

BOZKIR AĞAÇ SINCABININ (*Sciurus anomalus*) DİĞER SCIURUS TÜRLERİ ARASINDAKİ FİLOGENETİK AKRABALIĞININ BELİRLENMESİ

Emine ARSLAN *
Elif Gülbahçe MUTLU **
Atilla ARSLAN***

Öz

Kemiriciler (*Rodentia*) dünyadaki mevcut memeliler arasında en büyük grubu oluşturmaktadırlar ve kendi aralarında taksonomik ve filogenetik sınıflandırılması oldukça önemlidir. *Sciurus* cinsi, *Rodentia* takımı içerisinde yer alan *Sciuridae* (Sincapgiller) familyasının üyelerindedir. Türkiye'de *Sciurus anomalus* ve *Sciurus vulgaris* türleri yayılış göstermektedir. Bu çalışmada Konya ili Bozkır ilçesinden elde edilen *S. anomalus* türü ile Gen Bankası (NCBI)'ndan elde edilen *Sciurus* türleri arasında filogenetik akrabalıkların mitokondrial sitokrom *b* gen dizileri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bozkır sincabının postundan DNA izole edilmiş ve sitokrom *b* geni PCR'da spesifik primerler ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi yapılmıştır. Daha sonra, diziler ile MEGA 5.2.0 bilgisayar programı kullanılarak maksimum parsimoniye göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Elde edilen filogenetik ağaca göre, Bozkır *S. anomalus*'u daha önce çalışılan Anadolu ağaç sincapları ile aynı grupta yer alırken, Türkiye'de yaşayan *S. vulgaris*'den ziyade diğer ülkelerde yayılış gösteren sincap türlerine daha yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar, daha önce rapor edilen Türkiye'deki sincapları da içeren bir filogenetik çalışmanın sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler

Bozkır, *Sciurus anomalus*, sitokrom *b*, Filogenetik akrabalık

* Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya. earslan@selcuk.edu.tr

** KTO Karatay Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya.

*** Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya.



GİRİŞ

Sciuridae (Sincapgiller) küçük ve orta büyüklükteki sincapların bulunduğu geniş bir familyadır. Familya içinde ağaç sincapları, yer sincapları, çizgili sincaplar, uçan sincaplar, marmotlar ve çayır köpekleri bulunmaktadır. Bu familyanın günümüzde yaşayan beş alt familyası, 58 cins ve dünyanın hemen hemen her tarafına yayılmış 285 türü bulunmaktadır (Emry ve Korth 2007). Sincaplar ilk defa 40 milyon yıl önce ortaya çıkmışlardır. *Sciurus* (Ağaç Sincapları) cinsine ait yedi altcins ve 28 tür vardır. *Sciurus vulgaris* (Kırmızı sincap) *Sciurus* altcinsine ait 13 sincap türünden biridir. *Sciurus anomalus* (Kafkas sincabı) ise *Tenes* altcinsine ait tek türdür (Hoffman ve ark., 1993).

Ağaç ve yer sincapları, boyut ve morfolojik olarak birbirlerinden farklılıklar gösterirler (Yalçın ve ark., 2007, Roth, 1996). Türkiye’de *Sciurus* türünden Anadolu Ağaç Sincabı (*S. anomalus*) ve Kıızıl Sincap (*S. vulgaris*) olmak üzere iki tür sincabın yaşadığı bilinmektedir. Anadolu Ağaç Sincabı’nın (*S. anomalus*) sırtı kırmızı veya esmerimsi kır, karnı solgun donuk renkli, kulakları seyrek kıllı ve sivridir. Uçlarında kıl tutamı yoktur (Evcin ve ark., 2012, Tolunay ve Tunçok, 1938). Ayrıca kıızıl sincap kıızıl renkte iken bu türün sırt bölümünde belirgin bir gri-açık siyah renkte bir koyuluk mevcuttur. Bu yönleriyle kıızıl sincaptan (*S. vulgaris*) görünüş itibariyle ayırt edilebilmektedir (Evcin ve ark., 2012).

