal DNA *COI* gen bölgesinin, sırasıyla 559, 517 ve 446 nükleotid uzunluğundaki kısmi dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanındaki BLAST seçeneği kullanılarak (Basic Local Alignment Search Tool), veritabanında mevcut olan diğer türlere ait diziler ile benzerlik bakımından (PI, pairwise identity, ikili benzerlik) karşılaştırıldı. BLAST sonrası ilk 10 türle eşleşmeye ait sonuçlar Tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. Artvin'den elde edilen örneklerle ait ilk 10 sıradaki BLAST eşleşmeleri

Örnek No	Benzerlik Gösterdiği Tür	PI (%)	GenBank Erişim Numarası
1	<i>U. arctos</i>	100	MG066702.1
1	<i>U. arctos</i>	100	GQ901981.1
1	<i>U. arctos</i>	99,82	OK512908.1
1	<i>U. arctos</i>	99,82	OK512887.1
1	<i>U. arctos</i>	99,11	OQ318969.1
1	<i>U. arctos</i>	99,11	OQ318968.1
1	<i>U. arctos</i>	99,11	OQ318967.1
1	<i>U. arctos</i>	99,11	OM732477.1
1	<i>U. arctos</i>	99,11	OM732476.1
1	<i>U. arctos</i>	99,11	OM732474.1
2	<i>C. aureus</i>	100	KX156584.1
2	<i>C. aureus</i>	100	NC_067757.1
2	<i>C. aureus</i>	99,81	KX156586.1

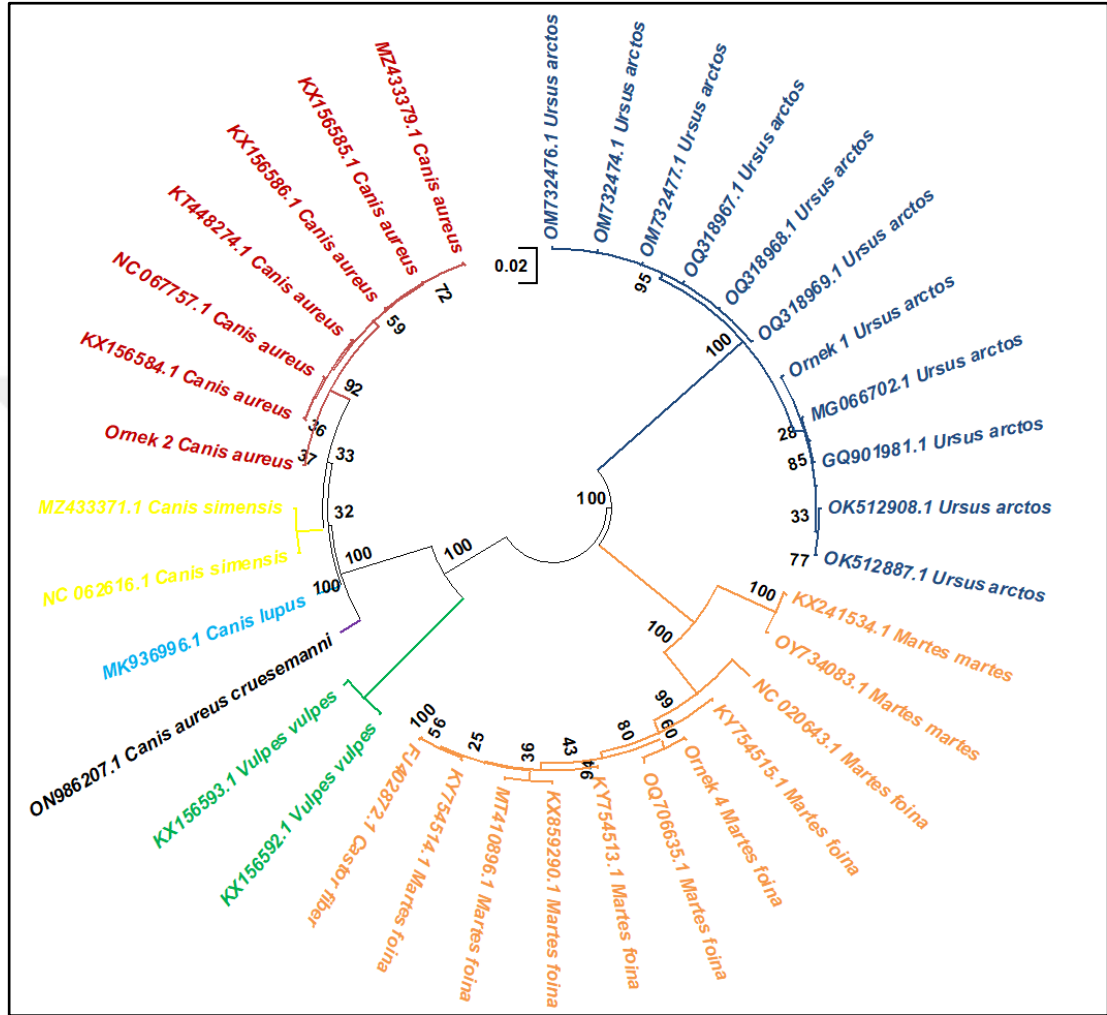
Tablo 2. Artvin’den elde edilen örneklere ait ilk 10 sıradaki BLAST eşleşmeleri (devamı)

