

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLOROPLAST DNA ANALİZİ İLE *PHLOMIS* L.
(*Lamiaceae*) CİNSİNE AİT TÜRLER ARASINDAKİ
DOĞAL HİBRİDİZASYONUN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Fadime ÖZTOPRAK**

**Danışman
Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU
Doç. Dr. Mehmet Yaşar DADANDI**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2015
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLOROPLAST DNA ANALİZİ İLE *PHLOMIS* L.
(*Lamiaceae*) CİNSİNE AİT TÜRLER ARASINDAKİ
DOĞAL HİBRİDİZASYONUN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Fadime ÖZTOPRAK**

**Danışman
Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU
Doç. Dr. Mehmet Yaşar DADANDI**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FBY-11-3424 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Fadime ÖZTOPRAK

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Kloroplast DNA Analizi İle *Phlomis* L. (*Lamiaceae*) Cinsine Ait Türler Arasındaki Doğal Hibridizasyonun İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Danışman

Fadime ÖZTOPRAK

Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU danışmanlığında **Fadime ÖZTOPRAK** tarafından hazırlanan “**Kloroplast DNA Analizi ile *Phlomis L. (Lamiaceae)* Cinsine Ait Türler Arasındaki Doğal Hibridizasyonun İncelenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.

..... / /

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

Üye :.....

Üye :.....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Kâzım KEŞLİOĞLU

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocam Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU'na, kullanılan bitki materyallerini temin eden sayın hocam Doç. Dr. Mehmet Yaşar DADANDI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP'e, Uzm. Dr. Rıdvan TEMİZGÜL'e ve aynı laboratuvarı paylaştığımız çalışma arkadaşım Özge FIRAT'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FBY-11-3424) teşekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Fadime ÖZTOPRAK

Kayseri, Ağustos 2015

KLOROPLAST DNA ANALİZİ İLE *PHLOMIS* L. (*Lamiaceae*) CİNSİNE AİT TÜRLER ARASINDAKİ DOĞAL HİBRİDİZASYONUN İNCELENMESİ

Fadime ÖZTOPRAK

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2015

Tez Danışmanları: Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU
Doç. Dr. Mehmet Yaşar DADANDI

ÖZET

Bu çalışma 12 farklı *Phlomis* L. (*Lamiaceae*) melezinin moleküler yönden atalarına olan yakınlığı, genomlarındaki moleküler düzenlemelerin araştırılmasını kapsamaktadır. Araştırmada kullanılan 15 *Phlomis* türü arasındaki genetik ilişkiyi kloroplast DNA dizi analizi ile belirlemek ve türlerin kloroplast DNA'sının nükleotid dizilerine ait parmak izlerini çıkarmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada genomik DNA izolasyonu, kurumuş bitki yapraklarından Rogers ve Bendich'ten modifiye CTAB yöntemiyle, Yüzbaşıoğlu ve Dadandı'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'dan kloroplast DNA'sındaki *trnT-trnL* bölgesi A ve B primerleri kullanılarak çoğaltılıp dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizi sonucu elde edilen diziler CodonCode Aligner programında kesilip birleştirilmiş, MEGA6 programı içerisindeki MUSCLE ile hizalanmış ve filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Splitstree4 programı ile de filogenetik network analizi yapılmıştır. Moleküler verileri karşılaştırmak amacıyla örneklerin morfolojik ölçümleri yapılmış, NTYS ve Splitstree4 programlarında değerlendirilmiştir.

Phlomis örneklerinde nükleotid yüzdeleri %36,84 (A), %35,17 (T/U), %13,28 (C) ve %14,71 (G) olarak belirlenmiştir. Nükleotidlerdeki transisyon/transversiyon dönüşüm hız oranı $k1=1.581$ (pürinler) ve $k2=3.289$ (pirimidinler) olarak gözlenmiştir. Nükleotidlerdeki toplam transisyon/transversiyon eğilimi ise $R=0,958$ olarak bulunmuştur

MEGA6 programında yapılan maximum likelihood, maximum parsimony, neighbour-joining ve UPGMA analizleri sonucunda *Phlomis* cinsi türleri dış gruptan ayrılmış ve üç altseksiyona kısmen uygun şekilde gruplanmıştır. Sonuçlar filogenetik network ve morfolojik veri sonuçları ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Phlomis*, *Lamiaceae*, cpDNA, *trnT-trnL*, melezleşme

**CHLOROPLAST DNA ANALYSIS OF NATURAL HYBRIDISATION
BETWEEN THE SPECIES OF THE GENUS *PHLOMIS* L. (*Lamiaceae*)**

Fadime ÖZTOPRAK

Erciyes University, Institute of Science

MSc. Thesis, August 2015

**Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU,
Assoc. Prof. Dr. Mehmet Yaşar DADANDI**

ABSTRACT

This study has been done to determine molecular proximity of 12 *Phlomis* hybrids to their ancestors, to analyze the molecular regulations at their genome and genetic relation between 15 *Phlomis* species by cpDNA sequence analysis and to find out the species' chloroplast DNA nucleotide sequences' fingerprints. In this study, genomic DNA has been extracted from dry leaves with a modified method of Rogers and Bendich as described in Yüzbaşıoğlu and Dadandı. *trnT-trnL* region of chloroplast DNA was amplified using the primer couple A and B, then PCR products sent for bidirectional sequence analysis. The ends of the sequences of *trnT-trnL* region were cut and combined by CodonCode Aligner. The data was aligned by MUSCLE under the MEGA6 and phylogenetic trees were established. Splitstree4 was used for phylogenetic network analysis of the data. The phylogenetic trees obtained from the molecular data were compared with the phylogenetic trees obtained from the morphological data.

Percentage of nucleotide composition at *Phlomis* species was determined as 36,84% (A), 35,17% (T/U), 13,28% (C) and 14,71% (G). Transisyon/transversion conversion rate ratio was found as $k_1=1.581$ (purine) and $k_2=3.289$ (pyrimidine).

Maximum likelihood, maximum parsimony, neighbour-joining and UPGMA analyses were carried out by MEGA6, the *Phlomis* species were separated from the outgroup and were partially divided into three subsection. The results obtained from the phylogenetic analysis were generally in agreement with the results of the morphological and phylogenetic network analyses.

Key Words: *Phlomis*, *Lamiaceae*, cpDNA, *trnT-trnL*, hybridisation

İÇİNDEKİLER

KLOROPLAST DNA ANALİZİ İLE *PHLOMIS* L. (*Lamiaceae*) CİNSİNE AİT TÜRLER ARASINDAKİ DOĞAL HİBRİDİZASYONUN İNCELENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

1.1. <i>Lamiaceae</i> Familyasının Morfolojik Özellikleri.....	5
1.2. <i>Phlomis</i> L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri	5
1.2.1. <i>Phlomis</i> L. Cinsinin Sistematikteki Yeri	6
1.2.2. <i>Phlomis</i> L. Cinsi ve Dünya Üzerindeki Yayılışı	6
1.2.3. <i>Phlomis</i> L. Cinsi Üzerine Yapılan Çalışmalar	7
1.2.4. <i>Phlomis</i> L. Cinsinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi	9
1.3. Melezler ve Melezleşme.....	9
1.4. Moleküler Sistematik	12

1.5. Moleküler Sistematiğe Kullanılan Markırlar	12
1.5.1. Morfolojik Markırlar	12
1.5.2. Biyokimyasal Markırlar	13
1.5.3. Moleküler Markırlar	13
1.5.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) - Restriksiyon	
Parça Uzunluk Polimorfizmi	14
1.5.3.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – Çoğaltılmış	
Parça Uzunluk Polimorfizmi	15
1.5.3.3. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA(s)) – Rastgele	
Çoğaltılmış Polimorfik DNA	15
1.5.3.4. SSR (Single Sequence Repeats) – Mikrosatellitler (Basit Dizi	
Tekrarları)	16
1.5.3.5. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – Basit Dizi Tekrarları Arası	16
1.5.3.6. SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) – DNA Dizisi	
Belirlenerek Çoğaltılmış Polimorfik Bölgeler	17
1.5.3.7. ITS (Internal Transcribed Spacer) - İçsel Transkribe Edilen Bölge..	17
1.5.3.8. Kloroplast DNA (cpDNA)	17
1.6. DNA Dizileme	20
1.6.1. Otomatik DNA Dizi Analizi	21
1.6.2. Çoklu Dizi Hizalama ve MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by	
Log-Expectation – Logaritmik Olasılık Ortalaması ile Çoklu Dizi	
Karşılaştırması	21
1.7. Filogenetik Analiz	22
1.7.1. Filogenetik Ağaç	23
1.7.1.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler	25
1.8. Filogenetik Network (Ağ).....	25

2. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal	28
2.1.1. Bitki Materyali	28
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	30
2.1.2.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	30
2.1.2.2. PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	31
2.1.2.3. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	31
2.1.3. Primerler	32
2.2. Metot	32
2.2.1. Morfolojik İncelemeler	33
2.2.2. Moleküler İncelemeler	34
2.2.2.1. DNA İzolasyonu	34
2.2.2.2. Primer Seçimi	35
2.2.2.3. Kloroplast DNA'sının <i>trnT-trnL</i> Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	35
2.2.2.4. PCR Ürünlerinin Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	36
2.2.2.5. Kloroplast DNA'sının <i>trnT-trnL</i> Bölgesinin Dizi Analizi	36
2.2.3. İstatistiksel Analiz	36
2.2.3.1. Dizilerin İşlenmesi	36
2.2.3.2. BLAST Analizi	38
2.2.3.3. Dizilerin Hizalanması	38
2.2.3.4. Filogenetik Analiz	38
2.2.3.4.1. Model Analizleri	38
2.2.3.4.2 İkili Uzaklık Analizi	39
2.2.3.4.3 Maximum Likelihood Analizi	39
2.2.3.4.4 Maximum Parsimoni Analizi	39

2.2.3.4.5 UPGMA Analizi (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) - Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Eşleştirilmiş Grup Metodu	40
2.2.3.4.6. Neighbour-Joining Analizi	40
2.2.3.5 Network Analizi.....	40

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Morfolojik Bulgular	41
3.2. Moleküler Bulgular	45
3.2.1. <i>trnT-trnL</i> Bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	45
3.2.2. Dizi Analizi.....	45
3.2.3. Örneklerin Baz Oranları ve İçeriği.....	45
3.2.4. İkili Uzaklık Analizi.....	45
3.2.5. Model Analizi	47
3.2.6. Maximum Likelihood Analizi.....	47
3.2.7. Maximum Parsimony Analizi.....	47
3.2.8. Neighbour-Joining Analizi	50
3.2.9. UPGMA Analizi.....	50
3.2.10. Network Analizi	55

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇLAR ve ÖNERİ

4.1. Tartışma	62
4.2. Sonuç ve Öneriler	68
KAYNAKLAR.....	70
EKLER.....	81
ÖZGEÇMİŞ	111

KISALTMALAR

A	: Adenin
bç	: Baz çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
C	: Sitozin
cpDNA	: Kloroplast DNA'sı
CTAB	: Setil 3-Metil Amonyum Bromid
dH ₂ O	: Distile Su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleik asit trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
G	: Guanin
gDNA	: Genomik DNA
kb	: Kilobaz
K2P	: Kimura 2-Parametre Modeli
LSC	: Large Single-Copy
M	: Molar
MEGA6	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0
mM	: Milimolar
MYD	: Mehmet Yaşar DADANDI'nın herbaryum koleksiyonu toplayıcı kodu
NTSYS	: Numerical Taxonomy System
ng	: Nanogram
PVP	: Polivinilpirolidon
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
rDNA	: Ribozomal DNA
SSC	: Small Single-Copy
TBE	: Tris Borat-EDTA
u	: Ünite

V : Volt

μ l : Mikrolitre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Bitki materyallerinin örnek numarası, örnek adı ve lokalite bilgileri.....	29
Tablo 2.2. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	30
Tablo 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	31
Tablo 2.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler.....	32
Tablo 2.5. <i>trnT-trnL</i> bölgesini amplifiye etmede kullanılan primerler (a ve b)	32
Tablo 2.6. Morfolojik karakterler ve kodlamaları.....	33
Tablo 2.7. PCR reaksiyonlarının gerçekleştiği sıcaklık ve süre değerleri.....	36
Tablo 3.1. Örneklerin nükleotid kompozisyonu	46
Tablo 3.2. Maksimum likelihood tahminine dayalı yer değiştirme oranları	47
Tablo 3.3. Maximum composite likelihood tahminine dayalı nükleotid yer değiştirme oranları.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Kladistik analizinde <i>Aphelandra</i> melezlerinin ebeveynlerine göre göreceli yerleşimleri	11
Şekil 1.2.	Kodlama yapmayan kloroplast DNA bölgeleri.....	19
Şekil 1.3.	Kloroplast DNA sının <i>trnT-trnF</i> bölgesi ve primer alanları.....	20
Şekil 1.4.	Bir filogenetik ağacın anatomisi.....	24
Şekil 1.5.	{B,C}, {H} ve {I} olmak üzere üç retikülat olayı gösteren bir retikülat network gösterimi	26
Şekil 3.1.	<i>Phlomis</i> örneklerine ait morfolojik verilerden elde edilen Manhattan mesafesi değerlerine göre oluşturulmuş phylogram ağacı.....	43
Şekil 3.2.	<i>Phlomis</i> örneklerine ait morfolojik verilerin Manhattan mesafesi değerlerine göre oluşturulmuş neighbour network şekli.....	44
Şekil 3.3.	<i>trnt-trnL</i> bölgesi amplifikasyon sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi.....	45
Şekil 3.4.	Bootstrap değerleri işlenmiş maximum likelihood ağacı.....	51
Şekil 3.5.	Bootstrap değerleri işlenmiş maximum parsimony ağacı.....	52
Şekil 3.6.	Bootstrap değerleri işlenmiş neighbour-joining ağacı.....	53
Şekil 3.7.	Bootstrap değerleri işlenmiş UPGMA ağacı.....	54
Şekil 3.8.	Dış grup içeren neighbour-net Analizi.....	59
Şekil 3.9.	Dış grup dalı kesilmiş neighbour-net Analizi	60
Şekil 3.10.	Dış grup içeren median-joining Analizi.....	61

GİRİŞ

Phlomis L. cinsi Türkiye Florası'nda 34 tür, 6 varyete ve 10 doğal melez ile temsil edilmektedir [1]. Ülkemizde bu cins içerisindeki melez sayısı önceleri 10 iken Dadandı'nın "Türkiye'nin *Phlomis* L. (*Lamiaceae*) Cinsi Revizyonu" isimli doktora tezinde yer alan 9 yeni melezle birlikte bu sayı 19'a çıkmıştır [2]. *Phlomis* cinsi içerisinde yer alan türlerin endemizm oranı %56.41 ve melezlerin endemizm oranı ise %100'dür [3]. Endemizm oranının ve tür sayısının yüksek olması bize cins içerisindeki türleşmenin henüz tamamlanmadığı ve halen devam ettiği kanısını oluşturmaktadır [2].

Türkiye'de, *Phlomis* türleri halk arasında ballık otu, çalba, şalba ve calba olarak isimlendirilmektedir [4]. Kudüs adaçayı, lamba fitili bitkisi ortak isimleri arasındadır. *Phlomis* ismi Yunancada "alev" anlamına gelen bir kelimedenden türemiştir ve antik zamanlarda yapraklarının lamba fitili olarak kullanımından böyle adlandırılmış olabilir [5]. *Phlomis* ve diğer *Lamiaceae* Martinov familyası türlerinin bal üretiminde önemli bir yeri vardır. Ayrıca *Phlomis* bitkisinin yaprakları Orta Anadolu, Antalya, Muğla ve Aydın'da çay olarak kullanılmaktadır [6]. *Phlomis* cinsi türlerinden halk hekimliğinde tonik, gaz giderici, iştah açıcı ve uyarıcı olarak faydalanılmaktadır [7-8].

Phlomis cinsi *Lamiaceae* familyasından otlar, çalılar ve yarı-çalılar içeren yaklaşık 100 türü kapsamaktadır [9]. Bu cins, *Phlomis* ve *Phlomoides* Moench olmak üzere iki ana seksiyona ayrılmıştır [10]. *Phlomis* seksiyonu, pembe-mor çiçekli ve otsu bitkilerden oluşan *Oxyphlomis* Benth. alt seksiyonu, sarı çiçekli ve otsu *Gymnophlomis* Benth. alt seksiyonu ve odunsu *Dendrophlomis* Benth. alt seksiyonu olmak üzere 3 alt seksiyona ayrılmaktadır [4].

Phlomis cinsinin *Phlomis* seksiyonunun gen merkezlerinden biri de ülkemizdir [11]. *Phlomis* türleri arasında doğal melezleşme oldukça yaygındır. *Phlomis* cinsinin Türkiye'deki melez endemizmi %100 olması ve bu durum sonucunda tür-türaltı-melez

endemizm oranının %65.3'ü bulması *Phlomis* cinsinin *Lamiaceae* familyası içinde en fazla meleze sahip olması ile sonuçlanmaktadır [3].

Doğal melezleşme, bitkilerde yaygın olarak oluşur ve bitkilerin türleşmesinde büyük bir role sahiptir [12-13]. Son yıllarda, bitkiler ve onların oluşturduğu toplulukların, ekolojik ve evrimsel süreçlerinin dinamik merkezleri olduklarının kavranmasıyla bitki melezleşme zonları çalışılmıştır [14]. İntrogresif melezleşme, önemli sayıda genotip üretmesi ve dolayısıyla genetik çeşitliliği artırarak, yeni suşlar, ekotipler ve hatta belli çevrelere uyum sağlamış türlerin kurulmasına yol açabileceği için, özellikle bitki evrimi çalışmaları için ilgi çekmiştir [12;15-16].

Phlomis L. cinsi türleri arasındaki genetik ilişkiyi ve doğal melezleşmeyi DNA düzeyinde moleküler yöntemlerle inceleyen hem ulusal hem de uluslararası az sayıda çalışma vardır. Türler arası genetik ilişkiyi araştıran Türkiye dışında sadece iki uluslararası çalışma mevcuttur. Bunlardan biri İspanya'da Albaladejo ve arkadaşları tarafından yapılan beş farklı *Phlomis* taksonunda ITS (Internal Transcribed Spacer) markırları ve üç kodlayıcı olmayan plastit DNA bölgesine dayalı olan moleküler çalışmadır [17]. Diğeri de Çin'de Pan ve arkadaşlarının 16 *Phlomis* türü, 1 *Lamiophlomis* Kudo türü ve 2 *Paraphlomis* Prain türü üzerinde ITS ve kloroplast DNA (*trnL-F* ve *rpL16*) bölgelerine yönelik yapmış olduğu çalışmadır [18]. Birinci çalışmada ITS sonuçları ile plastit bölgesine dayalı bulguların çeliştiği belirtilmiş ve ayrıca ITS sonuçlarının *P. crinita* Cav. ve *P. lychnitis* L. türlerinin ayrılmasında morfolojik ölçüm sonuçlarıyla benzer olduğu belirtilmiştir. İkinci çalışmada *Lamiophlomis*'in *Phlomoides* seksiyonunda yer aldığı, *Phlomis* cinsinin *Phlomis* ve *Phlomoides* seksiyonlarının monofiletik olduğu ve *Paraphlomis*'in bağımsız ayrı bir cins olduğu belirtilmiştir. Türkiye' de ise *Phlomis* türleri arasındaki genetik ilişkiyi ve melezleşmeyi sorgulayan az sayıda çalışma mevcuttur. Yüzbaşıoğlu ve Dadandı 2008 yılında *Phlomis*'in *Dendrophlomis* altseksiyonu üyeleri arasında RAPD markır tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmada, taksonların çoğunlukla morfolojik sınıflandırmaya benzer bir sıralanma içinde olduklarını gözlemlemiştir [19].

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları *P. x termessi* P. H. Davis'te RAPD primerlerini kullanarak melezi, ataları ile moleküler yönden karşılaştırmış ve melezin atalardan birine daha yakın olduğu belirlenmiştir. Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları bu çalışmada *P. x termessi* P. H.

Davis'in atalarından aktarılan türlere özgün bantlar ile hem melezliğini hem de ataları ile olan genetik ilişkisini araştırmışlar ve melezin hem atalardan türlere özgün bantlar aldığını hem de atalardan birine daha yakın olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, melez bireylerde atalarda olmayan yeni bant oluşumlarının gözlemlendiği de belirtilmiştir [20-21].

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşlarının SDS page yöntemi ile *Phlomis*'lerin tohumlarında depolanmış olan proteinlerin polimorfizmine dayalı olarak *Phlomis* türleri arasındaki genetik ilişkiyi araştırmışlardır. Toplamda 21 polipeptit bandı belirlenmiş olup, bunların 19'unun polimorfik olduğu belirlenmiştir. Morfolojik karakterlere dayalı olarak *Phlomis*'lerin 3 alt seksiyona (*Dendrophlomis*, *Gymnophlomis*, *Oxyphlomis*) ayrılmış olması bu araştırmayla da desteklenmektedir. Araştırmada taksonlar arasındaki genetik mesafeler *Dendrophlomis* seksiyonu için 0.00 ile 0.50 aralığında; *Gymnophlomis* seksiyonu için 0.00 ile 0.625 aralığında ve *Oxyphlomis* seksiyonu için 0.00 ile 0.769 aralığında belirlenmiştir [22].