Sincaplar bazı meyvelere verdikleri zarar ile hemen her yerde tanınan hayvanlardandır. Bunlar kozalak, badem, ceviz ve fındık gibi meyveleri depo ederler. Böylece bazı bitkilerin yeni bölgelerde tutunmasına veya yayılmasına sebep olurlar. Diğer yandan kurak geçen dönemlerde çam, ladin, göknar, kayın gibi ağaçların gövdelerini kemirmek suretiyle büyük zarar verirler. Ekili ve dikili alanlarda tohum veya fideleri tahrip ederler (Alkan,1965). Geçmişte baş gösteren kürk giyme modası, sincap postlarının da kürk olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. Bu sebeple avlanan sincaplar ekosistemdeki av ve avcı ilişkisinin bozulmasına sebep olmuştur. Sincap popülasyonlarının da bir denge içinde kalması ve korunmasının, biyolojik zenginlik, zoocoğrafya ve evrimsel bakımından önemi vardır (Alkan,1965).

Nükleer ve mitokondrial dizilerin evrim çalışmalarında kullanılmaktadır (Robinson ve ark., 1997). Pek çok hayvan türlerinin evrimsel akrabalıkları ve popülasyon

yapılarının açığa çıkarılması çalışmalarında ribozomal DNA ve mitokondrial DNA moleküler genetik markırları olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Allard ve Honeycutt, 1991; Wall ve ark., 1992; Hosoda ve ark., 1993; Nevo ve ark., 1993; Suzuki ve ark., 1994;). Hem nüklear hem de sitoplazmik markırların birleşmiş analizleri, belirli bir hayvan türünün popülasyonlarının filogenetik ağacının topolojisi üzerine ve ayrılma yerini ölçmek üzere güvenilir bilgi sağlayabilmektedir (Suzuki ve ark., 1996).

Bu çalışmada Konya'nın Bozkır ilçesinden elde edilen *S. anomalus* türünün diğer *Sciurus* türleri ile filogenetik ilişkisinin sitokrom b tek gen analiziyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Ağaç sincaplarının filogenisi ile ilgili Dünya'da sınırlı sayıda çalışma bulunurken Türkiye'de yok denecek kadar azdır.

MATERYAL-METOT

Materyal

Bu çalışmada Konya ili Bozkır ilçesinden elde edilen sincap örneği incelenmiştir. Doğadan yakalanan canlı hayvanın kulak ucundan DNA izolasyonu için doku örneği alınmıştır ve tekrar doğaya bırakılmıştır.

Dokudan Genomik DNA izolasyonu

Dokudan DNA izolasyonu Hillis ve ark.'nın (1990) önerdiği metoda göre yapılmıştır. 0.1 gr doku örneği havanda sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilmiştir. İçerisinde STE tamponu bulunan ependorf tüplere toz haline getirilen doku örnekleri ilave edilmiştir. Daha sonra fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) ile saflaştırma basamakları gerçekleştirilmiştir ve elde edilen DNA TE tamponunda çözülmüştür. PZR işlemleri gerçekleştirmek üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Agaroz jel elektroforezi

Bu gen bölgesinin çoğaltımı için L14727_sp, H 15348 ve L15162MO, H15915 olmak üzere 2 çift primer kullanılmıştır. Tasarlanan primer çiftlerinin en iyi çalışabilecekleri sıcaklığın ve reaksiyon koşullarının belirlenmesi için öncelikle gradient PZR yapılmıştır.

PZR uygulamaları için 15 µl çözelti hazırlanmıştır. Her reaksiyon karışımı için, 50 pikomol primer, 10X PZR tamponu (200 mM (NH₄)₂SO₄, 750 mM Tris-HCl, pH:8.8,

%0.1 Tween20), 25 mM MgCl, 20 mM dNTP ve 5U Taq polimeraz kullanılmıştır. Genomik DNA'dan 50 ng karışıma eklenmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra thermocycler cihazı ile çoğaltım 35 döngüde ve 95 °C'de 5 dk, 94 °C'de 1 dk, 50 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 1 dk'da yapılmıştır.

PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek hedef gen bölgesinin çoğaltıldığı marker ile belirlenmiş ve jel görüntüleme sistemi ile fotoğraflar bilgisayara aktarılmıştır.

Dizi Analizi

Elde edilen PZR ürünleri MacroGen Firmasına gönderilerek sitokrom b geninin DNA dizileri belirlenmiştir.

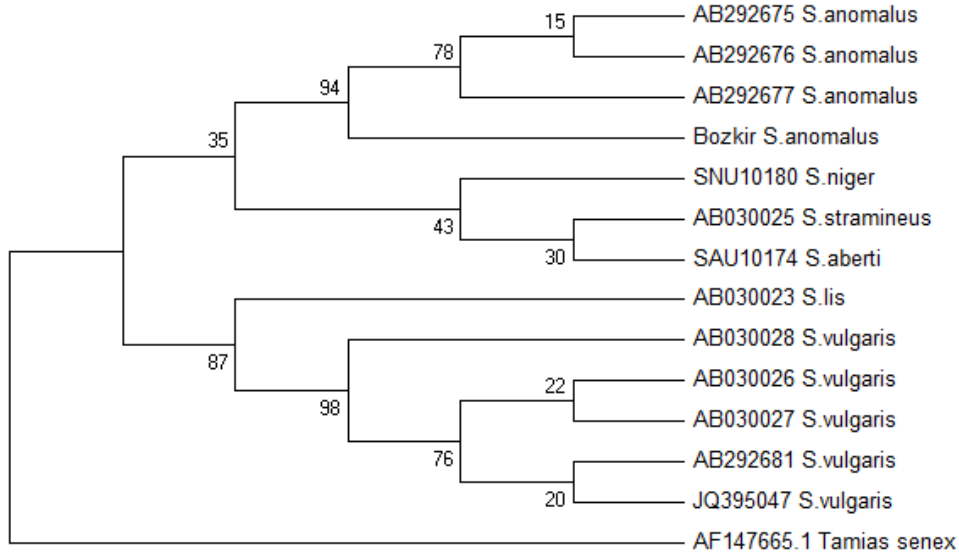
İstatistiksel Değerlendirme

Dizi analizi sonucunda elde edilen sitokrom b geninin DNA dizileri ve NCBI Gen Bankasından elde edilen verilerle birlikte Bioedit bilgisayar programında hizalanıp Mega 5.02 bilgisayar programında Maximum Likelihood'a göre filogenetik ağaç yapılmıştır.

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bozkır ilçesinden elde edilen *S. anomalus*'un sitokrom b geninin tüm dizisi (1140bp) belirlenmiş, beş *S. vulgaris*, *S. lis*, *S. aberti*, *S. stramineus*, *S. niger* ve üç *S. anomalus*'un dizileri ise daha önce NCBI'da yayınlanmış olan diziler ile birlikte değerlendirilmiştir.

Maximum Likelihood istatistik analizi sonucunda elde edilen filogenetik ağaca göre (Şekil 1) 2 ana grup oluşmuştur. Birinci grupta *S. aberti*, *S. stramineus* ve *S. niger* birbirine daha yakın olarak bir alt kladda toplanırken *S. anomalus*'lar ise diğer alt kladda yer almışlardır. İkinci ana grupta *S. vulgaris* ve *S. lis* birbirine daha yakın olarak yer almıştır. Dış grup olarak *Tamias senex* türü kullanılmıştır.



Şekil 1. *Sciurus anomalus*'un sitokrom b geninin (1140bp) maximum likelihood filogenetik ağacı .