Örnek No	Benzerlik Gösterdiği Tür	PI (%)	GenBank Erişim Numarası
2	<i>C. aureus</i>	99,81	KX156585.1
2	<i>C. aureus</i>	99,81	MZ433379.1
2	<i>C. aureus</i>	99,03	KT448274.1
2	<i>C. simensis</i>	97,10	NC_062616.1
2	<i>C. simensis</i>	97,10	MZ433371.1
2	<i>C. a. cruesemanni</i>	96,91	ON986207.1
2	<i>C. lupus</i>	96,52	MK936996.1
4	<i>M. foina</i>	100	OQ706635.1
4	<i>M. foina</i>	98,88	KX859290.1
4	<i>M. foina</i>	98,88	MT410896.1
4	<i>M. foina</i>	98,65	KY754515.1
4	<i>M. foina</i>	98,65	KY754513.1
4	<i>M. foina</i>	98,43	KY754514.1
4	<i>Castor fiber</i>	98,64	FJ402872.1
4	<i>M. foina</i>	97,31	NC_020643.1
4	<i>M. martes</i>	92,60	KX241534.1
4	<i>M. martes</i>	92,38	OY734083.1

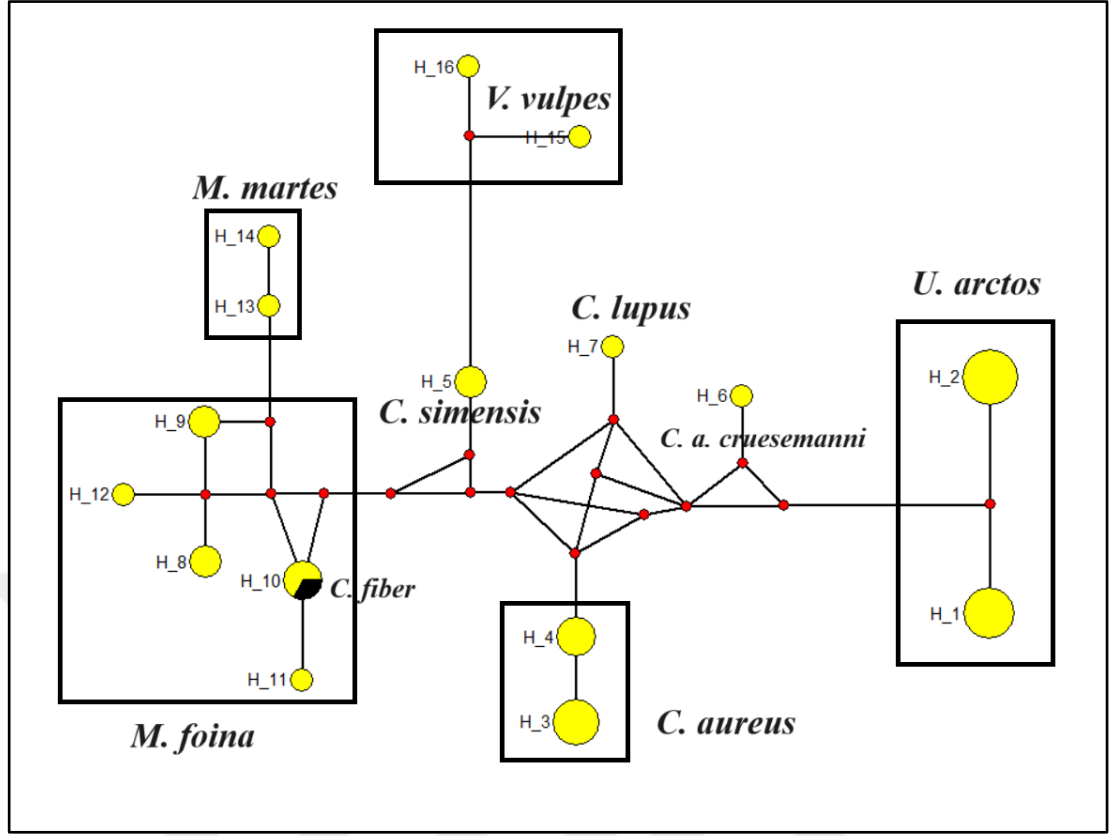
3.2 Filogeni temelli tanımlama

Örnek 1, Örnek 2 ve Örnek 4 ile NCBI’den (GenBank) indirilen diğer karnivor türlerine ait *COI* gen dizileri, Kimura 2 Parametresine göre mesafe temelli bir filogenetik ağaç çizim yöntemi olan Neighbour-Joining (komşu birleştirme) yöntemi ile analiz edildi. Buna göre elde edilen filogenetik ağaçta Örnek 1 (*U. arctos*), Örnek 2 (*C. aureus*) ve Örnek 4 (*M. foina*) doğru bir şekilde aynı türlerin yer aldığı kümelerin içine yerleşti. Filogenetik ağaçta başlıca iki klad meydana geldi. Filogenetik ağacın bazalında yer alan birinci kladda diğer *Canis* türleri ile *C. aureus* ve *V. vulpes* yer aldı. İkinci kladda ise Örnek 4’ün de beraber kümelendiği *Martes* türleri ile *U. arctos* yer

aldı (Şekil 13). Türler arasındaki evrimsel ilişkilerin filogenetik ağacın dallanma biçimine uygun olduğu, haplotip örgüsü ile desteklendi (Şekil 14). Tablo 3 haplotip listesini göstermektedir.