Evren, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve basit dizi tekrarları arası bölgelerin çoğaltılması (ISSR) yöntemlerini kullanarak *P. kurdica* Rech. f. ve *P. oppositiflora* Boissieu & Hausskn. türlerinde tür içi genetik çeşitliliği ve bu iki türün melezi olan *P. x melitenensis* Hub.-Mor.'in melezliğini araştırmıştır. Evren ayrıca bu çalışmada, *P. kurdica* ve *P. capitata* Boissieu. türlerinin oluşturduğu *P. kurdica* x *capitata* melez örneklerini de moleküler yönden incelemiştir. Her iki melezin melezliğini gösteren atalarından melezlere aktarılan türlere özgü bantlar belirlemiştir. RAPD yönteminde en fazla genetik çeşitliliği *P. kurdica* türünde (H=0.1572; I=0.2646) gözlemişken, ISSR yönteminde ise en fazla genetik çeşitliliği *P. capitata* (H=0.1403; I=0.2329) türünde gözlemiştir [23].

Sezer, *P. physocalyx* Hub.-Mor. ve *P. oppositiflora* türlerinde tür içi genetik varyasyon düzeyini ve bu iki tür arasındaki melezleşmeyi RAPD ve ISSR ile incelemiştir. Bu araştırmada Nei'nin genetik çeşitlilik indeksi RAPD için 0.14-0.32 aralığında, ISSR için 0.06-0.37 aralığında; Shannon indeksi RAPD için 0.17-0.49 aralığında, ISSR için 0.06-0.54 aralığında gözlenmiştir [24].

Çekirdek genomuna göre genomunun küçük olması (120 – 217 kb), genomdaki gen dizilişinin korunması, genellikle tek ebeveynli kalıtım göstermesi ve genomunun konservatif bir şekilde (düşük oranda) evrimleşmesi nedeniyle kloroplast DNA'sı, türler arası doğal melezleşmenin incelenmesinde, filogenetik çalışmalarında ve populasyon genetiği çalışmalarında çok uygun olup bu tür çalışmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır [25].

Kloroplast DNA'sının kalıtımı klonaldır. Çiçekli bitkilerde kloroplast DNA'sı genelde anneden (maternal), en azından bazı açık tohumlu bitkilerde babadan (paternal) kalıtılır ve çoğunlukla genom bir ebeveynden aktarılır. Bazı çiçekli bitkilerde kloroplast genomu her iki ebeveynden (biparental) de kalıtılır. Yine de, bu durumlarda, kloroplastlar ve genomları genelde kaynaşmaz ve rekombine olmaz [26]. Örneğin kloroplast DNA'sının kalıtımının *Passiflora* L.'de [27] anneden, babadan ve her ikisinden de birden olabildiği; *Silene vulgaris* (Moench) Garcke'de [28] ise kloroplast DNA'sının kalıtımının babadan olduğu belirtilmiştir.

Kloroplast DNA'sında *trnL* ve *trnF* genleri arasındaki bölge, çok sayıda filogenetik bilgi içeren ve kodlama yapmayan bir bölgedir [29]. *TrnT-trnL* bölgesi bütünüyle, üç *trnA* geni (*trnT*, *trnL* ve *trnF*), iki genlerarası spacer (*trnT-trnL* ve *trnL-trnF*) ve *trnL* geninde yerleşmiş olan Grup I intronundan oluşmaktadır [30].

Phlomis cinsi içerisindeki türler arası ilişkiyi ve melezleşmeyi DNA dizi analizi düzeyinde araştıran ulusal her hangi bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma 12 farklı *Phlomis* melezinin moleküler yönden atalarına olan yakınlığı, genomlarındaki moleküler düzenlemelerin araştırılması ve araştırmada kullanılan 15 *Phlomis* türü arasındaki genetik ilişkiyi kloroplast DNA dizi analizi ile belirlemek ve türlerin kloroplast DNA'sının nükleotid dizilerine ait parmak izlerini çıkarmak amacıyla yapılmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

1.1. *Lamiaceae* Familyasının Morfolojik Özellikleri

Otlar veya çalılar şeklinde olup, genellikle glandular ve aromatikler ve gövdeleri 4 köşeli veya değildir. Yaprakları stipulasız, basit, bazen pinnat, daima opposit, ovat, eliptik ve rotundattır. Temel çiçek durumu brakte veya floral yaprakların koltuğunda taşınan vertisillatlar şeklindedir. Ayrıca vertisillatlar spikamsı baş, rasemus veya kimoza durumlar şeklinde düzenlenmiş olabilir. Çiçekler hermafrodit veya erkek sterildir. Brakteeler yapraklara benzer veya belirgin şekilde farklılaşmıştır. Brakteoller mevcut veya eksiktir. Kaliks genellikle 5 loplu, üst lop 3, alt lop 2 dişlidir. Nadiren loplar veya dişler 1-1 veya 1-4 şeklindedir ya da kaliks aktinomorftur. Damarlar 5-20 dir. Korolla gamopetal, zigomorfik ve bilabiata, tüpsü, genellikle üst dudak belirsiz 2 loplu, dik ya da çok az konkav, alt dudak 3 loplu, nadiren üst dudak indirgenmiş ve alt dudak 5 loplu, ya da üstte 1 ve altta 4 loplu, ya da korolla aktinomorfiktir. Stamenler korollaya yapışık, 4 ve didinam ya da 2, üstteki çift genellikle alttaki çiftten daha kısa, anter tekaları 2 ya da 1 gözlü, paralel ya da divergent, nadiren (*Salvia* L.'de) konnektiflerin uzamasıyla birbirinden ayrılmıştır. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli ve 4 ovüllü, 4 lopludur. Stilus ginobazik, nadiren değil, tepede bifiddir. Meyve 4 (nadiren az) ve kurudur (nadiren etli) [3;31].

1.2. *Phlomis* L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri

Phlomis cinsi türleri çok yıllık otsu veya çalılardır. Yaprakları bölünmemiş, kenarları düz, krenat ya da dentattır. Gövde ve yaprakları yumuşak, dik ve uzunca tüyler (piloza) veya az çok karışmış keçemsi (tomentosa) tüylerle kaplıdır. Salgı tüyleri bulunabilir. Tüyler basit, yıldız şeklinde (stellata) veya ağaçsı (dendroita) olabilir. Vertisillatlar, az veya çok çiçekli, birbirine yakın veya uzaktır. Brakteoller yoktur, varsa da az veya çok sayıdadır, subulat-ovat şekillidir. Kaliks tüpsü (tubular) veya darca çan şeklindedir

(kampanulat), 5-10 damarlıdır, 5 dişli ve dişler eşit veya değildir. Korolla iki dudaklıdır. Mor, pembe veya sarı renklidir (bazen üst dudak kahverengimsi), korolla tüpü kaliksi aşmaz ve halkalı veya halkasız olabilir. Üst dudak drepaniyum, emerginat; alt dudak patent ve üç lopludur. Stamenler 4 tane, korollanın boyunu aşar veya aşmaz. Anterler çiftler halinde, tekalar divergent ve stilus loplari eşit değildir. Nutletler üç köşelidir, tüylü veya tüsüz olabilir [1].

1.2.1. *Phlomis* L. Cinsinin Sistematikteki Yeri

Regnum : *Plantae*

Divisio : *Spermatophyta*

Subdivisio : *Angiospermae*

Classis : *Magnalopsida*

Subclass : *Asteridae*

Ordo : *Lamiales*

Familia : *Lamiaceae*

Genus : *Phlomis* L. [32]

1.2.2. *Phlomis* L. Cinsi ve Dünya Üzerindeki Yayılışı

Phlomis cinsi *Lamiaceae* familyasından otlar, çalılar ve yarı-çalılar içeren yaklaşık 100 türü kapsamaktadır [9]. Bu cins, *Phlomis* ve *Phlomoides* olmak üzere iki ana seksiyona ayrılmıştır [10]. Her iki seksiyon da Akdeniz bölgesinden orta Asya ve Çin'e kadar yayılır, *Phlomoides* seksiyonu türleri daha çok orta Asya ve Çin'de yayılış gösterirken, *Phlomis* seksiyonu türleri ağırlıklı olarak Akdeniz bölgesinde yayılış gösterir. Türkiye ve İran, *Phlomis* seksiyonunun Akdeniz bölgesindeki çeşitlenmesinin ana merkezleri olarak gösterilmektedir. Bilhassa, Türkiye'nin güney ve doğu bölümleri ile İran'ın kuzeybatı bölümünün bu seksiyonun orjin merkezleri olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, İranla karşılaştırıldığında Türkiye *Phlomis* seksiyonuna ait yaklaşık iki kat fazla sayıda tür (34) ve bu seksiyona ait türlerde de nerdeyse iki kat daha yüksek bir endemizm oranına (%57) sahiptir. İran için bu sayılar sırasıyla 18 ve %33'tür [11].

Phlomis taksonları arasındaki ilişkileri aydınlatmak için morfolojik, anatomik, palinolojik ve sitolojik özellikleri kullanan çok sayıda çalışma mevcuttur [1-2;9;17-24;33-35]. Bu çalışmalara göre *Phlomis* cinsi, *Phlomis* ve *Phlomoides* seksiyonlarına ayrılır. Türkiye’de *Phlomoides* seksiyonu sadece *P. tuberosa* L. ile temsil edilmektedir. *Phlomis* seksiyonu ise *Gymnophlomis*, *Dendrophlomis* ve *Oxyphlomis* olmak üzere 3 altseksiyona ayrılır. *Phlomis* seksiyonuna ait türlerin iki loptan oluşan kıvrık üst dudağı, ortada büyük bir lop ve yukarıda küçük iki loptan oluşan trifid bir alt dudağı vardır. *Phlomoides* seksiyonuna ait türler ise düz üst dudak, eşit loplu trifid alt dudaklıdır [9].

Dendrophlomis altseksiyonunda brakteoller linear-subulattan lanseolat ve ovata kadar şekillerde ve çok sayıdadır. *Oxyphlomis* seksiyonunda çoğu tür sert, kaliksle eşit (bazen daha uzun) linear-subulat, çok sayıda brakteollüdür. *Gymnophlomis* alt seksiyonunda brakteoller zayıf, az ya da çok sayıda nadiren yok, linear-subulat, küçük (2-10 mm) tabanda bağımsızdır [9].

Türkiye florasında *Phlomis* cinsi 33 tür, 6 varyete ve 13 doğal melez ile temsil edilmektedir. Bu 34 türün 4, 13 ve 15’i sırasıyla *Oxyphlomis*, *Gymnophlomis* ve *Dendrophlomis* altseksiyonlarına yerleştirilmiştir [36]. *Dendrophlomis* altseksiyonuna ait 13 tür arasında *P. amanica*, *P. bourgaei*, *P. chimerae*, *P. grandiflora* var. *fimbrilligera*, *P. leucophracta*, *P. longifolia* var. *bailanica*, *P. lycia*, *P. monocephala* ve *P. russeliana*’yı kapsayan 9 tür Türkiye Florası’na göre endemiktir [1]. *P. amanica* ve *P. grandiflora* var. *fimbrilligera* sırasıyla nesli tehlike altında ve zarar görebilir olarak kabul edilmiş, diğerleri düşük risk altında bulunmuştur [37]. Diğer taraftan, *P. chimerae* ve *P. amanica* sırasıyla sadece Çıralı (Antalya) ve Arsuz (Hatay) civarında yetişen yerel endemikler olarak bilinir [2].

1.2.3. *Phlomis* L. Cinsi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Phlomis cinsinin türleri arasındaki genetik ilişkiyi ve doğal melezleşmeyi moleküler yöntemlerle inceleyen hem ulusal hem de uluslararası az sayıda çalışma vardır. Türler arası genetik ilişkiyi araştıran, Türkiye dışında yapılan sadece iki uluslararası çalışma mevcuttur. Bunlardan biri Albaladejo ve arkadaşlarının 2005 yılında İspanya’da beş farklı *Phlomis* taksonunda ITS (Internal Transcribed Spacer) markırları ve üç kodlayıcı olmayan plastit DNA bölgesine dayalı olan moleküler çalışmadır [17]. Diğeri de daha kapsamlı olan, Pan ve arkadaşlarının 2009 yılında Çin’de *Phlomis*’in 16 türü,

Lamiophlomis'in 1 türü ve *Paraphlomis*'in 2 türü üzerinde ITS ve kloroplast DNA (*trnL-F* ve *rpL16*) bölgelerine yönelik yapmış olduğu çalışmalarıdır [18]. Birinci çalışmada ITS sonuçları ile plastit bölgesine dayalı bulguların çeliştiği belirtilmiş, ayrıca ITS sonuçlarının *P. crinita* ve *P. lychnitis*'in ayrılmasında morfolojik ölçüm sonuçlarıyla benzer olduğu belirtilmiştir. İkinci çalışmada *Lamiophlomis*'in *Phlomoides* seksiyonunda yer aldığı, *Phlomis* cinsinin *Phlomis* ve *Phlomoides* seksiyonlarının monofiletik olduğu ve *Paraphlomis*'in bağımsız ayrı bir cins olduğu belirtilmiştir. Türkiye'de ise *Phlomis* türleri arasındaki genetik ilişkiyi ve melezleşmeyi sorgulayan az sayıda çalışma mevcuttur. Yüzbaşıoğlu ve Dadandı 2008 yılında *Phlomis*'in *Dendrophlomis* altseksiyonu üyeleri arasında RAPD markır tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmada, taksonların çoğunlukla morfolojik sınıflandırmaya benzer bir sıralanma içinde oldukları gözlemlenmiştir [19].

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları *P. x termessi* melezinde RAPD primerlerini kullanarak, ataları ile moleküler yönden karşılaştırmış ve melezin atalardan birine daha yakın olduğu belirlemişlerdir [20-21]. Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları bu çalışmada *P. x termessi* melezinin atalarından aktarılan türlere özgün bantlar ile hem melezliğini hem de ataları ile olan genetik ilişkisini araştırmışlar ve melezin hem atalardan türlere özgün bantlar aldığını hem de atalardan birine daha yakın olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, melez bireylerde atalarda olmayan yeni bant oluşumlarının gözlemlendiği de belirtilmiştir.

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları SDS page yöntemi ile *Phlomis*'lerin tohumlarında depolanmış olan proteinlerin polimorfizmine dayalı olarak *Phlomis* türleri arasındaki genetik ilişkiyi araştırmışlardır. Toplamda 21 polipeptit bandı belirlenmiş olup, bunların 19'unun polimorfik olduğu belirlenmiştir. Morfolojik karakterlere dayalı olarak *Phlomis*'lerin 3 alt seksiyona (*Dendrophlomis*, *Gymnophlomis*, *Oxyphlomis*) ayrılmış olması bu araştırmayla da desteklenmektedir. Araştırmada taksonlar arasındaki genetik mesafeler *Dendrophlomis* seksiyonu için 0.00 ile 0.50 aralığında; *Gymnophlomis* seksiyonu için 0.00 ile 0.625 aralığında ve *Oxyphlomis* seksiyonu için 0.00 ile 0.769 aralığında belirlenmiştir [22].

Evren, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve basit dizi tekrarları arası bölgelerin çoğaltılması (ISSR) yöntemlerini kullanarak *P. kurdica* ve *P. oppositiflora* türlerinde tür içi genetik çeşitliliği ve bu iki türün melezi olan *P. x melitenensis*'in

melezliğini araştırmıştır. Ayrıca Evren bu çalışmada *P. kurdica* ve *P. capitata* türlerinin oluşturduğu *P. kurdica* x *capitata* melez örneklerini de moleküler yönden incelemiştir. Her iki melezin melezliğini gösteren atalarından mezlere aktarılan türlere özgü bantlar belirlemişlerdir. RAPD yönteminde en fazla genetik çeşitliliği *P. kurdica* türünde ($H=0.1572$; $I=0.2646$) gözlemişken, ISSR yönteminde ise en fazla genetik çeşitliliği *P. capitata* ($H=0.1403$; $I=0.2329$) türünde gözlemiştir [23].

Sezer, *P. physocalyx* ve *P. oppositiflora* türlerinde tür içi genetik varyasyon düzeyini ve bu iki tür arasındaki melezleşmeyi RAPD ve ISSR ile incelemiştir. Bu araştırmada Nei'nin genetik çeşitlilik indeksi RAPD için 0.14-0.32 aralığında, ISSR için 0.06-0.37 aralığında; Shannon indeksi RAPD için 0.17-0.49 aralığında, ISSR için 0.06-0.54 aralığında gözlenmiştir [24].

1.2.4. *Phlomis* L. Cinsinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Phlomis ve diğer *Lamiaceae* familyası türlerinin bal üretiminde önemli bir yeri vardır [38-39]. Ayrıca *Phlomis* bitkisinin yaprakları Orta Anadolu, Antalya, Muğla ve Aydın'da çay olarak kullanılmaktadır. *Phlomis* cinsi türlerinden halk hekimliğinde tonik, gaz giderici, iştah açıcı ve uyarıcı olarak faydalanılmaktadır [6-8]. Familya üyeleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı farmakoloji ve parfümeri sanayinde önemlidir. Eterik yağ elde edilir, baharat olarak kullanılır ve süs bitkisi olarak yetiştirilir [32].

1.3. Melezler ve Melezleşme

Melezleşme genel olarak, bir ya da daha fazla kalıtsal karakter bazında birbirinden ayrılabilen iki populasyon ya da populasyon gruplarından bireylerin birleşmesi olarak tanımlanır. Bu bağlamda, böyle bir birleşmeyle oluşmuş birey bir meleztir. Başka bir deyişle, melezler “bir ya da daha fazla kalıtılabilir karakter bazında birbirinden ayrılabilen” populasyonlardan iki birey arasındaki döller olarak daha geniş olarak tanımlanabilir. Benzer olarak, introgresyon genetik olarak ayrılabilen populasyonlar arasındaki gen transferi olarak tanımlanabilir [13]. Melezleşmenin olduğu bölge “melez zonu” diye adlandırılır. Bu çarpışmaların, genellikle bitki ya da hayvan ıslahçıların yönlendirmeleriyle, kontrollü koşullar altında olduğu durumlar yapay melezleşme olarak adlandırılır. Bunun aksine doğal melezleşme, kendiliğinden oluşan eşleşmeleri kapsar [40].

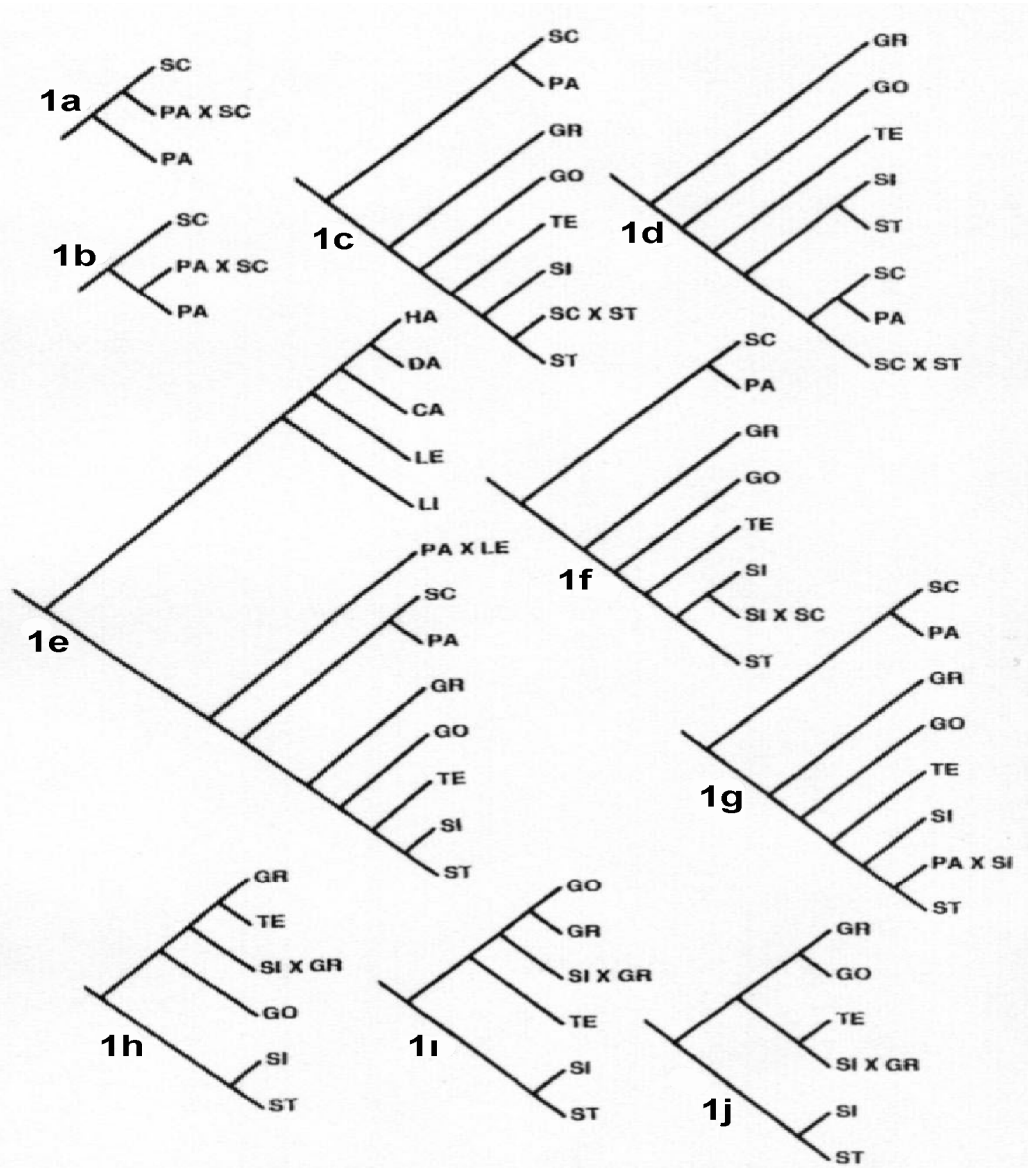
Çeşitli faktörler bitki taksonları arasında üreme bariyerleri olarak hizmet ederler. Fertilizasyondan önce (prezigotik) ya da fertilizasyonu müteakiben (postzigotik) etkili oluşuna göre ikiye ayrılabilen bu bariyerler, doğal melezleşmeyi kısıtlayıp tür sınırlarının korunmasına yardım ederler [40].