Bizim sonuçlarımız, Pecnerova ve Martinkova (2012)'nın ve Villalobos ve Gutierrez-Espeleta (2014)'nın ağaç sincaplarının evrimi ile ilgili yaptıkları çalışmaları destekler şekilde *S. lis* ve *S. vulgaris*'in kardeş taksonlar olduğunu ve *S. anomalus*'un *S. lis* ve *S. vulgaris*'in atasının ayrılmasından sonra farklılaştığını göstermiştir. Aynı şekilde Oshida ve Arslan (2009)'nın bulguları ile uyumlu olarak Palearktık bölgedeki Eski Dünya sincaplarından olan *S. anomalus* sitokrom b tek gen analizi sonucuna göre Nearktık bölgedeki Yeni Dünya sincaplarına (*S. aberti*, *S. niger*, *S. stramineus*) daha yakın yer almıştır. Diğer Eski Dünya sincapları (*S. lis* ve *S. vulgaris*) monofiletik olup ayrı bir kladda toplanmışlardır.

Sciurus'un ilk ayrılmasının Avrasya kıtasında olmuş ve daha sonra Yeni Dünya *Sciurus*'larının atasının, Avrasya kıtasından Kuzey Amerika Kıtasına göç etmiş olabileceği önerilmiştir (Oshida ve ark 2009). Fosil kayıtları *S. vulgaris*'in *S. lis*'in atası olduğunu düşündürmüştür (Kawamura 1988, Kawamura ve ark. 1989, Oshida ve ark 2009). *S. anomalus* sitogenetik açıdan *S. carolinensis* ve *S. niger*'e *S. vulgaris*'den daha çok yakın akraba olduğu rapor edilmiştir (Nadler ve Hoffmann 1970). Bizim sonuçlarımız Oshida ve ark (2009)'nın filogenetik sonuçları gibi bu akrabalığı desteklemektedir. Fakat

S. anomalus ve diğer Yeni Dünya türleri arasında keskin filogenetik ayrılmaların olduğu bulunmuş. Bu yüzden *S. anomalus*'un eşsiz evrimsel tarihi olabileceği rapor edilmiştir (Oshida ve ark 2009).