Şekil 13. K2P mesafesi temel alınarak elde edilen Neighbour-Joining ağacı



Şekil 14. Türler arasındaki evrimsel ilişkileri gösteren haplotip örgüsü

Tablo 3. *COI* gen dizilimine göre haplotip listesi

Haplotip Numarası	Haplotip Frekansı	GenBank Erişim Numarası	Tür
1	5	Örnek 1, MG066702.1, GQ901981.1, OK512908.1, OK512887.1	<i>U. arctos</i>
2	6	OQ318969.1, OQ318968.1, OQ318967.1, OM732477.1, OM732476.1, OM732474.1	<i>U. arctos</i>
3	4	Örnek 2, KX156584.1, NC_067757.1, KT448274.1	<i>C. aureus</i>
4	3	KX156586.1, KX156585.1, MZ433379.1	<i>C. aureus</i>
5	2	NC_062616.1, MZ433371.1	<i>C. simensis</i>
6	1	ON986207.1	<i>C. a. cruesemanni</i>
7	1	MK936996.1	<i>C. lupus</i>
8	2	Örnek 4, OQ706635.1	<i>M. foina</i>
9	2	KX859290.1, MT410896.1	<i>M. foina</i>
10	3	KY754515.1, KY754513.1, FJ402872.1	<i>M. foina</i> ve <i>C. fiber</i>
11	1	KY754514.1	<i>M. foina</i>
12	1	NC_020643.1	<i>M. foina</i>
13	1	KX241534.1	<i>M. martes</i>
14	1	OY734083.1	<i>M. martes</i>
15	1	KX156592.1	<i>V. vulpes</i>
16	1	KX156593.1	<i>V. vulpes</i>

Bunun yanı sıra, Kimura 2 parametresi temel alınarak türler arasında hesaplanan genetik uzaklık değerleri, filogenetik analiz ile elde edilen Neighbour-Joining ağacının dallanma biçimini iyi şekilde destekledi. Buna göre *U. arctos*'un *C. aureus* ve *M. foina*'ya olan genetik uzaklıkları sırasıyla % 23,9 ve % 22,9 iken, *C. aureus* ile *M. foina* arasındaki genetik uzaklık değeri % 24,5'ti. Yakın akraba iki tür olan *C. aureus* ve *C. lupus* arasındaki genetik uzaklık ise %3,2'ydi (Tablo 4).