Doğal melezleşme, bitkilerde yaygın olarak oluşur ve türleşmede büyük bir role sahiptir [12-13]. Son yıllarda, bitkiler ve onların oluşturduğu toplulukların, ekolojik ve evrimsel süreçlerinin dinamik merkezleri olduklarının kavranmasıyla bitkilerin melezleşme zonları çalışılmıştır [14]. İntrogresif melezleşme, önemli sayıda genotip üretmesi ve dolayısıyla genetik çeşitliliği artırarak, yeni suşlar, ekotipler ve hatta belli çevrelere uyum sağlamış türlerin kurulmasına yol açabileceği için, özellikle bitki evrimi çalışmaları için ilgi çekmiştir [12;15-16].

McDade *Aphelandra* L. cinsinin 12 türünde ve bu türler arasında kontrollü melezlemelerle oluşturduğu 17 melezinde 50 morfolojik karaktere dayalı olarak oluşturduğu kladistik analizde melez bireylerin ebeveynlerine göre kladistikteki yerleşimlerini 4 kategoride toplamıştır: (1) Melez ebeveynleri arasında yerleşmiştir. Bu yerleşme ebeveynlerden biriyle kardeş (sister) takson olacak şekilde (Şekil 1a, 1b) veya yine ebeveynlerden biriyle fakat kardeş taksondan farklı bir şekilde yerleşmiştir (Şekil 1c, 1d). (2) Melez en son türevlenen ataya tabandan bağlanmıştır (Şekil 1e). (3) Melez en son türevlenen ataya kladistik olarak yakın bir şekilde yerleşmiştir (Şekil 1f, 1g). (4) Melez diğer melezler/taksonlarla bir arada gruplanmıştır (Şekil 1h, 1i, 1j) [41].

Genetik varyasyon çalışmalarında kullanılan PCR'a dayalı moleküler makırlarda atalardan elde edilmiş DNA bantlarının elektroforez görüntüleri incelendiğinde atalara ait türe özgü olan bantlar melezlerde de görülebilmektedir. Ancak atalardan birinde türe özgü olan bantlar melezlerde gözlemlenebilirken diğer atada görülmeyebilir. Ayrıca krossing-overden kaynaklı genetik rekombinasyonlardan kaynaklanan atalarda gözlemlenmeyen yeni (mezlere özgü) bantlar da gözlemlenebilmektedir [20].

Yeni bir türün doğuşunda türler arası gen akışının büyük rol oynadığı durumlar melez türleşmesi olarak isimlendirilir [42]. Bitkilerde yeni türlerin önemli bir kısmı türler arası melezleşme sonucu ortaya çıkmıştır. Günümüzde ise melezleşmenin türleşmede önemli bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Bitki türlerinin %25'inden fazlasının diğer türlerle melezleşme yaptığı kabul edilmektedir [43].



Şekil 1.1a-j. Kladistik analizinde *Aphelandra* melezlerinin ebeveynlerine göre göreceli yerleşimleri. (CA) *Aphelandra campanensis*; (DA) *A. darienensis*; (GO) *A. golfodulcensis*; (GR) *A. gracilis*; (HA) *A. hartwegiana*; (LE) *A. leonardii*; (LI) *A. lingua-bovis*; (PA) *A. panamensis*; (SC) *A. scabra*; (SI) *A. sinclairiana*; (ST) *A. storkii*; (TE) *A. terryae*.

Melezler: GO X LE, GO X SC, GO X SI, LE X CA, LE X GO, LE X SI, PA X GO, PA X LE, PA X SC, PA X SI, SC X GO, SC X PA, SC X SI, SC X ST, SI X GR, SI X SC, SI X TE [41]

Rekombinasyonel türleşme doğal melezleşmenin evrimsel tek sonucu olmasa da [44], melezlerin stabilizasyonu teorik ve pratik olarak yeni türlerin oluşumuna yol açabilir [45]. Bu stabilizasyon, kromozomların yeniden düzenlenmesini ve reproduktif izolasyon bariyerlerinin gelişimini kapsamalıdır [46].

Bitki populasyonları arasındaki melezleşme ve introgresyonun ters bir etkisi de olabilir. Levin ve arkadaşlarının çalışması melezleşmenin nadir bitki türlerinin demografik olarak batması ve bol bulunan türdeşi tarafından genetik asimilasyonu ile yok olmasında etkili olduğunu göstermiştir [47].

1.4. Moleküler Sistemik

Uzun yıllar boyunca araştırmacılar dünyadaki biyolojik çeşitliliği anlamak ve değerlendirmek için büyük bir çaba göstermişlerdir. 17. yüzyılda Linnaeus tarafından yapılan hiyerarşik tabanlı sistem, bu biyolojik çeşitliliği sınıflandırmada ve tanımlamada temel oluşturmuştur. Linnaeus'tan sonraki araştırmacılar ise filogenetik akrabalıkların önemini ön plana çıkarmış ve böylece filogenetik sistemik diye adlandırılan yöntem sistemikte yer almaya başlamıştır [48]. 1960'larda moleküler sistematik'in temelini oluşturan genetik materyalin yani DNA'nın keşfi ile bu alandaki çalışmalar daha da hızlanmıştır. Moleküler sistemik alanındaki ilerlemeyle elde edilen sonuçlar, morfoloji temelli sistemik yaklaşımını tamamen devre dışı bırakmasa da, filogenetik çalışmalarda moleküler düzeyde bir yaklaşımın daha güçlü sonuçlar elde edeceğini ortaya koymuştur [49].

1.5. Moleküler Sistemikte Kullanılan Markırlar

Kalıtımları morfolojik, biyokimyasal, protein ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere “markır” denir [50]. Markırlar morfolojik markırlar, biyokimyasal markırlar ve moleküler markırlar olmak üzere üç gruba ayrılır.

1.5.1. Morfolojik Markırlar

Morfolojik markırlar geçmişte ve günümüzde yaygın olarak kullanılırlar. Bu markırların avantajlı yanları analizlerinin kolay olması, ucuz olmaları ve haritalamanın kolayca yapılabilmesi olmasıdır. Ancak, sayılarının az olması, çevresel faktörlerden etkilenmeleri gibi dezavantajları da vardır. Ayrıca, morfolojik markırlar genellikle dominant özelliktedir ve bu nedenle morfolojik markırlarla dominant (AA veya Aa) ve resesif (aa) fenotipler belirlenebilirken, heterozigot (Aa) fenotipler dominant fenotiplerden ayırt edilemezler [50-51].

1.5.2. Biyokimyasal Markırlar

Proteinlerin elektroforetik olarak ayrılmasına ve bu proteinlerin substratları ile enzimatik boyanmasını temel alan yöntemdir [52]. Protein markırları, DNA teknolojisinin henüz gelişmediği dönemlerde önemli ilerlemeler sağlamıştır. Bu markırlar depo ve enzim proteinleri olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Depo proteinleri bir jelde hareket ettirilip belirli boyalarla boyandıklarında farklı genotiplerde ortaya çıkan farklı bantlar genetik markır olarak kullanılabilir. Bu markırların avantajı analizlerinin çabuk, tekrarlanabilir ve güvenilir olmasıdır [50].

Enzim markırları izoenzimler ve alloenzimler olmak üzere iki gruba ayrılır. Belli bir enzimin katalitik aktivitesi aynı, fakat elektriksel alanda göçü, doku dağılımı, inhibitör ve aktivatörlere yanıtları farklı olan formlarına o enzimin “izoenzimleri” denir. İzoenzimler, amino asit dizinleri farklı olduğu halde aynı tepkimeyi katalize eden enzimlerdir; farklı dokularda veya farklı hücre içi kompartımanlarda farklı rollere sahiptirler. Eğer bir reaksiyon hücrenin hem sitzolünde hem mitokondrisinde gerçekleşiyorsa, genellikle farklı izoenzimler tarafından katalize edilir [50].

Alloenzimler ise aynı lokustaki farklı alleler tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formlarıdır [53].

İzoenezimlerin metabolizmada üstlendikleri rollerin iyi bilinmesi, kullanılan yöntemlerin ucuz ve hızlı olması, izoenzim markırlarını avantajlı hale getirmektedir. Ancak az sayıda lokus olması, bazı izoenzimlerin belirli dokulara spesifik olması veya belli dönemlerde ifade edilebiliyor olması ve transkripsiyon sonrası modifikasyonlara uğraması bu markırların temel dezavantajlarıdır [54-55].

1.5.3. Moleküler Markırlar

Moleküler markır teknikleri, bireyler arasındaki DNA dizilerinin farklılıklarını ortaya çıkarmakta kullanılan uygulamalardır. Başka bir ifadeyle moleküler markır, genom içinde bir DNA parçasının farklılıklarını temsil eder ve bu farklılıklar eklenmeler, silinmeler, yer değiştirmeler, duplikasyonlar gibi olaylardan meydana gelebilir. DNA temelli moleküler markırlar taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği vb. alanlarda kullanılan çok yönlü araçlardır [56]. Polimer zincir reaksiyonunun (PCR)

bulunmasından sonra DNA markırları kullanılarak gen etiketleme, genetik haritalama, harita temelli tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik analizler, markırlar yardımıyla seleksiyon (MAS) çalışmaları kolaylaşmıştır [57]. İdeal bir moleküler markır tekniğinin;

- a. Polimorfik olması ve genom boyunca dağılması
- b. Genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında yeterli olması
- c. Çok sayıda, bağımsız ve güvenilir markırlar üretmesi
- d. Basit, hızlı ve ucuz olması
- e. Az miktar DNA veya doku ihtiyacı gerektirmesi
- f. Farklı fenotiplerle bağlantı oluşturması

gibi özelliklere sahip olması avantajdır ama hiçbir markır tekniği bu avantajların tümüne birden sahip değildir. Moleküler markır teknikleri kullanım amacına paralel olarak farklı kriterlere göre gruplandırılabilir;

I. Geçiş türüne göre (biparental çekirdek kalıtımı, maternal organel kalıtımı, paternal organel kalıtımı)

II. Gen aksiyonuna göre (dominant ve kodominant markırlar)

III. Analiz metotlarına göre (melezleşme temelli ve PCR temelli markırlar) [58-59]

1.5.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) - Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

DNA markırları içerisinde ilk keşfedilendir [60]. DNA zincirinde kesim enzimleri tarafından oluşturulan DNA parçalarının uzunluk farkı ile karakterize edilir. Bu metod kesim enzimlerinin kesim yerlerindeki mutasyonların belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Kesim bölgesi ortadan kaldıran tek baz değişiklikleri en yaygın olarak gözlenen mutasyondur. Bu yöntemde populasyonlar arasında veya içindeki kesim bölgesinde meydana gelebilecek mutasyonlar ya da DNA eşleşmesi sonunda ortaya çıkan hatalar RFLP analizi ile tanımlanabilir [61].

RFLP tekniğinin DNA amplifikasyonuna dayalı moleküler tekniklere göre pahalı olması, radyoaktif madde kullanılması, zaman alıcı ve fazla miktarda DNA gerektirmesi ve uygulanmasının zor olması gibi dezavantajları vardır. Bunun yanı sıra RFLP analizi ile değişik laboratuarlarda aynı sonuçlara ulaşılabilir, RFLP kodominant katılır ve heterozigot bireylerin tanınmasını sağlar [62].

1.5.3.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi

Bu teknik PCR ile RFLP tekniğinin birleştirilmesi sonucunda ortaya konmuştur. Kesim enzimleri ile kesilmiş DNA parçalarının seçici amplifikasyonuna dayanmaktadır. Primerler hem diziye özgü hem de rastgele olabilir [63]. AFLP, RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir [64].

AFLP tekniğinin avantajları; polimorfizm oranının yüksek olması, RFLP'ye göre hızlı olması, minimum primer testi ile çok sayıda markır üretmesi, parmak izi analizleri için uygun olması, QTL analizleri için uygun olması, sayıları RAPD ve RFLP'den fazla olması ve genomik DNA'nın bilinmesine gerek olmamasıdır [65].

Tekniğin dezavantajları ise; saf ve yüksek moleküler ağırlıkta DNA'ya gereksinim duyulması, pahalı bir teknik olması, genellikle dominant markırlar vermesi ve farklı genetik haritalar arasında transferinin güç olmasıdır [65].

1.5.3.3. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA (s)) – Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

RAPD tekniği; nükleotid dizisi rastgele belirlenen kısa zincirli oligonükleotidlerin kullanıldığı, PCR ile genomik DNA'da ilgili bölgelerin çoğaltıldığı bir yöntemdir. Bu teknikte 6–10 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu yapılır. Başlatıcı DNA'ların hazırlanmasında belirli bir DNA sırasına ait bilgi gerekmemektedir.

RAPD tekniği; hızlı sonuç vermesi, maliyetinin düşük olması, az işgücü gerektirmesi, az miktarda DNA'ya gereksinim duyulması bakımından popüler hale gelmiştir. Ayrıca

polimorfizm oranı da çok yüksektir. Tekniğin dezavantajları ise tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve dominant kalıtım göstermesidir [66].

1.5.3.4. SSR (Single Sequence Repeats) – Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları)

Yüksek organizmalarda henüz görevleri tam olarak bilinmeyen ancak düzenleyici rollere sahip oldukları düşünülen, rastgele ardışık tekrarlanan, 2–6 nükleotid gruplarından oluşan bölgeler bulunmaktadır. Bu tekrarlar (AT), (GT), (ATT), (CTT) veya (GATA) gibi nükleotidlerin n sayıda tekrarlarından oluşurlar. STR (Short Tandem Repeats, Kısa Ardışık Tekrarlar) diye de adlandırılan mikrosatellitler, 11–60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR: Variable Number Tandem Repeats) farklıdır. Minisatellitler genellikle kromozomların uç kısımlarında telomere yakın yerde bulunurken, mikrosatellitler yüksek organizmalara ait kromozomlarda daha bol ve gelişigüzel dağılım gösterirler [67].

Mikrosatellit DNA markırları, popülasyon düzeyindeki, araştırmalarda son derece kullanışlıdır. Mikrosatellitlerde polimorfizm oranı ve sonuçların tekrarlanabilirliği çok yüksektir. Ayrıca kodominant markır olması nedeniyle heterozigot ve homozigotu ayırt edebilir. Ancak bir mikrosatelit lokusun çoğaltılabilmesi için bu dizinin etrafındaki dizilerin bilinmesi gerekmektedir [68].

1.5.3.5. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – Basit Dizi Tekrarları Arası

ISSR tekniği, mikrosatellitlerin arasındaki dizilerin PCR amplifikasyonuna dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemde tek bir primer kullanılır ve primer uzunluğu 16–20 nükleotit olup, duruma göre primerlerin uçlarından biri 2–4 baz uzatılarak seçicilik sağlanır. Oluşturulan bu seçicilik sayesinde çok sayıda lokus aynı anda taranabilir [69].

Ön dizi bilgisine gerek duyulmaması, birçok lokusta eş zamanlı olarak amplifikasyon yapılabilmesi nedeniyle genetik varyasyonları tespit etmede ISSR tekniği avantajlı bir teknik halini almıştır [70].

1.5.3.6. SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) – DNA Dizisi Belirlenerek Çoğaltılmış Polimorfik Bölgeler

SCAR yöntemi RAPD lokuslarına özgü primerler ile DNA amplifikasyonuna dayanır ve genetik açıdan tek bir lokus olarak tanımlanan genomik DNA fragmentlerin karakterize eder. SCAR markırları kodominanttır. SCAR işleminin yapılabilmesi için amplifikasyon ürünleri klonlanır ve DNA dizileri belirlenir. Dizi bilgisi dikkate alınarak RAPD lokuslarına özgü ve daha uzun primerler tasarlanır. SCAR primerinde bulunan 24 nükleotidin ilk on bazı orijinal RAPD primerlerinden, geri kalan bölgesi ise iç dizilerden oluşmuştur. SCAR markırları kesim enzimleri ile kesilerek kodominant markırlara dönüştürülebilmektedir. SCAR markırlarının tekrarlanılabilirliği, RAPD ve ISSR markırlarına göre çok daha yüksektir [71].

1.5.3.7. ITS (Internal Transcribed Spacer) - İçsel Transkribe Edilen Bölge

ITS bölgesi rDNA lokusunun elementlerini ayırtıran 18S–5.8S–26S bölgeleri arasındadır. rDNA lokusu 5' den 3' ne doğru okunduğunda 5' ETS, 18s rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA ve son olarak da 3' ETS kısımlarından oluşmaktadır. Bu bölgenin uzunluğu kapalı tohumlu bitkilerde 500–700 bp arasında değişiklik gösterirken açık tohumlu bitkilerde bu bölgenin uzunluğu 1500 ile 3500 baz çiftine kadar çıkabilir. rDNA bölgesindeki ITS bölgeleri kodlama yapan bölgelere göre daha hızlı evrimleşir. ITS bölgesi melezleşmenin incelenmesi amacıyla filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. ITS bölgesinin avantajları: 1) farklı organizmalar için mevcut olan evrensel primerlerle PCR amplifikasyonu kolaydır, 2) çok kopyalı yapısı vardır, 3) dizi analizine imkân veren orta düzeyde büyüklüğü vardır, 4) bu bölge gösterdiği varyasyon nedeniyle tür veya cins düzeyinde evrimsel çalışmalar için uygundur [72-73].

1.5.3.8. Kloroplast DNA (cpDNA)

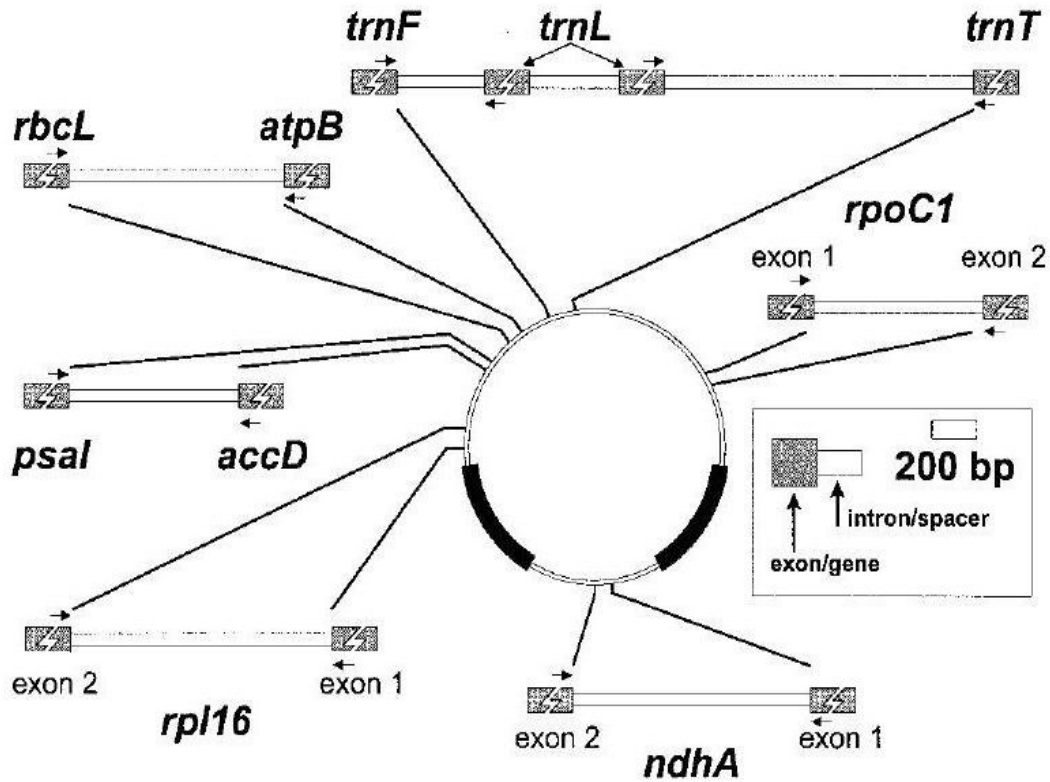
Çekirdek genomuna göre genomunun küçük olması (120 – 217 kb), genomdaki gen dizilişinin korunması, genellikle tek ebeveynli kalıtım göstermesi ve genomunun konservatif bir şekilde (düşük oranda) evrimleşmesi nedeniyle kloroplast DNA'sı, türler arası doğal melezleşmenin incelenmesinde, filogenetik çalışmalarında ve populasyon

genetiği çalışmalarında çok uygun olup, bu tür çalışmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır [25].

Kloroplast DNA'sının kalıtımı klonaldır. Çiçekli bitkilerde anneden, en azından bazı açık tohumlu bitkilerde babadan kalıtılır ve çoğunlukla genom bir ebeveynden aktarılır. Bazı çiçekli bitkilerde kloroplast DNA genomu her iki ebeveynden de kalıtılır. Yine de, bu durumlarda, kloroplastlar ve genomları hiçbir zaman kaynaşmaz ve rekombine olmaz, bunun yerine somatik olarak ayrılırlar [26]. Örneğin kloroplast DNA'sının kalıtımının *Passiflora*'da [27] anneden, babadan ve her ikisinden de birden olabildiği ve *Silene vulgaris*'te [28] ise kloroplast DNA'sının kalıtımının babadan olduğu belirtilmiştir

Kloroplast genomu tipik olarak, 120 ila 170 kilobaz (kb) çifti arasında değişen boyutlardadır ve kara bitkilerinde boyut, yapı, gen içeriği ve genlerin doğrusal düzenlenmesi bakımından nispeten daha yüksek derecede konservatiftir. Birkaç istisna dışında, kloroplast genomu her biri yaklaşık 25 kb olan ve gen komplementi açısından birbirinin ayna görüntüsü olan iki ters tekrar içerir. Ters tekrarlar birbirinden bir büyük ve bir de küçük tek-kopya bölgeleriyle (sırasıyla LSC ve SSC) ayrılmışlardır. Daha önceki çalışmalar, ters tekrar bölgelerinin nokta mutasyonlarını tek kopya bölgelerinden daha yavaş biriktirdiğini öne sürmüştür [74-76]. Perry ve Wolf, nükleotid yer değiştirme oranının tek kopya bölgelerde ters dizilere göre 2,3 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir [77]. Ters tekrarların nisbeten daha yavaş oranda evrimleşmesi ve ilk uyarlanmış kloroplast bölgelerinin (örn., *rbcL*, *atpB*, *trnL-trnL-trnF*) LSC'de konumlanmış olması nedeniyle çoğu bitki araştırmacısı, tek kopya bölgelerine odaklanmış moleküler araçları kullanmaktadırlar [78].