Daha önce yapılan çalışmaların bulguları (Oshida ve ark 2009) ile uyumlu olan bu çalışmanın sonuçları; üç Eski Dünya *Sciurus* türlerinin (*S. anomalus*, *S. lis* ve *S. vulgaris*) analizinin monofiletik bir akrabalığı ortaya koymamış olması, *S. lis* ve *S. vulgaris*'in yakından ilişkili olduğu, ancak *S. anomalus*'un Yeni Dünya *Sciurus* türleri ile kümelenmesi, bu kümeleme destekleyen bootstrap değerlerinin biraz düşük olması, *S. anomalus* ve diğer Eski Dünya türleri arasındaki genetik uzaklıkların, *S. anomalus* ve Yeni Dünya türlerinin arasındakilere çok benzer olması sebebiyle (1) *S. anomalus*, (2) *S. lis* ve *S. vulgaris*, ve (3) Yeni Dünya *Sciurus* türleri olmak üzere bu cinsin mümkün olan üç büyük kladının ayrılması, *Sciurus*'un ilk evrimsel tarihini göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Alkan, B., 1965. Türkiye'nin Ağaç ve Tarla Sincapları (Mammalia-Sciuridae) Üzerine Bazı İncelemeler. Bitki Koruma Bülteni, Ankara, 5(4):151-162.
- Allard, M. W., and Honeycutt, R. L., 1991. Ribosomal DNA variation within and between species of rodents, with emphasis on the genus *Onychomys*. Mol. Biol. Evol., 8:71-84.
- Emry, R. J.; Korth, W. W. (2007). "A new genus of squirrel (Rodentia, Sciuridae) from the mid-Cenozoic of North America". Journal of Vertebrate Paleontology 27(3): 693–698. doi:10.1671/0272-4634(2007)27[693:ANGOSR]2.0.CO;2
- Evcin, Ö., Akkuzu, E., Küçük, Ö., 2012. Anadolu ağaç sincabının (*Sciurus anomalus* (Güldenstaedt, 1785) ekolojisi: Kastamonu-Araç merkez Orman İşletme şefliği örneği. DOI: 10.13140/2.1.2616.3207, Conference Paper.
- Hillis, D.M., Larson, A., Scott, K.D., Zimmer, E.A. 1990. Nucleic acids III: Sequencing. Molecular Systematics. Chp:9, 339-340.
- Hoffmann, R. S., Anderson, C. G., Thorington, R. W. Jr & Heaney, L. R. 1993. Family Sciuridae. In D. E. Wilson & D. M. Reeder (Eds) Mammal Species of the World: Taxonomic and Geographic Reference.
- Hosoda, T., Suzuki, H., Yamada, T., and Tsuchiya, K., 1993. Restriction site polymorphism in the ribosomal DNA of eight species of Canidae and Mustelidae. Cytologia 58:223-230.
- Kawamura Y. 1988: Quaternary rodent faunas in the Japanese Islands (Part 1). Mem. Fac. Sci. Kyoto Univ., Ser. Geol. Min. 53: 31–384.
- Kawamura Y., Kamei T. & Taruno H. 1989: (Middle and late Pleistocene mammalian faunas in Japan). Quat. Res. 28: 317–326 (in Japanese with English summary).
- Nadler C.F. & Hoffmann R.S. 1970: Chromosomes of some Asian and South American squirrels (Rodentia:Sciuridae). Experientia 26: 1383–1386.
- Nevo, E., Honeycutt, R.L., Yonekawa, H., Nelson, K. and Hanzawa, N., 1993. Mitochondrial DNA polymorphisms in subterranean mole-rats of the *Spalax ehrenbergi* superspecies in Israel and its peripheral isolates. Mol. Biol. Evol. 10:590-604.
- Oshida T, Arslan A and Noda M., 2009. Phylogenetic relationships among the Old World *Sciurus* squirrels. Folia Zool. – 58(1): 14–25.
- Pecnerova, Martinkova. 2012. Evolutionary history of tree squirrels (Rodentia, Sciurini) based on multilocus phylogeny reconstruction. Zoologica Scripta. 41(3), pp 211–219.
- Robinson, M., Catzeflis, F., Briolay, J., and Mouchiroud, D., 1997. Molecular phylogeny of rodents, with special emphasis on murids: evidence from nuclear gene *LCAT*. Mol. Phylogenet. Evol. 8:423–434.
- Roth, V.L., 1996. Cranial Integration in the Sciuridae Amer.Zool., 36, 14-23.
- Suzuki, H., Sakurai, S., and Matsuda, Y., 1996. Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. Cytogenet Cell Genet 72(1): 1-4.
- Suzuki, H., Tsuchiyama, K., Sakaizumi, M., Wakana, S., and Sakurai, S., 1994. Evolution of restriction sites of ribosomal DNA in natural populations of the field mouse, *Apodemus speciosus*. J. Mol. Evol. 38: 107-112.
- Tolunay, M., Tunçok, Ş., 1938. Yurdumuzda kemirici ve böcek yiyen hayvanlar (fare ve sıçan gibi zararlılarla savaş). Recep Ulusoğlu Basımevi, Ankara, 1-152.
- Villalobos, F., Gutierrez-Espeleta, G., 2014. Mesoamerican tree squirrels evolution (Rodentia: Sciuridae): a molecular phylogenetic analysis. Rev. Biol. Trop. Vol. 62 (2): 649-657.
- Wall, D. A., Davis, S. K., and Read, B. M., 1992. Phylogenetic relationships in the subfamily Bovinae (Mammalia: Artiodactyla) based on ribosomal DNA. J. Mammal. 73: 262-275.
- Yalçın, H., Kayış, S.A., Arslan, A., 2007. Ağaç, Yer Sincabı ve Ratın Mandibula'sı Üzerinde Karşılaştırmalı Makro-Anatomik, Mekanik VE Geometrik Morfometrik Çalışma. Vet. Bil. Derg. 23, 1: 83-95.