U. arctos'un *COI* gen diziliminin nükleotid frekansları A, C, G ve T için sırasıyla %23,1, %25,9, %20 ve %30,9 iken, bu değerler *C. aureus*'ta sırasıyla % 25, % 25,7, % 17,4 ve % 31,9 ve *M. foina*'da ise % 26,5, % 25,8, % 19,1 ve % 28,7'ydi.

Tablo 4. *COI* gen dizilimine göre türler arasındaki K2P mesafesine göre hesaplanan genetik uzaklıklar ve standart hata değerleri

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>U. arctos</i>		0,023	0,023	0,023	0,023	0,024	0,024	0,024
2. <i>C. aureus</i>	0,239		0,007	0,007	0,007	0,024	0,022	0,017
3. <i>C. simensis</i>	0,238	0,028		0,008	0,007	0,023	0,022	0,016
4. <i>C. a. crusemanni</i>	0,228	0,027	0,035		0,007	0,024	0,022	0,017
5. <i>C. lupus</i>	0,233	0,032	0,031	0,031		0,023	0,022	0,016
6. <i>M. foinea</i>	0,229	0,245	0,231	0,242	0,240		0,012	0,024
7. <i>M. martes</i>	0,229	0,223	0,217	0,222	0,227	0,084		0,024
8. <i>V. vulpes</i>	0,244	0,154	0,145	0,158	0,150	0,240	0,237	

4. TARTIŞMA

Günümüzden yaklaşık 20 yıl önce yapılan çalışmalarda hayvan mitokondriyal DNA'sının 1545 nükleotid uzunluğundaki sitokrom oksidaz *c* alt ünite I (*COI*) gen diziliminin yaklaşık 648 nükleotid uzunluğundaki bir bölgesinin türler arasında yüksek oranda değişkenlik gösterdiği, tür içinde ise benzer olduğu ve bu nedenle tür tanımlamalarında taksonomistlere çalışmalarında kolaylık sağlayabilecek bir barkod gen olduğu ileri sürülmüştür. Bunu müteakip olarak “The Barcode of Life Data System” (BOLD, Yaşam Barkodu Veri Sistemi) adında bir veritabanı geliştirilmiştir. Bu veritabanı, farklı canlı gruplarından elde edilen DNA barkod verilerinin bir arada toplanmasını ve kamu tarafından kolaylıkla erişilip kullanılmasını destekleyen çevrimiçi bir veritabanıdır (URL-1). Bugün (6 Şubat 2024) itibarı ile bu veritabanında 3909 memeli türüne ait barkod gen dizilimi bulunmaktadır ve bunlardan 212'si de karnivor memeli türlerine aittir.

Ülkemizde karnivor memeli hayvanlar üzerine mitokondriyal DNA temelli çok sayıda çalışma mevcuttur (İbiş ve ark. 2014, İbiş ve ark. 2015, Aksöyek ve ark. 2017, Telcioğlu ve ark. 2019, Sosale ve ark. 2023). Bu çalışmalarda kıvrıl tilki (*V. vulpes*) ve altın çakalın (*C. aureus*) mitokondriyal DNA'sında bulunan sitokrom *b* ve kontrol bölgesi dizilerine ilaveten, tüm genom dizilimleri de kullanılarak bu türlerin taksonomileri, filogenileri ve genetik çeşitlilik seviyeleri araştırılmıştır. Bunlara ilaveten, Aksöyek ve ark. (2017) Canide familyasındaki üç tür üzerine (*C. aureus*, *C. lupus* ve *V. vulpes*) DNA barkodlama çalışması yapmışlardır. Yapılan çalışmanın sonucunda her üç türün de benzersiz barkod dizilerine sahip olduğu ve bu barkod dizilerin hiçbirinin türler arasında paylaşılmadığını ortaya koymuşlardır. Bu tez çalışmasına konu olan türler, Aksöyek ve ark. (2017)'nin sonuçları ile uyumlu bir şekilde tür içinde benzerlik göstermişler, ancak, filogenetik analizler sonucunda diğer türler ile yüksek seviyede genetik farklılık göstermişlerdir. Buna göre *U. arctos*'un *C. aureus* ve *M. foina*'ya olan genetik uzaklıkları sırasıyla % 23,9 ve % 22,9 iken, *C. aureus* ile *M. foina* arasındaki genetik uzaklık değeri % 24,5'tir. Yakın akraba iki tür olan *C. aureus* ve *C. lupus* arasındaki genetik uzaklık ise %3,2'dir. Aksöyek ve ark. (2017), elde ettikleri genetik mesafe değerlerinin bazı memeli grupları arasında

bulunan ortalama farklılıklara denk geldiğini ifade ederek, türler içindeki ve türler arasındaki ortalama dizi farklılıklarını %0,61 ve %12,32 olarak hesaplamışlardır. Bu tez çalışmasında hesaplanan genetik mesafe değerleri bu çalışmanın ortaya koyduğu sonuçlarla yaklaşık değerlere sahiptir.