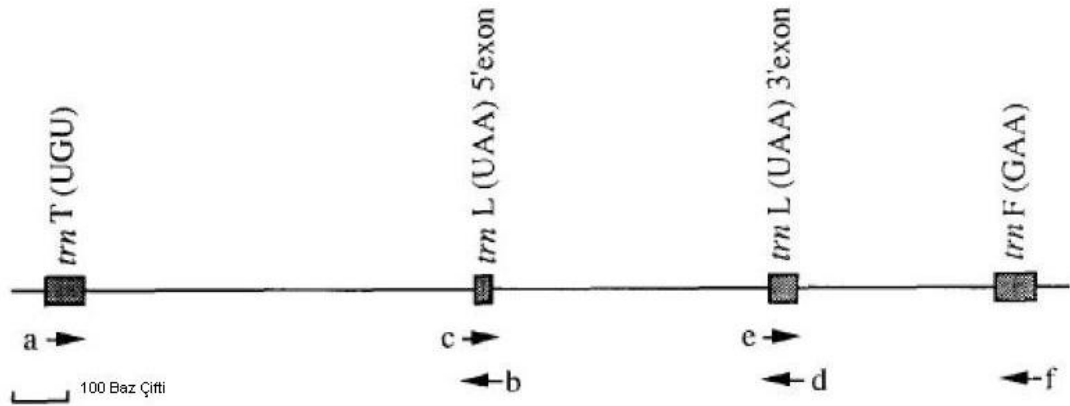
Kloroplast genomu üç fonksiyonel kategoriye ayrılabilir; (1) protein kodlayan genler, (2) intronlar ve (3) genlerarası spacerlar; son ikisi protein kodlamaz ve kodlama yapmayan bölge olarak adlandırılır. *Nicotiana* L. kloroplast haritasına göre, (Şekil 1.2.) [79]. LSC ve SSC'nin yaklaşık %43'ü kodlama yapmıyor. Tek kopya kloroplast DNA'sının yaklaşık %10,6'sını 15 intron oluştururken, 92 genin arasındaki spacer ise %32,3'ünü oluşturmaktadır [78].



Şekil 1.2. Kodlama yapmayan kloroplast DNA bölgeleri [79]

Kloroplast DNA'sının *trnL* ve *trnF* genleri arasındaki bölge, çok sayıda filogenetik bilgi içeren özelliğe sahip olan ve kodlama yapmayan bir bölgedir [29]. *TrnT-trnL* bölgesi bütünüyle, üç *trnA* geni (*trnT*, *trnL* ve *trnF*), iki genlerarası spacer (*trnT-trnL* ve *trnL-trnF*) ve *trnL* geninde yerleşmiş olan Grup I intronundan oluşur (Şekil 1.3) [30]. Bu bölge, ortalama yaklaşık 752 baz çifti ve birkaç büyük indel ile bu daha büyük bölge (LSC) içerisindeki en değişken bölgedir [78]. Birçok delesyon ve insersiyon mutasyonları içerir. *trnT-trnL* bölgesi, angiosperm filogenetiğinin çözülmesi için bir dizi çalışmada kullanılmıştır [80-81].

Kloroplast genomunda filogenetik analizler için yaygın olarak tercih edilen diğer bir bölge de *rpL16* intronudur [78]. Kodlama yapmayan cpDNA bölgeleri dizileri arasında ayrılma seviyeleri çeşitlilik gösterse de [82] *rpL16* intronu ve *trnT-trnL* genlerarası spacerı cpDNA bölgeleri arasında en hızlı evrimleşen bölgelerdir [83].



Şekil 1.3. Kloroplast DNA'sının *trnT-trnF* bölgesi ve primer alanları (a'dan f'ye) [29]

1.6. DNA Dizileme

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak DNA dizi analizi yöntemleri de gelişme göstermiştir [84].

DNA dizi analizleri ya da sekanslama, DNA'nın birincil yapısının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine melezleşmesine dayanır. Bu melezleşme sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb) tespiti ya da rekombinant DNA oluşum yapılarının tayininde kullanılır. Ayrıca gen regulasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri, konsensus dizileri, epistatik genler ve etkileri belirlenebilmektedir. Preimplantasyon tanısı, kalıtsal hastalık tayininde oldukça kullanılır [84].

DNA dizi analizinde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem;

- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi [85]
- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi [86]

1.6.1. Otomatik DNA Dizi Analizi

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır.

Otomatik DNA dizi analizinde de Sanger'ın enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Tek farkı radyoaktif izotop yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Bu sistemde dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar. Guanin bazı siyah renkle, timin bazı kırmızı renkle, adenin bazı yeşil renkle ve sitozin bazı mavi renkle gösterilir.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarlarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matriksleri bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya, ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir [87].

1.6.2. Çoklu Dizi Hizalama ve MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) – Logaritmik Olasılık Ortalaması ile Çoklu Dizi Karşılaştırması

Çoklu dizi hizalama, biyoinformatikte temel bir araçtır. Çoklu dizi hizalama, dizi oluşturma, moleküler modelleme, veritabanı aramaları, filogenetik ağaç oluşturulması gibi konularda başlıca araçtır. İkili dizi hizalamada dinamik programlama tekniğiyle polinom zamanda optimum sonuç bulunabilmesine rağmen, var olan çoklu dizi hizalama teknikleri optimum hizalamayı ancak dizi sayısı ile üssel ilişkili bir sürede bulabilir. Bu da pratikte gerekli olan büyük boyutlu verilerde problemin çözümünü, günümüz hesaplama gücüyle imkânsız kılar. Ayrıca bazı buluşsal (heuristic)

yöntemlerle ortaya çıkan sonuçların yerel optimuma takılma ihtimalleri çok yüksektir. Buna ek olarak, bulunan hizalamalar uzmanların bakış açılarına göre de farklı değerler alabilmektedir. Bu yüzden yerel optimaya takılmadan farklı iyi hizalamalar verebilecek yöntemler gittikçe önem kazanmaktadır [88].

MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by log-expectation), protein ve nükleotid dizileri için çoklu dizi hizalama yazılımıdır. Metod, Robert C. Edgar tarafından 2004'te iki makale halinde yayınlanmıştır.

Nucleic Acids Research'de yayınlanan ilk makalede dizi hizalama algoritması tanıtılmış [89], BMC Bioinformatics de yayınlanan ikinci makalede daha fazla teknik ayrıntı sunulmuştur [90].

MUSCLE algoritması 3 safhada ilerler: 'taslak ilerleyen', 'geliştirilmiş ilerleyen' ve 'iyileştirme'. 'Taslak ilerleyen' safhasında, algoritma, bir taslak çoklu hizalanma üretir, hız doğruluktan önemlidir. "Geliştirilmiş ilerleyen" safhasında, taslak hizalamanın oluşturulmasında kullanılan ikili ağacın yeniden değerlendirilmesi için Kimura uzaklığı kullanılır ve daha doğru bir çoklu hizalama üretilir. Son safhada, ikinci aşamada üretilen geliştirilmiş hizalama iyileştirilir. Çoklu hizalamalar her safhanın sonunda hazırdir [89].

MUSCLE tipik olarak (ama her zaman değil), tercih edilen seçeneğe bağlı olarak daha iyi dizi hizalamaları sunduğu için genellikle Clustal'ın yerine kullanılır. Ek olarak, MUSCLE özellikle büyük hizalamalarda, Clustal'dan önemli ölçüde hızlıdır [89-90].

MUSCLE, bir eklenti olarak bazı programlarda mevcuttur.

1.7. Filogenetik Analiz

Filogenetik, evrimsel ilişkileri araştırır. Filogenetik analizler ise bu ilişkiler hakkında çıkarım yapılması ya da tahmin yürütülmesi anlamına gelir. Filogenetik analizlerden çıkarımsal evrimsel tarih genellikle dallanma, moleküller (gen ağaçları), organizmalar ya da her ikisinin de arasındaki kalıtılmış ilişkilerin tahmini soyağacını temsil eden ağacımsı diyagramlar olarak betimlenir. Filogenetik bazen "kladistik" olarak adlandırılır [91].

Kladistiğin ardındaki temel prensip bir grup ya da klad üyelerinin ortak bir evrimsel tarihi paylaştıkları ve birbirlerine diğer gruplardaki üyelere nazaran daha yakın

olduklarıdır. Belirli bir grup, uzak atalarda olmayan benzersiz özellikleri paylaşımlarıyla tanınır. Bu paylaşılan, türemiş karakteristikler gözlenebilen ve tanımlanabilen her şey olabilir, bir omurga geliştiren iki organizmadan bir genin belli bir gen çiftinde bir mutasyona sahip olan iki diziye kadar. Kladistik analizler genellikle çoklu özellikler karşılaştırılarak ya da bazı özellikleri bir seferde, çoklu baz çiftleri veya bir sekanstaki amino asitler gibi, karşılaştırılarak yapılır [91].

Kladistikte üç temel varsayım söz konusudur:

- Herhangi bir organizma grubu birbiriyle ortak bir atadan gelen soy ile ilişkilidir (evrim teorisinin temel prensibi).
- Filogenetik farklılaşmanın iki kola ayrılarak gerçekleştiği varsayılır. Bu varsayım tartışmalıdır.
- Özelliklerdeki farklılaşma zamanla soylarda oluşur. Bu kladistiğin işlemesi için gerekli bir durumdur.

Makromoleküller, özellikle diziler, filogenetik ya da kladistik analizler için en popüler veri biçimi olarak morfolojik ve diğer organizmal karakterleri baskılamıştır [91].

DNA dizi analizine dayalı filogenetik veri analizi 4 adımdan oluşur:

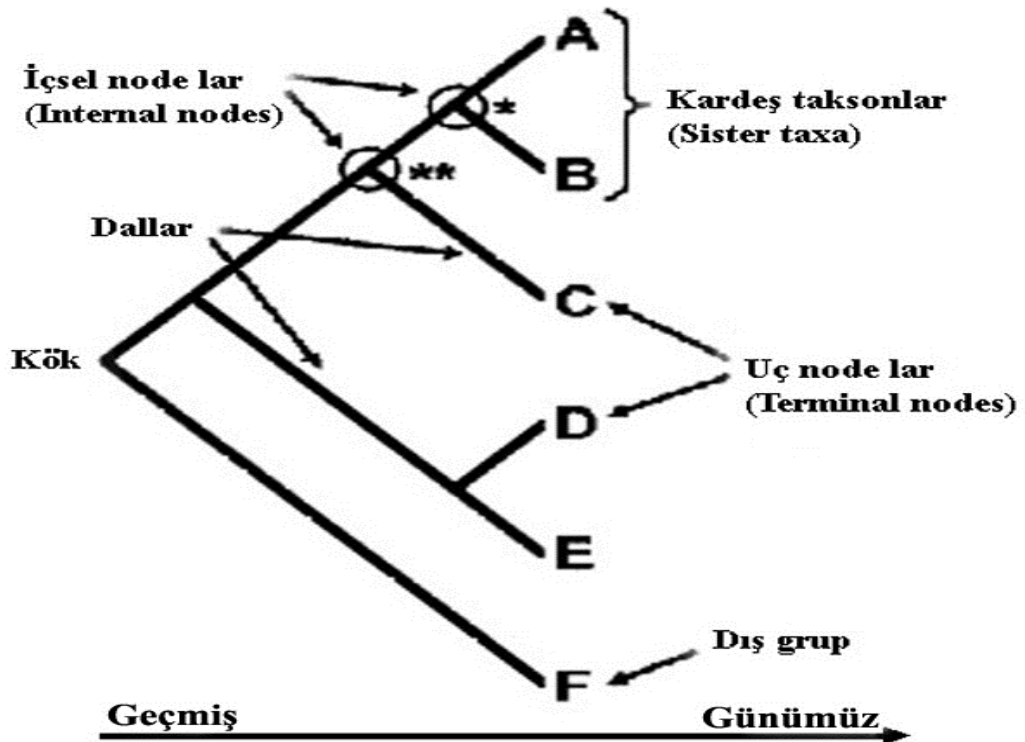
1. Hizalama (alignment)
2. Substitisyon modelini belirleme
3. Ağaç oluşturma
4. Ağacı geliştirme

1.7.1. Filogenetik Ağaç

Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir [92].

Bir filogenetik ağacın bileşenleri boğumlar (node) ve dallardır (branch). “Terminal nod”lar türleri ya da büyük taksonomik grupları temsil eder. Terminal nodlar (tips) güncel taksonlara karşılık gelir ve ağaçta uçlarda yer alır. Terminal nodlar birbirlerine “internal nod”larda birleşen dallarla bağlanır. Internal nodlar (içsel boğumlar), bu dalları

oluşturan ortak ataları (hipotetik, varsayımsal) temsil eder ve diğer bir ifadeyle kardeş taksonlara (sister) sebep olan soyların bölünme (türleşme) olaylarının ifade edilmesini yansıtır. Filogenetik ağaçtaki dallar ise nodeların çiftlerini birleştirir ve atalar ve atalardan türemişler (ataların soyundan gelenler) arasındaki ilişkileri yansıtır. Bir uçta sonlanan dallar çevresel dallar diğerleri ise içsel dallara karşılık gelir. Bazı durumlarda evrimsel zamanın miktarının bir ölçüsü olarak dalların uzunluklarının yorumlanması istenebilir. Eğer bir internal node sadece üç dalı birleştirmişse bu node iki kola ayrılmışlığı (bifurcation; iki kola çatallanmayı) yansıtır. Eğer bir internal node üçten fazla dala birleşmişse bu node çok kola ayrılmışlığı (multifurcate) yansıtır. Dallanma modeli ağacın “topoloji”si olarak bilinir, evrimsel ilişkiyi gösterir. Diğer türlerle paylaşılmayan en son ortak ataya ait iki tür “kardeş takson”lardır. Tür örneklerine en uzak ilişkili örnek ya da örnekler “dış grup” olarak adlandırılır. Dış grup, evrim ağacını “kök”lendirmek için gereklidir ve tüm grubun paylaştığı en son ortak atayı belirler (Şekil 1.4) [93-94].



Şekil 1.4. Bir filogenetik ağacın anatomisi [93]

1.7.1.1. Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan yöntemler, “karakter temelli yöntemler” ve “mesafe temelli yöntemler” olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Mesafe temelli yöntemler bazı ölçümlere göre ikili uzaklıkları hesaplar ve ağaç oluşturmak için verinin aslını değil sadece belirlenmiş uzaklıkları kullanır. Karakter temelli yöntemler, asıl veri örneklerinin her karakter için yayılmasını optimize ederek ağaç oluştururlar. Bu nedenle ikili uzaklıklar, ağaç topolojisi ile belirlendiklerinden önceden belirlenmiş değildirler [92].

Filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan yöntemler

- **Karakter Temelli yöntemler**

Maximum Likelihood

Maximum Parsimony

- **Mesafe Temelli Yöntemler**

Neighbour-Joining

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

1.8. Filogenetik Network (Ağ)

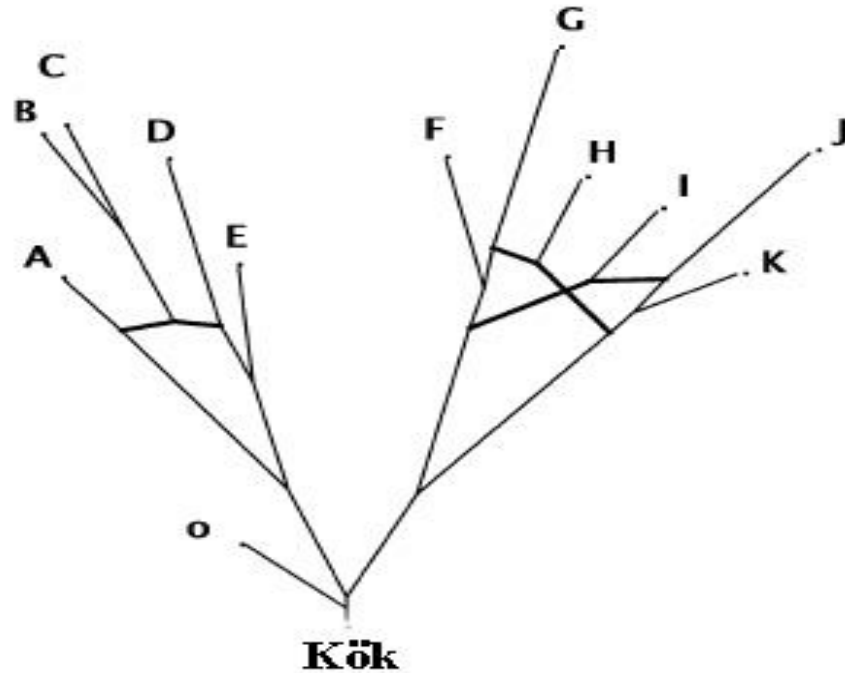
Bilinen evrim modeli bir ağaç farzedilir, bu model hipotezlerin test edilmesi ve tartışılmasını büyük ölçüde kolaylaştırır. Ancak, böyle modeller de daha karmaşık evrimsel senaryoları tanımlamada yetersiz kalabiliyor, hatta evrim süreci ağaca benzer bir modelde olduğunda bile. Oysa verinin incelenmesi ve özelliklerinin değerlendirilmesi için görselleştirme önemli bir ilk adım olabilir. Bu konuların tanımlanması birçok değişik tipte filogenetik ağların (networks) geliştirilmesine yol açmıştır.

Filogenetik ağaç terimi çoğunlukla, bir dizi taksonun evrimsel tarihini temsil eden yaprak etiketli, muhtemelen dal uzunluklu, köklü ya da köksüz bir ağaç olarak tanımlanır.

Filogenetik ağ kavramı, daha az tanımlanmıştır ve bu terimin farklı kullanımları mevcuttur. Filogenetik ağ, taksonların nodlarla, evrimsel ilişkilerinin kenarlarla gösterildiği modeldir (filogenetik ağaçlarda, kenarlar dallara tekâmül eder). Bu genel

başlık altında, networkün birçok farklı tiplere ayrımı yapılabilir. Bunun bir tipi filogenetik ağaçlardır. İkinci bir tip “bölünmüş ağ”dır (split network) ve filogenetik ağaçların kombinatoryal (katışımsal) genellemesi halinde elde edilir ve veri setlerinin içinde ve aralarında var olan uyumsuzlukları sunmak için tasarlanmıştır. Üçüncü tür “retikülat ağ” melezleşme, horizontal gen transferi ya da rekombinasyon gibi retikülat olayların varlığında evrimsel tarihleri sunar. Networkün birkaç ek tipi daha vardır [95]. Örneğin, gen dublikasyonu ya da kayıp filogenileri ya da parazit ve konakçının birlikte evrimini sunmak için [96-97]. Filogenetik ağ oluşturmak için diğer yaklaşımlar; “istatistiksel parsimoni”[98], “ağ yapma” metodu [99], ve bir ağaca “kısa kenarlar” eklemekten oluşan bir metodu [100] içerir.

Retikülat network, evrimsel tarihin “açık” bir sunumunu sağlar, genellikle ek kenarları olan bir filogenetik ağaç olarak tasvir edilir. Böyle bir ağdaki internal nodlar atasal türleri ve nodlar melezleşme ya da rekombinasyon gibi ikiden fazla ebeveynin karıştığı retikülat olayları temsil eder. Şekil 1.5 incelendiğinde {B,C} kladı, A ve B taksonlarına öncülük eden soy çizgileri arasındaki bir retikülatasyondan meydana gelirken, H veya I taksonu ise G ve {J,K} veya {F,G} ve J ye öncülük eden soy çizgileri arasındaki bir retikülatasyondan meydana gelmiştir [101].



Şekil 1.5. {B,C}, {H} ve {I} olmak üzere üç retikülat olayı (iki ağacın birleştirilmesiyle oluşturulmuş) gösteren bir retikülat network gösterimi [100]

Split network, bir veri setindeki uyumsuz ve belirsiz sinyalleri temsil etmede kullanılır. Böyle bir networkte, bu veri setinden hesaplanmış bölünmeleri (split) temsil etmek için tekli dallar yerine paralel kenarlar (kutular) kullanılır. Uyumsuz bölünmeleri yerleştirebilmek için çoğu zaman split networkün atasal türleri temsil etmeyen nodları içermesi gerekmektedir. Bu nedenle, split network evrimsel tarihin sadece “gizli” temsilini sağlar.

Evrimin bu açık ve gizli temsili arasındaki ayrım önemlidir ve geçmişte her zaman net bir şekilde yapılmamıştır [102].

2. BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan bitki materyalleri Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda korunan, Doç. Dr. Mehmet Yaşar DADANDI tarafından çeşitli lokalitelerden toplanıp kurutulmuş bitki örneklerinden elde edilmiştir (Tablo 2.1). Araştırmada kullanılan *Phlomis* taksonları ve bir dış grup örneği şunlardır;

Phlomis x alanyensis Hub.-Mor. (*P. leucophrachta* P. H. Davis & Hub.-Mor. x *lunariifolia* Sm.), *P. x bornmuelleri* Rech. f. (*P. armeniaca* Wild. x *nissolii* L.), *P. x cilicica* Hub.-Mor. (*P. lunariifolia* Sm. x *monocephala* P. H. Davis), *P. x kalanensis* Hub.-Mor. (*P. linearis* Boissieu & Balansa x *oppositiflora* Boissieu & Hausskn.), *P. x ketenoglui* Dadandi & H. Duman (*P. capitata* Boissieu x *nissolii* L.), *P. x melitenensis* Hub.-Mor. (*P. kurdica* Rech. f. x *oppositiflora* Boissieu & Hausskn.), *P. x mobullensis* Hub.-Mor. (*P. bourgaei* Boissieu x *grandiflora* H. S. Thomps), *P. x ozhatayii* Dadandi & H. Duman. (*P. kurdica* Rech. f. x *capitata* Boissieu), *P. physocalyx* Hub.-Mor. x *oppositiflora* Boissieu & Hausskn., *P. pungens* var *hispida* Hub.-Mor., *P. x termessi* P. H. Davis (*P. lycia* D. Don x *bourgaei* Boisseu), *P. x turcica* Dadandi & H. Duman (*P. armeniaca* Wild. x *linearis* Boissieu & Balansa), *P. x vuralii* Dadandi (*P. bourgaei* Boissieu x *chimera* Boissieu), *Marrubium parviflorum* Fisch. & CA Mey.

Tablo 2.1. Bitki materyallerinin örnek numarası, örnek adı ve lokalite bilgileri

	Örnek Numarası (MYD)	Örnek Adı	Lokalite
1	1201	<i>P. linearis x oppositiflora</i>	Tunceli; Hozat-Pertek ~13. Km, Rakım 1390 m
2	1226	<i>P. lunariifolia x monocephala</i>	İçel; Aydınçık-Gülnar 13. Km, Rakım 300 m
3	1257	<i>P. armeniaca x nissolii</i>	Burdur; Gölhisar-Çavdar 15. Km, Rakım 1050 m
4	1262	<i>P. lycia x bourgaei</i>	Muğla; Akkaya-Muğla 5. Km, Rakım 740 m
5	1272	<i>P. bourgaei</i>	Muğla; Muğla-Kale 31. Km, Rakım 970 m
6	1274	<i>P. bourgaei x grandiflora</i>	Muğla; Muğla-Kale 31. Km, Rakım 970 m
7	1278	<i>P. grandiflora</i>	Muğla; Muğla-Kale 52. Km, Rakım 950 – 1000 m
8	1280	<i>P. lycia</i>	Muğla; Muğla-Kale 52. Km, Rakım 950 – 1000 m
9	1334	<i>P. capitata</i>	Sivas; Gürün-Sivas 24. Km, Rakım 1850 m
10	1335	<i>P. linearis</i>	Sivas; Gürün-Sivas 24. Km, Rakım 1850 m
11	1363	<i>P. linearis</i>	Kayseri; Develi-Kayseri ~ 8-9 Km, Rakım 1720 m
12	1367	<i>P. armeniaca x linearis</i>	Kayseri; Develi-Kayseri ~ 8-9 Km, Rakım 1720 m
13	1371	<i>P. armeniaca</i>	Kayseri; Develi-Kayseri ~ 8-9 Km, Rakım 1720 m
14	1382	<i>P. capitata x nissolii</i>	Kayseri; Yahyalı-Maden Yolu ~ 8 km Rakım 1550 - 1600 m
15	1504	<i>P. lycia x bourgaei</i>	Muğla; Marmaris, Karacaköy-Ovacık Mahallesi N 36.55.989 E 28.14.115, Rakım 234 m
16	1508	<i>P. lycia</i>	Muğla; Marmaris, Bozburun – Serçelimanı N 36.34.903 E 28.03.052, Rakım 71 m
17	1522	<i>P. chimera</i>	Antalya; Kemer-Ağva Deresi N 36.34.364 E 30.33.029, Rakım 32 m
18	1524	<i>P. bourgai x chimera</i>	Antalya; Kemer-Ağva Deresi N 36.34.364 E 30.33.029, Rakım 32 m
19	1526	<i>P. lunariifolia</i>	Antalya; Alanya Kalesi civarı N 36.32.132 E 31.59.653, Rakım 145 m
20	1527	<i>P. leucophracta</i>	Antalya; Alanya Kalesi civarı N 36.32.132 E 31.59.653, Rakım 145 m
21	1529	<i>P. leucophracta x lunariifolia</i>	Antalya; Alanya Kalesi civarı N 36.32.132 E 31.59.653, Rakım 145 m
22	1530	<i>P. lunariifolia x monocephala</i>	Antalya; Alanya Kalesi civarı N 36.32.132 E 31.59.653, Rakım 145 m
23	1538	<i>P. monocephala</i>	İçel; Aydınçık-Gülnar 13. Km Rakım 537 m
24	1541	<i>P. lunariifolia x monocephala</i>	İçel; Aydınçık-Gülnar 13. Km Rakım 537 m
25	1564	<i>P. kurdica</i>	Kahramanmaraş; Narlı-Gişeler N 37.19.695 E 37.08.889, Rakım 650 m
26	1600	<i>P. kurdica x capitata</i>	Malatya; Venk Köyü N 38.20.167 E 38.22.659, Rakım 1230 m
27	1602	<i>P. kurdica</i>	Malatya; Venk Köyü N 38.20.167 E 38.22.659, Rakım 1230 m
28	1676	<i>P. bourgai x chimera</i>	Antalya; Kemer-Ağva Çayı ~5 Km Rakım 60 m
29	1677	<i>P. chimera</i>	Antalya; Kemer-Ağva Çayı ~5 Km Rakım 60 m
30	1689	<i>P. capitata</i>	Kayseri; Yahyalı-Maden Yolu Rakım 1428 m
31	1694	<i>P. capitata x nissolii</i>	Kayseri; Yahyalı-Maden Yolu Rakım 1428 m
32	1739	<i>P. nissolii</i>	Kahramanmaraş; Otoyol Çıkışı-Narlı 4. Km Rakım 600 m
33	1750	<i>P. capitata</i>	Gaziantep; Sof Dağı N 37.08.043 E 37.08.430, Rakım 1450 m
34	1926	<i>P. nissolii</i>	Kayseri; Yahyalı Maden Yolu N 38.01.513 E 35.30.833, Rakım 1198 m

Tablo 2.1'in devamı

35	1927	<i>P. pungens</i> var <i>hispida</i>	Kayseri; Yahyalı Maden Yolu N 38.01.513 E 35.30.833, Rakım 1198 m
36	1932	<i>P. nissolii</i>	Kayseri; Zamnatı Köprüsü-Kayseri 11. Km Rakım 1517 m
37	1958	<i>P. physocalyx</i> x <i>oppositiflora</i>	Sivas; Gürün-Pınarbaşı 24. Km Rakım 1644 m
38	1961	<i>P. oppositiflora</i>	Sivas; Gürün-Pınarbaşı 24. Km Rakım 1644 m
39	1962	<i>P. physocalyx</i>	Sivas; Gürün-Pınarbaşı 24. Km Rakım 1644 m
40	1984	<i>P. capitata</i>	Malatya; Venk Köyü N 38.20.163 E 38.22.093, Rakım 1206 m
41	1985	<i>P. kurdica</i> x <i>oppositiflora</i>	Malatya; Venk Köyü N 38.20.163 E 38.22.093, Rakım 1206 m
42	1988	<i>P. kurdica</i>	Malatya; Venk Köyü N 38.20.163 E 38.22.093, Rakım 1206 m
43	1989	<i>P. kurdica</i>	Malatya; Venk Köyü N 38.20.163 E 38.22.093, Rakım 1206 m
44	1935	<i>Marrubium Parviflorum</i>	Kayseri; Bünyan, Köprübaşı-Elbaşı arası Rakım 1440 m

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

2.1.2.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler aşağıdaki Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Kullanılan Kimyasallar	Miktar ve İçerik
CTAB	%2 100 mM Tris 20 mM EDTA 1.4 M NaCl ve pH : 8
CTAB Tamponu	CTAB; %2' lik 650 µl, Askorbik asit; %20' lik, 30 µl Sodyum Bisülfid; %20' lik, 60 µl β-merkaptoetanol; %100' lük, 6 µl ProteinazK 1mg/ml, 60 µl PVP; %20' lik, 30 µl
Askorbik Asit	%20 2 g/10 ml
Sodyum bisülfid	%20 2 g/ 10 ml
ProteinazK çözeltisi	1 mg/ml
β-merkaptoetanol	Saf

Tablo 2.2.'nin devamı

Kloroform – izoamil alkol	24:1
Rnaz A çözeltisi	10 mg/ml
İzopropanol	2:3
% 70' lik alkol	DNA'nın yıkanmasında
% 95' lik alkol	DNA'nın yıkanmasında
Tris-EDTA Tamponu	1x 10 mM Tris 1 mM EDTA (pH: 8)

2.1.2.2. PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Kullanılan Kimyasallar	Miktar ve İçerik
Taq DNA polimeraz	2.5 u/ml, 0.42 µl
Buffer	3.5 µl
Dntp	1000 µM, 2,1 µl
MgCl₂	25 mM, 2,1 µl
Primer 1	1 µM, 0,4 µl
Primer 2	1 µM, 0,4 µl
dH₂O	19.38 µl
Mineral Yağ	Bir damla

2.1.2.3. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

Kullanılan Kimyasallar	Miktar ve İçerik
Agaroz Jel	%1 1 g Agaroz 100 ml TBE
TBE (Tris, Borat, EDTA)	1X pH: 8 21.8 g Tris 1.17 g EDTA 21-21.5 g Borik Asit
DNA ladder	500 ng/μl
Etidyum Bromür çözeltisi	5 mg/ml
Yükleme Boyası	6X

2.1.3. Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler, baz dizileri, % G+C içerikleri, T_m sıcaklıkları Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5. *trnT-trnL* bölgesini amplifiye etmede kullanılan primerler (a ve b)

Primer Adı	Baz Dizisi (5'-3')	% G+C içerikleri	T _m Sıcaklığı (°C)
A (<i>trnT</i> ugu F)	CATTACAAATGCGATGCTCT	40	60.3
B (5' <i>trnL</i> uaa R)	TCTACCGATTTCGCCATATC	45	61.4

2.2. Metot

Bu çalışmada, 15 *Phlomis* türü ve 12 farklı *Phlomis* melezi ve bir dış grup olarak *Marrubium parviflorum* dâhil toplam 46 örnek, morfolojik karakterlerin ölçümü ve cpDNA markır yöntemiyle morfolojik ve moleküler yönden incelenmiştir.

2.2.1. Morfolojik İncelemeler

Mehmet Yaşar DADANDI'nın Türkiye'nin farklı lokalitelerinden toplamış olduğu 15 *Phlomis* türü ve 12 *Phlomis* melezi, bitki boyu, vertisillat sayısı, çiçek, vertisillatlar arası uzunluk, taban, gövde ve çiçek yapraklarında bulunan braktelerin boyları, enleri, sap uzunlukları, kaliks, kaliks dişleri gibi 23 karakter esas kabul edilerek incelemeler yapılmıştır. Herhangi bir nedenle bir veya daha fazla yapısı eksik olan örneğin o özelliği değerlendirmeye alınmamıştır. Çalışmadaki örneklerin ve morfolojik karakterlerin sayıca çokluğu göz önüne alınarak tabloların tek sayfada gözlenebilmesi için morfolojik karakterler harflerle Tablo 2.6'daki gibi kodlanmıştır. Örneklerin morfolojik veri sonuçları Ek 1'de verilmiştir.

Tablo 2.6. Morfolojik karakterler ve kodlamaları

Kod	Karakter
A	Bitki boyu (cm)
B	Vertisillat sayısı
C	Vertisillatlar arası uzunluk
G	Taban yaprağı boyu minimum (cm)
H	Taban yaprağı boyu maksimum (cm)
I	Taban yaprağı eni minimum (cm)
J	Taban yaprağı eni maksimum (cm)
K	Taban yaprağı petiyol uzunluğu maksimum (cm)
L	Gövde yaprağı boyu minimum (cm)
M	Gövde yaprağı boyu maksimum (cm)
N	Gövde yaprağı eni minimum (cm)
O	Gövde yaprağı eni maksimum (cm)
P	Gövde yaprağı petiyol uzunluğu maksimum (cm)
Q	Çiçek yaprağı boyu minimum (cm)
R	Çiçek yaprağı boyu maksimum (cm)
S	Çiçek yaprağı eni minimum (cm)
T	Çiçek yaprağı eni maksimum (cm)
U	Çiçek yaprağı petiyol uzunluğu maksimum (cm)
V	Kaliks uzunluğu (cm)
W	Kaliks eni (cm)
X	Kaliks dişlerinin uzunluğu minimum (cm)
V	Brakteol uzunluğu (cm)
Z	Korolla uzunluğu (cm)

Elde edilen morfolojik veriler NTSYS ve Splittree4 programlarında değerlendirilerek Manhattan mesafe değerleri (Manhat) üzerine neighbour-network ve neighbour-joining ağaçları oluşturulmuştur. Elde edilen morfolojik bulgular, moleküler bulgularla karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

2.2.2. Moleküler İncelemeler

Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumundan temin edilen bitki örneklerinin yapraklarından DNA izolasyonu yapılmış, *trnT-trnL* bölgesi PCR ile çoğaltılmış, amplifiye edilmiş örneklerin hizmet alımı ile DNA dizileri elde edilmiş, bu diziler FinchTv programında görüntülenmiş, CodonCode Alligner [103], MEGA6 [104], DnaSp v 5.10.01 [105] ve Splitstree4 [101], programlarında istatistiksel olarak analiz edilerek yorumlanmıştır.

2.2.2.1. DNA İzolasyonu

Herbaryumdan temin edilen, her bir türe ve meleze ait bitki yaprakları porselen havanda sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilmiştir. Ezilen bitki örneklerinin yaprakları etiketlenmiş tüpler içerisinde -20°C'de muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonu toz hale getirilmiş bu materyallerden Yüzbaşıoğlu ve Dadandı'da belirtildiği şekilde yapılmıştır [35].

Genomik DNA izolasyonu protokolü:

1.5 µl'lik eppendorf tüplerde Tablo 2.2'de belirtilen CTAB tampon hazırlanmış, üzerine 40 µg ezilmiş bitki örneği eklenmiştir. Karışımın homojen olarak dağılması için tüpler sallanmış ve önceden 60°C'de hazırlanmış su banyosuna konulmuştur. Tüpler 15 dakikada bir ters düz edilerek 45 dk su banyosunda tutulmuştur. Üzerlerine 24/1 Kloroform izoamil alkol karışımının 2/3'ü oranında eklenmiş ve tüpler 50 defa ters düz edilmiştir. Kırılmış buz üzerinde 10–30 dk bekletilen tüpler ardından 14000 devirde +4°C'de 6 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant kısmı alınmış, üzerlerine tekrar kloroform eklendikten sonra tekrardan buz üzerinde 10–30 dk bekletilmiştir. Tüpler tekrar santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı alınmıştır. Üzerlerine 5–6 µl RNAaz eklenmiş ve tüpler enzimin tüp içerisinde dağılması için bir kaç kez nazikçe sallandıktan sonra 37.5°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Sıcak su banyosundan alınan tüplerin üzerine 2/3 oranında izopranoal eklenmiş, tüpler 4–5 defa

sallanıp +4°C’de gece boyu bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından tüpler 14000 devirde 2 dk +4°C’de tutulmuştur. Tüplerin diplerinde kümelenmiş DNA yığınlarına dikkat edilerek süpernatant dökülmüş, tüplerin üzerine %70’lik alkol konulup tüpler ters çevirilerek iyice temizlenerek yıkanmıştır. Tüplerin üzerine yine aynı şekilde %70’lik alkol eklenmiş ve yarım saat bekletilmiştir. Yarım saat sonunda bu işlem %95’lik alkolle tekrarlanmıştır. Son yıkaması tamamlanan tüpler oda sıcaklığında تنها bir ortamda bir gece kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan DNA’ların üzerine 160µl (tüplerin dibinde birikmiş DNA miktarına göre bu miktar artırılmış ya da azaltılmıştır) 1X TrisEDTA solüsyonu eklenmiş ve çözünmeye bırakılmıştır.

Çözünme işlemi tamamlandığında izole edilen DNA’ların %0.8’lik agaroz jelde yoğunluk ve bütünlüğü gözlemlenmiş, örnekler bir sonraki işlem için +4°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.2.2. Primer Seçimi

Bu çalışma kapsamında, kloroplast DNA bölgesine yönelik ikisi farklı markalara ait aynı bölge olmak üzere (*trnT-trnL*) 6 çift cpDNA primeri (*trnT-trnL*, *trnL-trnL*, *trnL-trnF*, *trnH-psbA*, *atpB-rbcL*) ve çekirdek DNA’sına yönelik 2 çift ITS (ITS1 –ITS2, ITS3-ITS4) primeriyle polimeraz zincir reaksiyonları kurulmuştur. Başarı yakalanan Sigma firmasına ait *trnT-trnL* (a ve b) primer çifti ile çalışmanın sonraki aşamalarına geçilmiştir.

2.2.2.3. Kloroplast DNA’sının *trnT-trnL* Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının iyi bir şekilde gerçekleşmesi ve iyi bir PCR ürünü elde etmek için gerekli bileşenlerin konsantrasyonları ve PCR basamaklarının sıcaklık değerleri optimize edilmiştir. Reaksiyonlar 0.2 ml’lik ependorf tüplerinde son hacim 35 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Her PCR reaksiyonu için 1 adet negatif kontrol (genomik DNA içermeyen kontrol reaksiyon tüpü) kullanılarak amplifikasyon kontrolü sağlanmıştır. Denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları 35 döngü halinde uygulanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun meydana geldiği sıcaklık değerleri Tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.7. PCR reaksiyonlarının gerçekleştiği sıcaklık ve süre değerleri

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Ön denatürasyon	80	5
Denatürasyon	94	1
Bağlanma	53-58	1
Uzama	72	3
Son uzama	72	10
Bekleme	4	-

2.2.2.4. PCR Ürünlerinin Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için PCR ürünleri DNA %1'lik agaroz jelde, 80V'da 45 dakika yürütülmüştür. Jeller UV altında incelendikten sonra görüntüleme sisteminde fotoğraflanmıştır. DNA markırına göre 700 bp civarında tek bant veren örneklerin amplifikasyonu tamamlanmış olup bir sonraki aşamaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Amplifikasyonu gerçekleşmeyen ürünler için PCR işlemi gerçekleşinceye kadar tekrar edilmiştir.

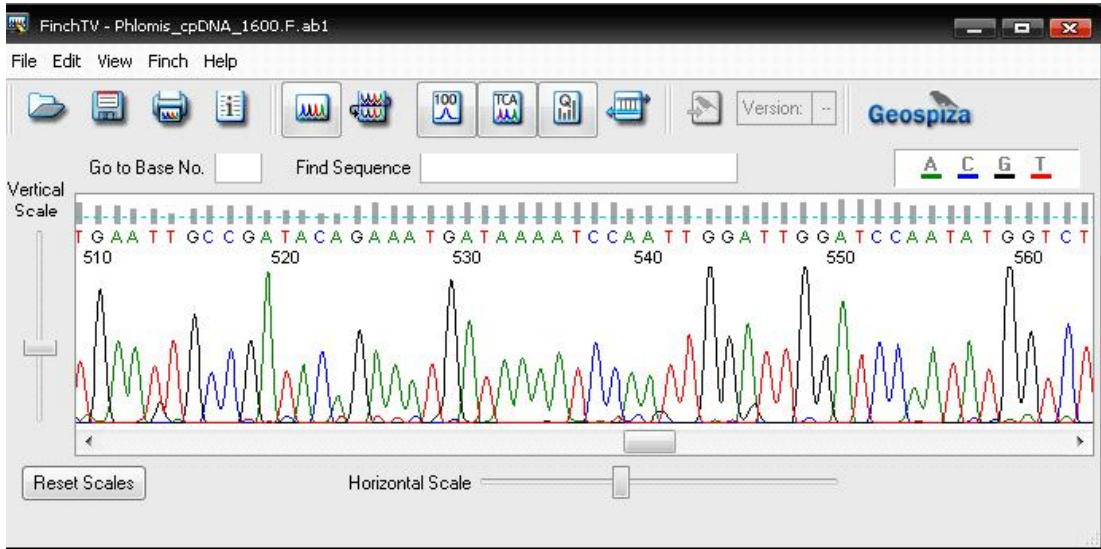
2.2.2.5. Kloroplast DNA'sının *trnT-trnL* Bölgesinin Dizi Analizi

Amplifikasyonu sağlanan ve uygun koşullarda muhafaza edilen örnekler hizmet alımı yoluyla DNA dizi analizi için uygun bir biçimde RefGen (ODTÜ-Teknopark, Ankara) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Her bir örnek için çift yönlü dizi analizi, otomatik DNA dizi analizi sisteminde (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Bu hizmet; PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizileme reaksiyonları, dizileme ürünlerinin saflaştırılması ve poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla dizileme ürünlerinin kromatogramlar haline getirilmesini kapsamaktadır.

2.2.3. İstatistiksel Analiz

2.2.3.1. Dizilerin İşlenmesi

Refgen firmasından *AB1 Prism* formatında alınan sekans verileri, internetten ücretsiz olarak indirilebilen FinchTV programı ile görüntülenmiş ve piklerin büyüklüğü, kromotogramın temizliği ve dizilerin baz kalitesi incelenmiştir.



Şekil 2.1. Dizi analizi sonuçlarının FinchTV programı ile görüntülenmesi (cpDNA 1600F.abi görüntüsü)

Bu işlemin ardından örneklerin isimleri uygun şekilde düzenlenerek CodonCode Aligner Programına yüklenmiştir. DNA analizi, PCR reaksiyonları ya da dizileme reaksiyonlarında atası/ataları kaybedilen örnekler analizin sağlığı açısından çıkarılmıştır. Kromatogramlar, sekans başlangıcı ve bitişinde düşük kaliteli diziler içerirler. Programın, dizilerin kalite değerine göre sonlardaki bazıları kestiği “end clipping” özelliği kullanılarak otomatik olarak kesilmiştir. Bu kesim işleminde Phred20 ve maksimize edilecek bölgelerin hata oranı 0,1 altı tercih edilmiştir.

Kesim işleminden önce, programın da önerdiği gibi “heterozigot indel” araması yapılmış ve program 1568 R dizisinde 643–905 bazıları arasının heterozigot indel olma ihtimali olduğunu belirlemiştir (Skor: 25 (p: 18 baz; q=12) (b:18 baz; q=14)). Program bu bölgeleri kesmeden bırakıyor. Kesim işleminde 3’ den 65 ve 5’den 23 baz kesilmiş ve kesim öncesinde 777 baz olan ortalama uzunluk kesim sonrasında ortalama 688 baza düşmüştür.

Kesim işlemin ardından, örneklerin ileri ve geri dizilerinin birleştirilip ortak dizilerinin oluşturulması için program vasıtasıyla birleştirilmiştir. Ortak karar (consensus) dizilerinin oluşturulmasından sonra kontigler tek tek kontrol edilmiş, yön açısından (ileri (forward) ve geri (reverse)) sorunlu olan örnekler “reverse complement” özelliği ile doğru yönle çevrilmiştir. Her bir örneğin ileri ve geri dizileri arasındaki uyum ve uyumsuzluklar kromatogramlar üzerinde incelenmiş, cihazın yanlış okumuş olduğu bazı

bazlar, kromatogramdaki piklerin büyüklüğüne ve temizliğine bakılarak el ile düzeltilmiştir. Pikleri zayıf ve çok karmaşık olan veriler değerlendirmeden çıkarılarak değerlendirmeye alınmamıştır.

2.2.3.2. BLAST Analizi

CodonCode programında otomatik olarak sonları kesilen el ile düzeltilmemiş veriler, çevrimiçi BLAST programında hizalamak için uygun formata dönüştürülmüştür. .fasta formatındaki bu veriler her bir örnek için ileri ve geri diziler tek tek girilerek birleştirilip ortak dizi oluşturulmuştur. Her bir örnek tek tek uygun formatta kaydedilmiştir. Her bir örneğin ileri ve geri dizilerinin birleştirilmesi için programın verdiği değerler göz önünde bulundurularak yeterli kalitede baz dizisine sahip olmayan örnekler çıkarılmıştır.

2.2.3.3. Dizilerin Hizalanması

CodonCode Programında elde edilen diziler uygun formata dönüştürülerek MEGA programına aktarılmıştır. Burada örneklerin isimleri filogenetik analize uygun hale getirilmiştir. Örnekler bu program içerisindeki hizalama programlarından MUSCLE ile varsayılan (Gap open: -400; gap extend 0; clustering methods: UPGMB, Min Diag Lenght (lambda): 24) ayarlar ile hizalanmıştır. Hizalanan veriler bir sonraki aşama için uygun formata dönüştürülerek kaydedilmiştir.

Elde edilen karşılaştırılmış kontigler bir sonraki basamakta kullanılmıştır.

2.2.3.4. Filogenetik Analiz

2.2.3.4.1. Model Analizleri

Hizalanıp uygun formatta kaydedilen verilerin MEGA6 programında model analizleri yapılmıştır. Bu analizler, tahmini yer değiştirme matriksi (Estimate Substitution Matrix (ML)), MCL yer değiştirme matriksi hesaplaması (compute MCL substitution Matrix), MCL transisyon/transversiyon sapmasının hesaplanması (compute MCL transition/transversion Bias) ve nükleotid kompozisyonlarının (compute nucleotide composition) hesaplanmasını kapsamaktadır.

Sübstitüsyon örnekleri ve oranları Kimura 2-parametre modeline göre tahmin edilmiştir [106]. Program kolaylık için, r değerlerinin toplamı 100'e eşitlenmiştir ve nükleotit frekansları A=%25, T/U=%25, C=%25 ve G=%25'dir. ML değerleri tahmin edilirken program, bir ağaç topolojisinin otomatik olarak hesaplamıştır. Bu hesaplamada maximum log likelihood verisinin -1461.011 olduğunu belirtilmiştir. Analiz 46 nükleotit sekansını kapsıyor. Kayıp veri ya da boşluk içeren bütün pozisyonlar elemine edilmiştir. Son veri setinde toplam 617 pozisyon bulunmaktadır.

Tahmin analizlerinde kullanılan metod Kimura-2 parametre modeli olmuştur ve boşluklar/kayıp veri tamamen silinerek neighbour-joining ağacı oluşturulmuştur. İstatiksel metod olarak maximum likelihood kullanılmıştır.

Hesaplamalarda istatistiksel metod maximum composite likelihood ve Tamura–Nei model seçilmiştir. Boşluklar ve kayıp veri tamamen silinmiştir.

2.2.3.4.2 İkili Uzaklık Analizi

Hizalanıp uygun formatta kaydedilen verilerde MEGA6 programı kullanılarak ikili uzaklık analizi yapılmıştır. Bu analizde Kimura-2 parametre modeli kullanılmış, transisyon ve transversiyonlar dâhil edilmiş ve boşluklar/kayıp veri tamamen silinmiştir.

2.2.3.4.3 Maximum Likelihood Analizi

Veriler MEGA6 programına aktarılmış ve maximum likelihood analizi ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu analizde, Kimura-2 parametre modeli kullanılmış ve filogeni bootstrap metodu (1000 replicate) ile test edilmiştir.

Boşluklar/kayıp veriler tamamen silinmiştir.

2.2.3.4.4 Maximum Parsimoni Analizi

Veriler MEGA6 programına aktarılmış ve maximum parsimony analizi ile filogenetik ağaç oluşturulmuş ve filogeni bootstrap metodu (1000 replicate) ile test edilmiştir.

Boşluklar/kayıp veriler tamamen silinmiştir.

2.2.3.4.5 UPGMA Analizi (Unweighted Pair Method Using Arithmetic Average)– Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Eşleştirilmiş Grup Metodu

Veriler MEGA6 programına aktarılmış ve UPGMA analizi ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu analizde Kimura-2 parametre modeli kullanılmış, transisyon ve transversiyonlar dâhil edilmiş ve filogeni bootstrap metodu (1000 replicate) test edilmiştir.

Boşluklar/kayıp veriler tamamen silinmiştir.

2.2.3.4.6. Neighbour-Joining Analizi

Veriler MEGA6 programına aktarılmış ve neighbour joining analizi ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu analizde, Kimura-2 parametre modeli kullanılmış, transisyon ve transversiyonlar dâhil edilmiş, filogeni bootstrap metodu (1000 replicate) test edilmiştir.

Boşluklar/kayıp veriler tamamen silinmiştir.

2.2.3.5 Network Analizi

Hizalanmış veriler Splitstree4 programına aktarılarak neighbour-net ve median-joining analizleri yapılmıştır.

Neighbour-net analizinde uzaklık modeli K2P seçilmiştir. Analiz sonuçları iki şekil halinde verilmiştir. Birinci şekilde grafik bütünüyle yer alırken, verilen ikinci şekilde grubu daha yakından incelemek için şekil yakınlaştırılmıştır. Yakınlaştırılmış grafik aktarılırken dış grubun yer aldığı dal kesilmiş ve üzeri etiketlenmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Morfolojik Bulgular

Türkiye'nin farklı lokalitelerinden toplanmış 12 farklı *Phlomis* melezi ve 15 farklı *Phlomis* türü, toplamda ise 46 örnekte 23 karakterde morfolojik ölçümler yapılmış ve bu ölçümlerin sonucu Ek 1'de verilmiştir. Bu verilerin NTYS ve Splitstree4 programlarında analizi sonucunda Manhattan mesafesi (Manhattan distance) değerlerinde dayalı phylogram ağacı ve neighbour network oluşturulmuştur (Şekil 3.1; 3.2.)

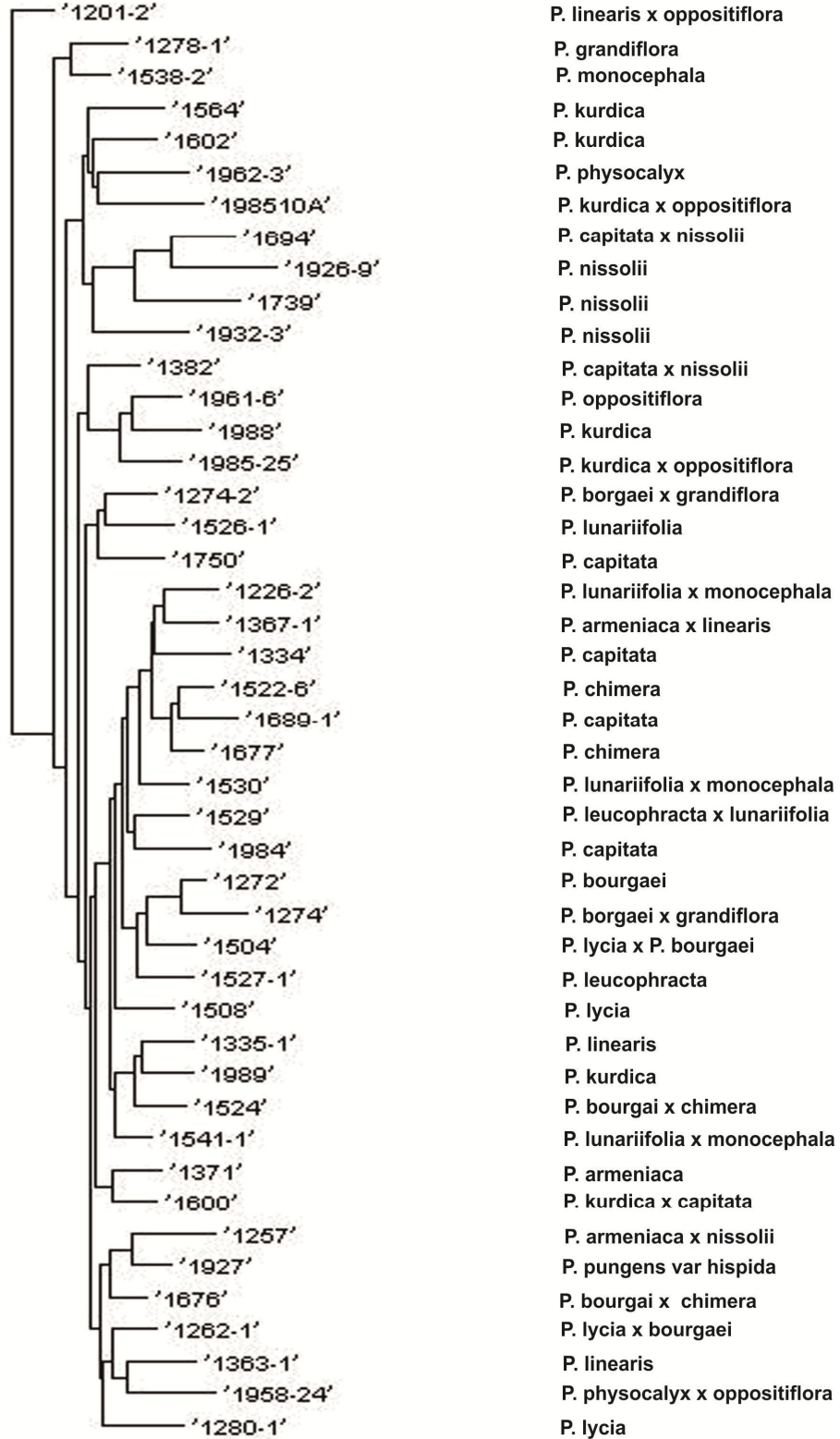
Morfolojik karakterlere dayalı olarak hesaplanan Manhattan mesafeleri değerleri üzerine kurulan phylogram ağacı incelendiğinde birden fazla örneği olan türlerden *P. kurdica*, *P. capitata*, *P. lycia*, *P. linearis* ve *P. chimerae* örnekleri türlerine özgün bir şekilde gruplanmazken, *P. oppositiflora* ve *P. nissolii* türleri nin örnekleri ise kardeş takson olacak şekilde türlerine özgün gruplanmışlardır (Şekil 3.1). Araştırmada kullanılan *Phlomis* türleri phylogram ağacına göre 2 ana grupta toplanabilir. Birinci ana grupta *Gymnophlomis* alt seksiyonuna giren bazı türler (1564 ve 1602 kodlu *P. kurdica*, 1962-3 kodlu *P. physocalyx*, 1926-9, 1739 ve 1932-3 kodlu *P. nissolii*, 1961-6 ve 1988 kodlu *P. oppositiflora*, 1750 kodlu *P. capitata*) ve *Dendrophlomis* alt seksiyonuna giren bazı türler (1278-1 kodlu *P. grandiflora*, 1538-2 kodlu *P. monocephala*, 1526-1 kodlu *P. lunariifolia*) bir arada kümelenirken ikinci ana grup ta ise *Oxyphlomis*'in tek örneği olan 1927 kodlu *P. pungens*, *Gymnophlomis*'in bazı örnekleri (1367-1 kodlu *P. armeniaca*, 1334, 1689-1 ve 1984 kodlu *P. capitata*, 1335-1 ve 1363-1 kodlu *P. linearis*, 1989 kodlu *P. kurdica*) ve *Dendrophlomis* alt seksiyonuna giren bazı türler (1522-6 ve 1677 kodlu *P. chimerae*, 1272 kodlu *P. bourgaei*, 1527-1 kodlu *P. leucophracta*, 1508 ve 1280-1 kodlu *P. lycia*) yer almaktadır (Şekil 3.1). Fakat bu gruplanma Bentham'ın [108] yaptığı gruplanma olan ve *Phlomis* seksiyonunu *Oxyphlomis* (pembe–mor çiçekli ve

otsu bitkiler; *P. pungens*), *Gymnophlomis* (alt seksiyonu, sarı çiçekli ve otsu; *P. oppositiflora*, *P. armeniaca*, *P. nissolii*, *P. linearis*, *P. physocalyx*, *P. capitata* ve *P. kurdica*) ve *Dendrophlomis* (odunsu; *P. lycia*, *P. grandiflora*, *P. bourgaei*, *P. chimerae*, *P. lunariifolia*, *P. grandiflora*, *P. monocephala*, *P. leucophracta*) olmak üzere 3 alt seksiyona ayıran kümelenmeye tam bir uyum göstermemiştir (Şekil 3.1).

Bu araştırmada morfolojik karakterlerden elde edilen Manhattan mesafesi değerlerine dayalı olarak oluşturulan phylogram ağacında *Phlomis* melezlerinin ebeveynlerine göre yerleşimleri şu kategorilerde toplanabilir: (1) Melez ebeveynleri arasında yerleşmiştir. Bu yerleşme ebeveynlerden biriyle fakat kardeş takson olmayacak şekildedir (sister) (1694 kodlu *P. capitata* x *nissolii*; 1274 kodlu *P. bourgaei* x *grandiflora*). (2) Melez en son türevlenen ataya tabandan bağlanmıştır (1985-25 kodlu *P. kurdica* x *oppositiflora*; 1504 kodlu *P. bourgaei* x *lycia*) (3) Melez en son türevlenen ataya kladistik olarak yakın bir şekilde yerleşmiştir (1985-10A kodlu *P. kurdica* x *oppositiflora*; 1262-1 kodlu *P. bourgaei* x *lycia*). (4) Melez diğer melezler/taksonlarla bir arada gruplanmıştır (1201-2 kodlu *P. oppositiflora* x *linearis*; 1382 kodlu *P. capitata* x *nissolii*; 1274-2 *P. bourgaei* x *grandiflora*; 1600 kodlu *P. capitata* x *kurdica*; 1257 kodlu *P. armeniaca* x *nissolii*; 1524 ve 1676 kodlu *P. bourgaei* x *chimera*; 1226-2 ve 1541-1 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala*; 1371 kodlu *P. armeniaca* x *linearis*; 1958-24 kodlu *P. physocalyx* x *oppositiflora*; 1529 ve 1530 kodlu *P. leucophracta* x *lunariifolia*) (Şekil 3.1).

Morfolojik verilerden elde edilen neighbour network modelinin verilere uyumu oldukça yüksek olup % 98.76'tır (fit=91.20, LSfit= 98.76). Neighbour-network analizi incelendiğinde *Phlomis* türleri 2 grup altında toplanabilir. Birinci grubu *Gymnophlomis* alt seksiyonunun 1932-3, 1739 ve 1926-9 kodlu *P. nissolii*, 1564 ve 1602 kodlu *P. kurdica*, 1962-3 kodlu *P. physocalyx* türleri oluştururken ikinci grubu ise *Gymnophlomis* alt seksiyonunun 1750, 1984, 1689-1 ve 1334 kodlu *P. capitata*, 1367-1 kodlu *P. armeniaca*, 1363-1 ve 1335-1 kodlu *P. linearis*, 1989 kodlu *P. kurdica* ve 1961-6 ve 1988 kodlu *P. oppositiflora* türleri ve *Dendrophlomis* alt seksiyonunun 1526-1 kodlu *P. lunariifolia*, 1508 ve 1280-1 kodlu *P. lycia*, 1527-1 kodlu *P. leucophracta*, 1272 kodlu *P. bourgaei*, 1677 ve 1522-6 kodlu *P. chimerae*, 1538-2 kodlu *P. monocephala*, 1278-1 kodlu *P. grandiflora* türleri ve *Oxyphlomis*'in tek örneği olan *P. pungens* türü oluşturmaktadır. Neighbour-network analizi incelendiğinde *Phlomis* cinsi

gözenmektedir. Bitki türleri arasındaki melezleşme retikülat olaylara sebebiyet veren durumlardan bir tanesidir.

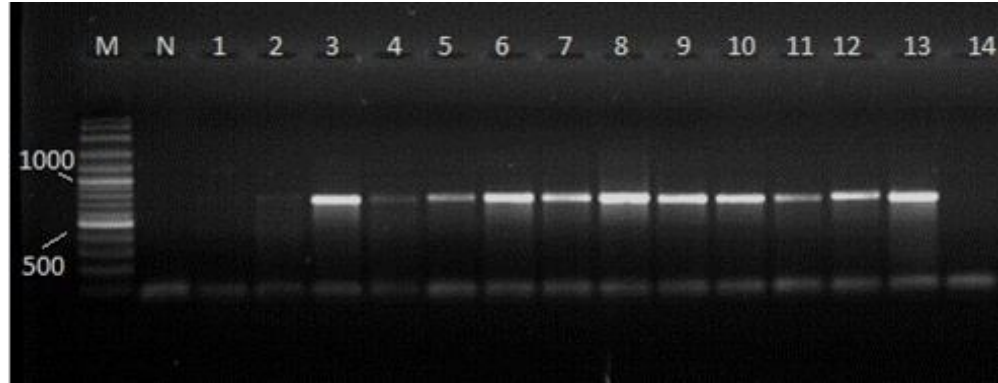


Şekil 3.1. *Phlomis* örneklerine ait morfolojik verilerden elde edilen Manhattan mesafesi değerlerine göre oluşturulmuş phylogram ağacı

3.2. Moleküler Bulgular

3.2.1. *trnT-trnL* Bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzole edilen genomik DNA (gDNA)'lar kullanılarak A ve B primerleri ile örneklerin kloroplast DNA'larının (cpDNA) *trnT-trnL* genlerarası spacer bölgeleri çoğaltılmıştır. Bazı *Phlomis* tür/melezlerine ait bantların agaroz jel görüntüsü Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. *trnT-trnL* bölgesi amplifikasyon sonuçlarının agaroz jelde görüntülenmesi, M: Marker (100 – 3000 bp) N: Negatif kontrol

3.2.2. Dizi Analizi

trnT-trnL bölgesi çoğaltılarak dizi analizine gönderilen örnekler metod kısmında belirtildiği şekilde hazırlanmış ve hizalanmıştır. Hizalanan örnek verileri Ek 3'te verilmiştir.

3.2.3. Örneklerin Baz Oranları ve İçeriği

Örneklerin nükleotit oranları ve içeriği Tablo 3.1'de verilmiştir.

DnaSp v 5.10.01'de yapılan polimorfizm analizinde örneklerin nükleotid çeşitliliği (Nucleotide diversity per site, P_i) 0,01063 olarak belirlenmiş; nükleotid farklılıkları ortalaması (k) ise 6,57005 olarak bulunmuştur. Örneklerin G+C içeriği ise 0,279 (618,00 konum) olarak tespit edilmiştir.

Örneklerde 545 monomorfik; 73 polimorfik (S) bölge belirlenmiş ve bunların 19 tanesinin parsimonik bilgi içerdiği görülmüştür. Toplam mutasyon sayısı (Eta) 76 olarak bulunmuştur.

3.2.4. İkili Uzaklık Analizi

DNA dizi analizine dayalı olarak Kimura2 parametre mesafesine göre örneklerin ikili uzaklık analizi sonucu elde edilen örnekler arası uzaklık matrisi Ek 2'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde en küçük genetik uzaklık değeri 0,002 ve en büyük genetik uzaklık değeri 0.030 olarak bulunmuştur. Tablo incelendiğinde en büyük genetik uzaklık değerlerine (cins içi) sahip tür *P. kurdica*'dır (1602).