Filogenetik analizler ve haplotip örgüsü analizleri bu tez kapsamında çalışılan üç türün barkod bölgelerinin diğer türlerden kolaylıkla ayrılabilmesini sağladığını ve taksonomik açıdan yapılacak çalışmalara, *COI* gen dizilimin kendine özgü karakteristiğinden dolayı, yani DNA barkodu olarak kullanılabilir olduğundan dolayı yardımcı olabileceğini göstermiştir (Hebert ve ark. 2003a, Hebert ve ark. 2003a 2003b). NCBI üzerinden yapılan BLAST sorgulaması bu sonuçları desteklemektedir. Her üç tür için yapılan sorgulamada, *U. arctos*, *C. aureus* ve *M. foinea*'ya ait *COI* gen dizilimleri, ilk sıralarda yüksek oranda (%100) aynı türler ile eşleşmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Türkiye’de yaşayan bazı karnivor memeli türlerinin DNA barkod bölgesi olarak bilinen *COI* gen diziliminin elde edilmesiyle öncelikli olarak bu türlerin, bu belirteç kullanılarak birbirlerinden yüksek yüzde ile doğru bir şekilde ayrılabilceği söylenebilir. Bu bakımdan, DNA barkodlarının memeliler üzerine yapılan taksonomik çalışmalara kolaylık sağlaması açısından fayda sağlayacak bir moleküler belirteç olduğu da düşünülebilir. Bunun yanı sıra, bu çalışma ile elde edilen mitokondriyal DNA *COI* gen dizilimleri, biyolojik çeşitlilik ve koruma biyolojisine yönelik gelecek yıllarda yapılacak çalışmalar için önemli veriler olarak kullanılabilir. Böylece tür seviyesinde sağlanan bu genetik bilgiler Türkiye biyolojik çeşitliliğinin ortaya konması açısından da ayrıca önemlidir. Bu çalışmaya konu olan türlerin hem mitogenom hem de nükleer genom bölgelerine ilişkin ilave genetik bilgilerin elde edilmesi ile, bu türlerin filogenileri ve taksonomik durumları ile ülkemiz biyolojik çeşitliliğinin daha iyi bir şekilde anlaşılabilceği şüphesizdir.

KAYNAKLAR

- Avice, J.C., 2001. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts, 447 s.
- Bendelt, H., Froster, P. ve Rohl, A., 1999. Median joining network for inferring intraspecific phylogenies, *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37– 48.
- Cai, Y.S., Zhang, L., Shen, F.J., Zhang, W.P., Hou, R., Yue, B.S., Li, J., Zhang ve Z.H., 2011. DNA barcoding of 18 species of Bovidae, *Chinese Science Bulletin*, 56:1–5.
- Can, Ö.E., 2004. Status, conservation and management of large carnivores in Turkey, Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats, 24th Meeting, Council of Europe, Strasbourg, s. 28.
- Clare, E.L., Lim, B.K., Engstrom, M.D., Eger, J.L. ve Hebert, P.D.N., 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana, *Molecular Ecology Notes*, 7:184–190.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution*, 39: 783-791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. ve Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 3:294–299.
- Hall, T.A., 1999. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S. ve deWaard, J.R., 2003a. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proceedings: Biological Sciences*, 270 Suppl 1(Suppl 1): S96-9.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. ve deWaard, J.R., 2003b. Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings: Biological Sciences*, 270 (1512): 313-21.
- İbiş, O., Tez, C. ve Özcan, S., 2014. Phylogenetic Status of the Turkish red fox (*Vulpes vulpes*) based on partial sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene, *Vertebrate Zoology*, 64 (2): 273-284
- İbiş, O., Aksöyek, E., Özcan, S. ve Tez, C., 2015. A preliminary phylogenetic analysis of golden jackals (*Canis aureus*) (Canidae: Carnivora: Mammalia) from Turkey based mitochondrial D-loop sequences, *Vertebrate Zoology*, 65 (3): 391-397.