Tablo 3.1. Örneklerin nükleotid kompozisyonu

	T(U)	C	A	G	Toplam
<i>P. linearis x oppositiflora</i> MYD 1201	33,4	13,9	37,0	15,6	748,0
<i>P. lunariifolia x monocephala</i> MYD 1226	32,9	15,6	34,8	16,7	742,0
<i>P. armeniaca x nissolii</i> MYD 1257	33,0	15,0	35,8	16,1	731,0
<i>P. lycia x bourgaei</i> MYD 1262	33,5	14,1	36,5	15,9	731,0
<i>P. bourgaei</i> MYD 1272	33,5	14,4	36,2	15,9	735,0
<i>P. bourgaei x grandiflora</i> MYD 1274	33,6	14,1	36,2	16,1	732,0
<i>P. bourgaei x grandiflora</i> MYD 1274-35	33,4	14,5	36,0	16,1	733,0
<i>P. grandiflora</i> MYD 1278-1	33,4	14,2	36,3	16,0	730,0
<i>P. lycia</i> MYD 1280	33,5	14,3	36,3	15,8	732,0
<i>P. capitata</i> MYD 1334	33,7	14,1	36,7	15,6	733,0
<i>P. linearis</i> MYD 1335	33,4	14,0	36,8	15,8	752,0
<i>P. linearis</i> MYD 1363-44	33,6	13,9	37,0	15,5	729,0
<i>P. armeniaca x linearis</i> MYD 1367	33,7	14,2	36,3	15,8	733,0
<i>P. armeniaca</i> MYD 1371	33,7	13,5	37,2	15,6	716,0
<i>P. capitata x nissolii</i> MYD 1382	33,5	15,1	35,3	16,1	734,0
<i>P. bourgaei x lycia</i> MYD 1504	33,4	14,2	36,2	16,2	730,0
<i>P. lycia</i> MYD 1508	33,4	14,4	36,3	15,9	736,0
<i>P. chimera</i> MYD 1522	33,8	14,1	36,3	15,9	731,0
<i>P. bourgaei x chimera</i> MYD 1524	33,7	14,0	36,6	15,6	729,0
<i>P. lunariifolia</i> MYD 1526	33,7	14,7	35,7	15,9	734,0
<i>P. leucophracta</i> MYD 1527	34,2	14,0	35,9	15,9	719,0
<i>P. leucophracta x lunariifolia</i> MYD1529	32,9	15,8	34,9	16,4	742,0
<i>P. leucophracta x lunariifolia</i> MYD 1530	33,7	14,1	36,3	15,9	730,0
<i>P. monocephala</i> MYD 1538	33,3	13,7	34,8	18,2	928,0
<i>P. lunariifolia x monocephala</i> MYD 1541	33,7	14,0	36,4	15,9	729,0
<i>P. kurdica</i> MYD 1564	33,7	15,1	35,6	15,7	728,0
<i>P. kurdica x capitata</i> MYD 1600	33,5	13,9	37,1	15,5	747,0
<i>P. kurdica</i> MYD 1602	33,2	14,5	36,1	16,3	732,0
<i>P. bourgaei x chimera</i> MYD 1676	33,4	14,5	36,3	15,9	731,0
<i>P. chimera</i> MYD 1677	33,6	13,9	36,6	15,8	732,0
<i>P. capitata</i> MYD 1689	33,3	14,1	37,0	15,6	732,0
<i>P. capitata x nissolii</i> MYD 1694	33,5	13,9	36,9	15,6	710,0
<i>P. nissolii</i> MYD 1739	33,7	13,9	36,5	15,8	732,0
<i>P. capitata</i> MYD 1750	33,7	13,8	36,9	15,6	731,0
<i>P. nissolii</i> MYD 1926-6	33,1	14,0	37,4	15,5	749,0
<i>P. nissolii</i> MYD 1932	33,5	14,2	36,3	16,0	731,0
<i>P. physocalyx x oppositiflora</i> MYD 1958-24	33,5	15,4	35,5	15,6	749,0
<i>P. oppositiflora</i> MYD 1961	33,2	14,6	36,4	15,8	749,0
<i>P. physocalyx</i> MYD 1962	33,5	14,3	36,4	15,8	749,0
<i>P. capitata</i> MYD 198416	33,4	14,2	37,0	15,5	749,0
<i>P. kurdica x oppositiflora</i> MYD 1985-10A	33,4	14,5	36,4	15,7	733,0
<i>P. kurdica x oppositiflora</i> MYD 1985-25	33,6	14,2	36,4	15,8	730,0
<i>P. oppositiflora</i> MYD 1988	33,5	15,0	36,2	15,4	749,0
<i>P. kurdica</i> MYD 1989	33,8	14,0	36,5	15,7	734,0
<i>P. pungens</i> MYD 1927-1	33,5	14,0	36,2	16,3	719,0
<i>Marrubium parviflorum</i> MYD 1935-10	33,4	14,1	36,6	15,8	631,0
Ort.	33,5	14,3	36,3	15,9	736,2

3.2.5. Model Analizi

MEGA6 programından elde edilen tahmini nükleotit yerdeğiştirme matriksi Tablo 3.2’de, MCL nükleotit yer değiştirme matriksi tablo 3.3’te verilmiştir.

Her girdi, sütünadaki bir bazın satırdaki bir bazın yerini alma (substitution, r) ihtimalidir [109]. Nükleotitlerin farklı tranzisyonel yerine geçme oranları **kaldn** ve transversiyonel yerine geçmeler ise *eğik* yazı stiliyle gösterilmiştir. Nükleotidlerin transisyon/transversiyon sapması (bias, R) 0,87 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. Maksimum likelihood tahminine dayalı yer değiştirme oranları

	A	T	C	G
A	-	7,98	3,01	5,28
T	8,36	-	9,9	3,34
C	8,36	26,24	-	3,34
G	13,21	7,98	3,01	-

Tablo 3.3. Maximum composite likelihood tahminine dayalı nükleotid yer değiştirme oranları

	A	T	C	G
A	-	6,6784	6,6784	11,6433
T	6,6784	-	11,6433	6,6784
C	6,6784	11,6433	-	6,6784
G	11,6433	6,6784	6,6784	-

Phlomis örneklerinde nükleotid yüzdeleri %36,84 (A), %35,17 (T/U), %13,28 (C) ve %14,71 (G) olarak belirlenmiştir. Nükleotidlerdeki transisyon/transversiyon dönüşüm hız oranı $k_1=1.581$ (pürinler) ve $k_2=3.289$ (pirimidinler) olarak gözlenmiştir. Nükleotidlerdeki toplam transisyon/transversiyon eğilimi ise $R=0,958$ olarak bulunmuştur ($R= [A * G * k_1 + T * C * k_2] / [(A + T) * (T + C)]$).

3.2.6. Maximum Likelihood Analizi

Maximum Likelihood analizi ile oluşturulan bootstrapla test edilmiş ağacın topolojisi şekil 3.4’te verilmiştir.

Maximum likelihood analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde birden fazla örneği olan türlerden *P. kurdica*, *P. capitata*, *P. lycia*, *P. nissolii*, *P. oppositiflora* ve *P. linearis* örnekleri türlerine özgün bir şekilde gruplanmazken, *P. chimerae* türünün örnekleri ise türüne özgün gruplanmıştır (Şekil 3.4).

Maximum likelihood analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde ilk olarak dış grup olan *Marrubium parviflorum*'un ayrıldığı gözlenmektedir. Bundan sonra %62 bootstrap değeri ile *P. monocephala* ve *P. monocephala x lunariifolia* melezi monofiletik grup oluşturarak ayrılmıştır. Bundan sonra %2 bootstrap değeri ile ilk ayrılan grup *P. capitata x nissolii* melezleri ve *P. nissolii* olmuştur. Diğer örnekler iki ana grupta toplanmıştır. Birinci ana grup %37 bootstrap değeri ile *Dendrophlomis* alt seksiyonuna (1527-1 kodlu *P. leucophracta*, 1526-1 kodlu *P. lunariifolia*, 1272 kodlu *P. bourgaei*, 1278-1 kodlu *P. grandiflora*, 1280-1 ve 1508 kodlu *P. lycia*, 1522-6 ve 1677 kodlu *P. chimerae*) ait odunsu bireyler ve %26 bootstrap değeri ile *Gymnophlomis* alt seksiyonuna (1602 kodlu *P. kurdica*, 1363-44 kodlu *P. linearis*, 1689 kodlu *P. capitata* ve 1371 kodlu *P. armeniaca*) ait sarı çiçekli ve otsu bireylerin oluşturduğu iki alt gruba ayrılmıştır. *Oxyphlomis* alt seksiyonuna ait pembe–mor çiçekli *P. pungens* bu gruba dışarıdan bağlanmıştır. İkinci ana grup ise %30 bootstrap değeri ile *Gymnophlomis* alt seksiyonuna (1564 ve 1989 kodlu *P. kurdica*, 1334, 1750 ve 1984-16 kodlu *P. capitata*, 1962-3 kodlu *P. physocalyx*, 1988 ve 1961-6 kodlu *P. oppositiflora*, 1335-1 kodlu *P. linearis* ve 1739, 1926-6 kodlu *P. nissolii*) ait bireylerden oluşmuştur.

Maximum likelihood analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde *Phlomis* melezlerinin ebeveynlerine göre yerleşimleri şu kategorilerde toplanabilir: (1) Melez ebeveynleri arasında yerleşmiştir. Bu yerleşme ebeveynlerden biriyle kardeş (sister) takson olacak şekilde (1529 ve 1530 kodlu *P. leucophracta x lunariifolia*, 1274-35 kodlu *P. bourgaei x grandiflora*) veya yine ebeveynlerden biriyle fakat kardeş taksondan farklı bir şekilde yerleşmiştir (1262-1 ve 1504 kodlu *P. bourgaei x lycia*, 1958-24 kodlu *P. physocalyx x oppositiflora*, 1524 kodlu *P. bourgaei x chimera*, 1367 kodlu *P. armeniaca x linearis*, 1985-10A ve 1985-25 kodlu *P. kurdica x oppositiflora*, 1694 kodlu *P. capitata x nissolii*, 1541-1 kodlu *P. lunariifolia x monocephala*). (2) Melez atalarından birine tabandan bağlanmıştır (1530 kodlu *P. leucophracta x lunariifolia*). (3) Melez atalarından birine kladistik olarak yakın bir şekilde yerleşmiştir (1226-2 kodlu *P. lunariifolia x monocephala*, 1676 kodlu *P. bourgaei x chimera*, 1274 kodlu *P. bourgaei x grandiflora*, 1257 kodlu *P. armeniaca x nissolii*). (4) Melez diğer

melezler/taksonlarla bir arada gruplanmıştır (1600 kodlu *P. capitata* x *kurdica*, 1201-2 kodlu *P. oppositiflora* x *linearis*).

3.2.7. Maximum Parsimony Analizi

Maximum parsimoni analizi ile oluşturulan bootstrapla test edilmiş ağacın topolojisi Şekil 3.5'te verilmiştir.

Maximum parsimoni analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde birden fazla örneği olan *P. kurdica*, *P. capitata*, *P. lycia*, *P. nissolii*, *P. oppositiflora* *P. chimerae* ve *P. linearis* türlerinin örnekleri türlerine özgün bir şekilde gruplanmamıştır (Şekil 3.5).

Maximum parsimoni analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde ilk olarak dış grup olan *Marrubium parviflorum*'un ayrıldığı gözlenmektedir. Bundan sonra %24 bootstrap değeri ile *P. monocephala* ve *P. monocephala* x *lunariifolia* melezi monofiletik grup oluşturarak ayrılmıştır. Bundan sonra ilk ayrılan grup %53 bootstrap değeri ile *P. capitata* x *nissolii* melezleri ve *P. nissolii* olmuştur. Diğer örnekler iki ana grupta toplanmıştır. Birinci ana grup %41 bootstrap değeri ile *Dendrophlomis* alt seksiyonuna (1278-1 kodlu *P. grandiflora*, 1280-1 ve 1508 kodlu *P. lycia*, 1272 kodlu *P. bourgaei*, 1526-1 kodlu *P. lunariifolia*, 1522-6 ve 1677 kodlu *P. chimerae*, 1527-1 kodlu *P. leucophracta*) ait odunsu bireyler ve %27 bootstrap değeri ile *Gymnophlomis* alt seksiyonuna (1371 kodlu *P. armeniaca*, 1602 kodlu *P. kurdica*, 1363-44 kodlu *P. linearis*, 1689 kodlu *P. capitata*) ait sarı çiçekli ve otsu bireylerin oluşturduğu iki alt gruba ayrılmıştır. *Oxyphlomis* alt seksiyonuna ait pembe–mor çiçekli *P. pungens* bu gruba dışarıdan bağlanmıştır. İkinci ana grup ise %29 bootstrap değeri ile *Gymnophlomis* alt seksiyonuna (1750, 1984-16 ve 1334 kodlu *P. capitata*, 1961-6 ve 1988 kodlu *P. oppositiflora*, 1564 ve 1989 kodlu *P. kurdica*, 1335-1 kodlu *P. linearis*, 1739, 1926-6 kodlu *P. nissolii*, 1962-3 kodlu *P. physocalyx*) ait bireylerden oluşmuştur.

Maximum parsimoni analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde *Phlomis* melezlerinin ebeveynlerine göre yerleşimleri şu kategorilerde toplanabilir: (1) Melez ebeveynleri arasında yerleşmiştir. Bu yerleşme ebeveynlerden biriyle kardeş (sister) takson olacak şekilde (1958-24 kodlu *P. physocalyx* x *oppositiflora*) veya yine ebeveynlerden biriyle fakat kardeş taksondan farklı bir şekilde yerleşmiştir (1530 kodlu *P. leucophracta* x *lunariifolia*, 1367 kodlu *P. armeniaca* x *linearis*, 1985-10A ve 1985-25 kodlu *P. kurdica* x *oppositiflora*, 1382 ve 1694 kodlu *P. capitata* x *nissolii*, 1541-1 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala*). (2) Melez atalarından birine tabandan

bağlanmıştır (1226-2 ve 1541-1 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala*, 1529 kodlu *P. leucophracta* x *lunariifolia*) (3) Melez atalarından birine kladistik olarak yakın bir şekilde yerleşmiştir (1274-35 kodlu *P. bourgaei* x *grandiflora*, 1524 *P. bourgaei* x *chimera*, 1257 kodlu *P. armeniaca* x *nissolii*). (4) Melez diğer melezler/taksonlarla bir arada gruplanmıştır (1676 kodlu *P. bourgaei* x *chimera*, 1274-35 kodlu *P. bourgaei* x *grandiflora*, 1262-1 kodlu *P. bourgaei* x *lycia*, 1600 kodlu *P. capitata* x *kurdica*, 1504 kodlu *P. bourgaei* x *lycia*).

3.2.8. Neighbour-Joining Analizi

Neighbour-joining analizi ile oluşturulan bootstrapla test edilmiş ağacın topolojisi, maximum likelihood ve maximum parsimoni analizleri ile oluşturulan ağaçların topolojisi ile benzerlik göstermektedir (Şekil 3.6).

Ağaç topolojisi incelendiğinde dış gruptan sonra *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait odunsu *P. lunariifolia* x *monocephala* melezi ve *P. monocephala* türü sırasıyla birbirinden bağımsız olarak ayrılmıştır. Daha sonra *Oxyphlomis* alt seksiyonuna ait pembe–mor çiçekli *pungens* ayrılmıştır. Diğer bireyler iki ana grup halinde toplanmıştır. Birinci grupta *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait odunsu bireyler toplanmıştır. Ancak diğer alt seksiyonuna ait sarı çiçekli ve otsu türlerden oluşan küçük bir grup bu gruba dıştan bağlanmıştır. İkinci ana grupta *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait sarı çiçekli otsu bireyler toplanmıştır.

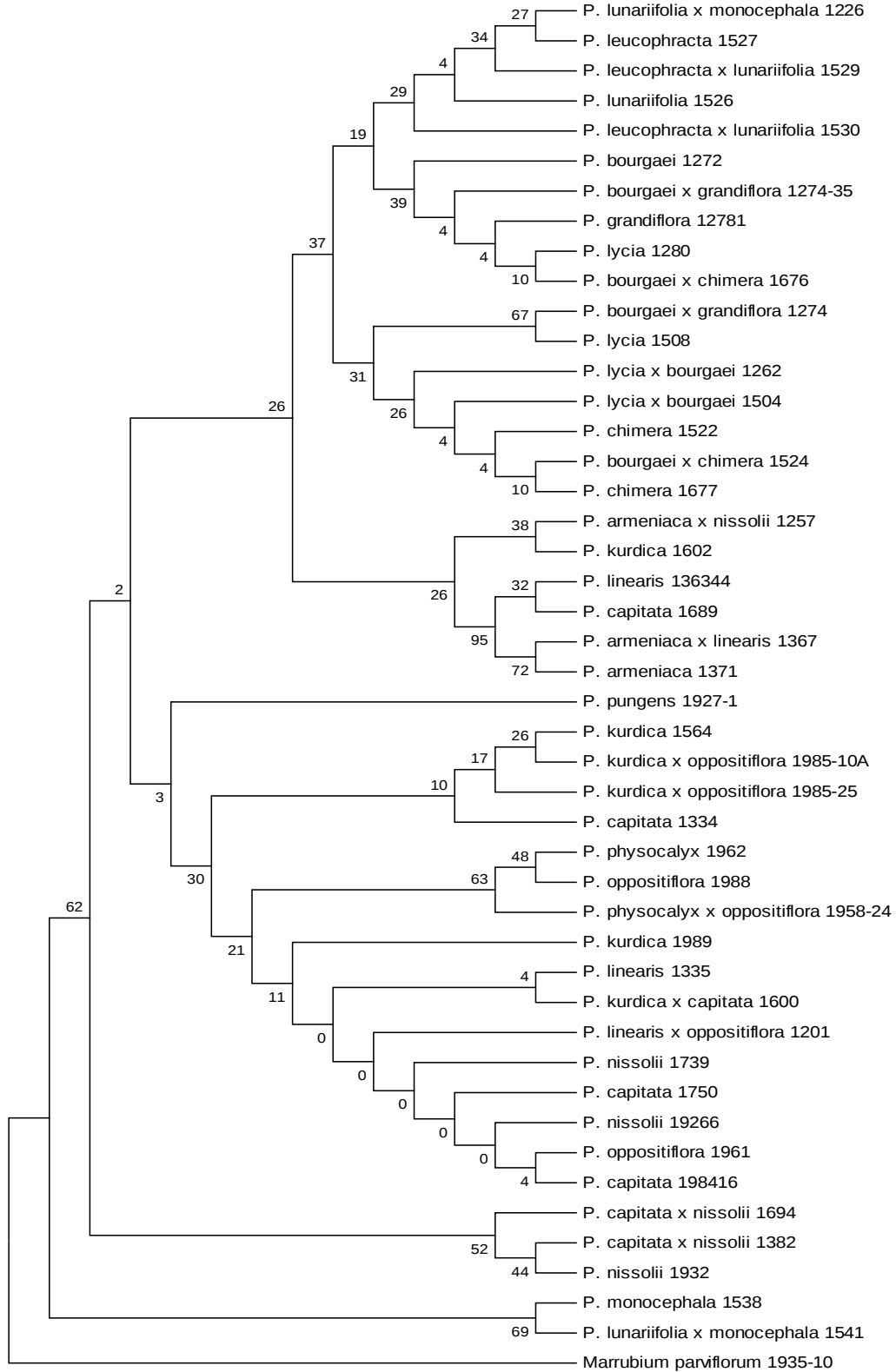
3.2.9. UPGMA Analizi

UPGMA analizi ile oluşturulan bootstrapla test edilmiş ağacın topolojisi diğer analizlerle oluşturulmuş ağaçların topolojisi ile benzerlik göstermektedir (Şekil 3.7).