- Kankılıç, T., Şeker, P.S., Erdik, A.C., Kankılıç, T., Selvi, E., Yiğit, N. ve Çolak, E., 2018. Determination of genetic variations in the genus *Dryomys* Thomas, 1906. (Rodentia: Gliridae) distributed in Turkey using NADH dehydrogenase 1 (*ND1*) gene, *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Sequence Analysis*, 29 (6): 933-942.
- Kerr, K.C.R., Stoeckle, M.Y., Dove, C.J., Weight, L.A., Francis, C.M. ve Hebert, P.D.N., 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds, *Molecular Ecology Notes*, 7: 535–543.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. ve Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetic analysis accross computing platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549
- Lara, A., de León, J.L.P., Rodríguez, R., Casane, D., Côté, G., Bernatchez, L. Ve García-Machado, E., 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts, *Molecular Ecology Resources*, 10: 421–430.
- Lorenz, J.G., Jackson, W.E., Beck, J.C. ve Hanner, R., 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 360: 1869–1878.
- Maturana, C.S., Moreno, R.A., Labra, F.A., González-Wevar, C.A., Rozbaczylo, N., Carrasco, F.D. ve Poulin, E., 2011. DNA barcoding of marine polychaetes species of southern Patagonian fjords, *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 46: 35–42.
- Mutanen, M., Kekkonen, M., Prosser, S.W.J., Hebert, P.D.N. ve Kaila, L., 2015. One species in eight: DNA barcodes from type specimens resolve a taxonomic quagmire, *Molecular Ecology Resources*, 15: 967–984.
- Olgun Karacan, G., Çolak, R. ve Çolak, E., 2021. The roles of possible geographic barriers and geological events on the phylogeographic structure of the eastern broad toothed field mouse (*Apodemus mystacinus*), *Mammalia*, 85: 401- 411.
- Pakendorf, B. ve Stoneking M., 2005. Mitochondrial DNA and human evolution, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6: 165-83.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., ve Sánchez-Gracia, A., 2017. DnaSP v6: DNA sequence

polymorphism analysis of large datasets, *Molecular Biology and Evolution*, 34: 3299-3302.

Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K. ve Lane, R., 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 360 (1462):1805-11.

Sosale, M.S., Songsasen, N., İbiş, O., Edwards, C.W., Figueiró, H.V. ve Koepfli, K.P., The complete mitochondrial genome and phylogenetic characterization of two putative subspecies of golden jackal (*Canis aureus cruesemanni* and *Canis aureus moreotica*), *Gene*, 866:147303. Erratum in: *Gene*, 2023, 877: 147536.

Şeker, P.S., 2024. The complete mitochondrial genome of *Erinaceus concolor* (Mammalia: Eulipotyphla) from Türkiye with phylogenetic implications. *Zoologischer Anzeiger*, 308:119-130.

Taanman, J.W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication., *Biochimica Biophysica Acta*, 1410 (2):103-23.

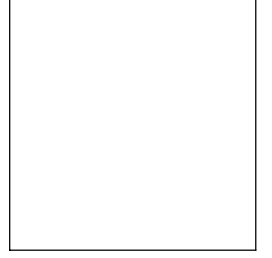
Telcioğlu, M., İbiş, O., Aksöyek, E., Özcan, S., Moradi, M., Gürkan, Ö.F. ve Tez, C., 2019. Genetic analysis of Iranian and Turkish red foxes (*Vulpes vulpes*) based on mitochondrial DNA (D-loop) sequences. *Ethology Ecology & Evolution*, 31 (6): 568-582.

URL-1., <http://www.boldsystems.org/index.php>, (Erişim Tarihi: 06.02.2024)

URL-2., <https://www.msm.ist/main/>, (Erişim Tarihi: 06.02.2024)

Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. ve Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 360: 1847–1857.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Aslı YILDIRIM ÖZKURT
Uyruğu :
Doğum tarihi ve yeri :
Medeni hali :
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon :
e-posta :

Eğitim

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Birimi</u>	<u>Mezuniyet Tarihi</u>
Lisans	Mardin Artuklu Üniversitesi Hemşirelik Bölümü	16.06.2009
Lise	Dadaloğlu Lisesi	2004