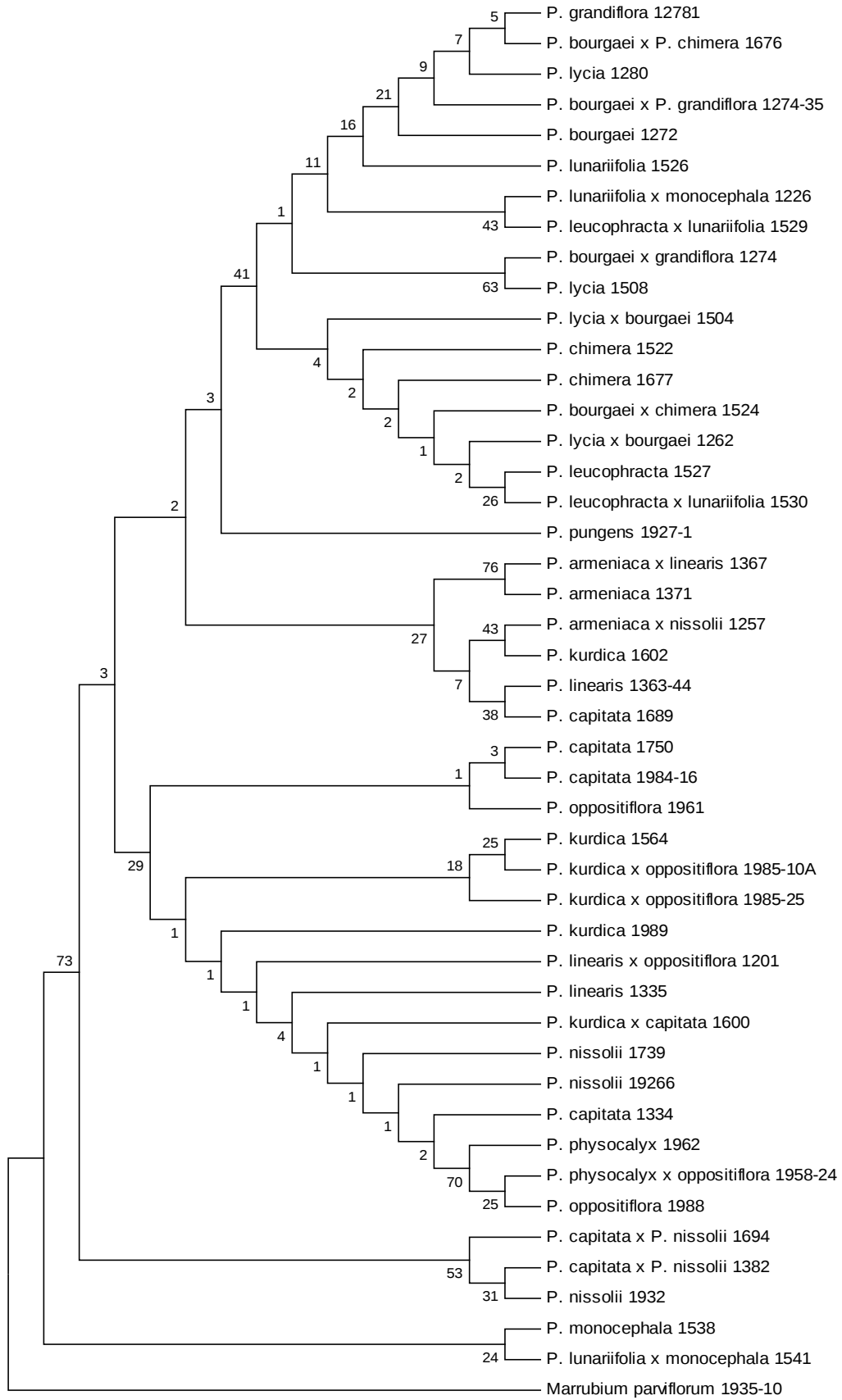
UPGMA analizi ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde ilk olarak dış grup olan *Marrubium parviflorum*'un ayrıldığı gözlenmektedir. Bundan sonra *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait sarı çiçekli ve otsu *P. kurdica* türü ve *P. armeniaca* x *nissolii* melezi sırasıyla birbirinden bağımsız olarak ayrılmıştır. *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait odunsu *P. lunariifolia* x *monocephala* ve *P. leucophracta* x *lunariifolia* melezleri monofiletik bir grup oluşturarak ayrılmıştır. Bundan sonra *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait sarı çiçekli ve otsu türlerden oluşan iki ayrı grup görülmektedir. Diğer bireyler iki ana grupta toplanmıştır.

Birinci grupta *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait sarı çiçekli ve otsu bireyler toplanmış ve bunlara en dıştan *Oxyphlomis* alt seksiyonuna ait pembe–mor çiçekli *P. pungens* ve *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait odunsu *P. monocephala* türü ve *P. lunariifolia* x

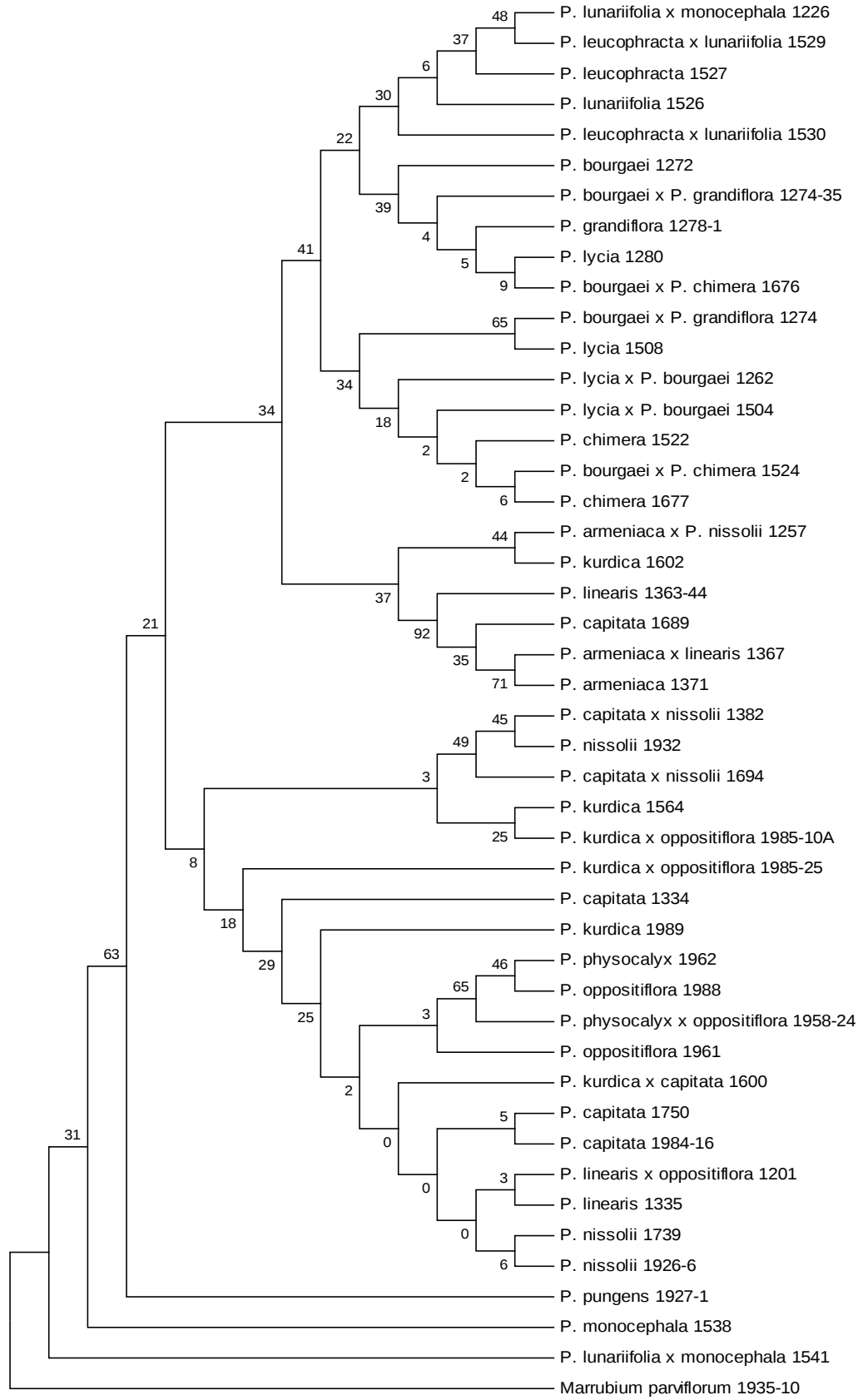
monocephala melezinin bağlanmasıyla oluşan küçük bir grup bağlanmıştır. İkinci ana grupta *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait odunsu türler toplanmıştır.



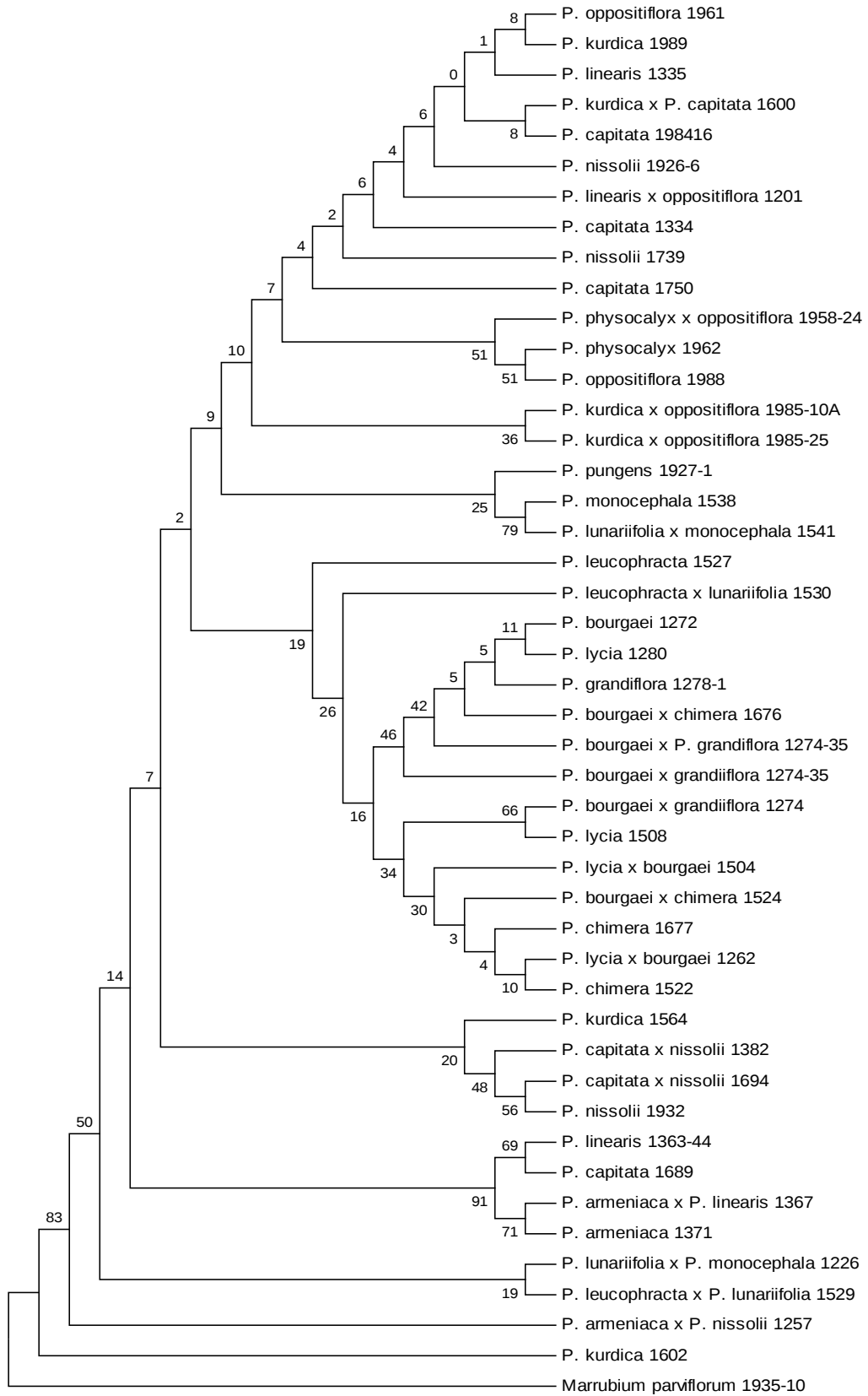
Şekil 3.4. Bootstrap değerleri işlenmiş maximum likelihood ağacı



Şekil 3.5. Bootstrap değerleri işlenmiş maximum parsimony ağacı



Şekil 3.6. Bootstrap değerleri işlenmiş neighbour-joining ağacı



Şekil 3.7. Bootstrap değerleri işlenmiş UPGMA ağacı

3.2.10. Network Analizi

Filogenetik Network analizi ile oluşturulmuş neighbour-net grafiği Şekil 3.8 ve 3.9’da verilmiştir. DNA dizi verilerinden elde edilen neighbour-network modelinin verilere uyumu oldukça yüksek olup % 99.80’dir (fit=95.89, LSfit= 99.80). Neighbour-net grafiği incelendiğinde gözlemlenebilen yatay kenarlar (kutular) örnek grubunun evrimsel tarihinde retikülat olayların gerçekleştiğini göstermektedir.

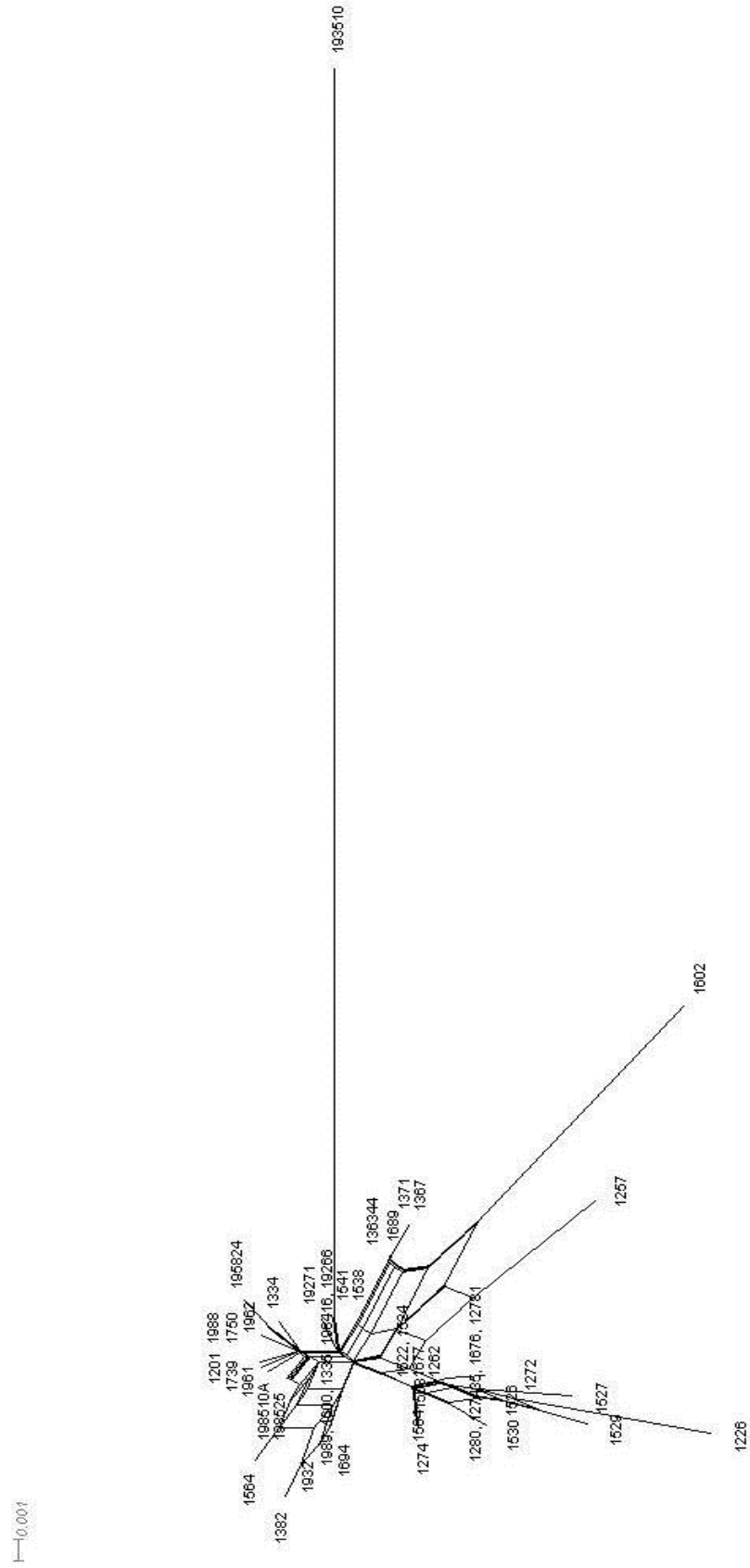
DNA dizilerinden düzeltilmemiş P-mesafesine göre elde edilen mesafe değerlerinden oluşturulan neighbour-net ağ (network) analizinde *Phlomis* türleri ve melezleri iki ana grupta toplanabilir. Birinci ana grubu *Dendrophlomis* alt seksiyonunun türleri ve melezleri (Türler: 1272 kodlu *P. bourgaei*, 1508 ve 1280-1 kodlu *P. lycia*, 1278-1 kodlu *P. grandiflora*, 1527-1 kodlu *P. leucophracta*, 1526-1 kodlu *P. lunariifolia*, 1677 ve 1522-6 kodlu *P. chimerae*; Melezler: 1524 ve 1676 kodlu *P. bourgaei* x *chimera*; 1274 ve 1274-35 kodlu *P. bourgaei* x *grandiflora*, 1262-1 ve 1504 kodlu *P. bourgaei* x *lycia*, 1529 ve 1530 kodlu *P. leucophracta* x *lunariifolia*, 1226-2 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala*, 1201-2 kodlu *P. oppositiflora* x *linearis*) oluştururken ikinci ana grubu *Gymnophlomis* alt seksiyonunun türleri ve melezleri (Türler: 1564, 1989 ve 1602 kodlu *P. kurdica*, 1367-1 kodlu *P. armeniaca*, 1750, 1984, 1689-1 ve 1334 kodlu *P. capitata*, 1363-1 ve 1335-1 kodlu *P. linearis*, 1932-3, 1739 ve 1926-9 kodlu *P. nissolii*, 1961-6 ve 1988 kodlu *P. oppositiflora* türleri, 1962-3 kodlu *P. physocalyx*; Melezler: 1257 kodlu *P. armeniaca* x *nissolii*, 1367 kodlu *P. armeniaca* x *linearis*, 1382 ve 1694 kodlu *P. capitata* x *nissolii*, 1985-10A ve 1985-25 kodlu *P. kurdica* x *oppositiflora*, 1958-24 kodlu *P. physocalyx* x *oppositiflora*, 1600 kodlu *P. capitata* x *kurdica*), *Oxyphlomis*’in tek örneği olan 1927-1 kodlu *P. pungens* türü, dış grup olarak kullanılan 1935-10 kodlu *Marrubium parviflorum*, *Dendrophlomis* alt seksiyonunun 1538-2 kodlu *P. monocephala* türü ve 1541-1 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala* melezi oluşturmaktadır. İkinci ana grup içerisinde *Gymnophlomis* alt seksiyonunun türleri ve melezleri kendi aralarında kümelenerek bir alt grup oluştururken *Oxyphlomis*’in tek örneği olan 1927-1 kodlu *P. pungens* türü ve *Dendrophlomis* alt seksiyonunun 1538-2 kodlu *P. monocephala* türü ve 1541-1 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala* melezi de bir arada kümelenip ikinci alt grubu oluşturmuştur (Şekil 3.8).

DNA dizilerinden düzeltilmemiş P-mesafesine göre elde edilen mesafe değerlerinden oluşturulan Neighbour-net ağ (network) analizinde *Phlomis* melezlerinin ebeveynlerine göre yerleşimleri şu kategorilerde toplanabilir: (1) Melez her iki atanın arasında yer almış ve her iki ataya da kutucuklarla (yatay kenarlarla) bağlanmıştır (1529 kodlu *P. leucophracta* x *lunariifolia* melezi ataları olan 1526 kodlu *P. lunariifolia* ve 1527 kodlu *P. leucophracta* arasında yer almıştır) (2) Melez atalarının birinin diğer melezinin ve diğer türlerin yer aldığı bir grupta kutucuklarla atasının birinin yanında yer alırken diğer ataya da çok sayıda kutucukla uzaktan bağlanmıştır (1226-2 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala* melezi diğer türlerle grup oluşturan 1538 kodlu *P. monocephala*'ya kutucuklarla uzaktan bağlanırken diğer atası olan 1526 kodlu *P. lunariifolia*'ya ise yakınından bağlanarak onunla bir grup oluşturmuştur) (3) Melez diğer türler ve melezlerin de bulunduğu bir kutucukta yer almış ve ataların biri de bu kutucuğa bir dal ile bağlanmış ve melez ayrıca bir çok kutucukla da diğer atasına bağlanmıştır (1676 kodlu *P. bourgaei* x *chimera* melezi diğer türler ve melezlerle bir kutucukta yer almış ve atalarından biri olan 1272 kodlu *P. bourgaei* bu kutucuktan dallanmış ve melez diğer atası olan 1522-6 kodlu *P. chimera* da kutucuklarla bağlanmıştır) (4) Melez her iki atasının da başka türler ve melezlerle kümелendiği gruplara kutucuklarla bağlanıp bir atasıyla grup oluşturmuştur (1262-1 ve 1504 kodlu *P. bourgaei* x *lycia* ataları olan ve diğer türler ve melezlerle kümelenen atalardan biri olan 1272 kodlu *P. bourgaei*'ye az sayıda kutucuklarla bağlanarak bir grup oluşturmuş ve diğer türler ve melezlerle kümelenen 1508 ve 1280 kodlu ikinci ata olan *P. lycia* ise bir çok kutucuklarla bağlanmıştır) (5) Melez kutucuklarla atalardan her ikisine bağlanmaktadır fakat atalarından hiçbirisiyle bir grup oluşturmamaktadır (1274-35 kodlu *P. bourgaei* x *grandiflora*) (6) Melez bir atasıyla kutucuğun bir kenarında birlikte yer alırken diğer atada bu kutucuğun ucundan tek başına dallanarak meleze bağlanmaktadır (1274 kodlu *P. bourgaei* x *grandiflora* bir kutucukta aynı yerde atalarından biri olan 1278-1 kodlu *P. grandiflora* ile birlikte yer almaktadır ve diğer ata olan 1274 kodlu *P. bourgaei* ise bu kutucuğun ucundan dallanmaktadır) (7) Melez her iki atanın yanında yer alarak atalarıyla birlikte gruplanmış ve atalarına paralel kenarla (2 kutucukla) bağlanmıştır (1958-24 kodlu *P. physocalyx* x *oppositiflora* melezi 1988 kodlu *P. oppositiflora* ve 1962 kodlu *P. physocalyx* birlikte gruplanarak onlara yatay kenarla bağlanmıştır) (8) Melez atalarından birinin diğer bir tür ile yaptığı başka bir meleze yatay kenarla bağlanmış ve iki melezde yatay kenarla ortak ataya bağlanmış ve melez ayrıca diğer türler ve melezlerle

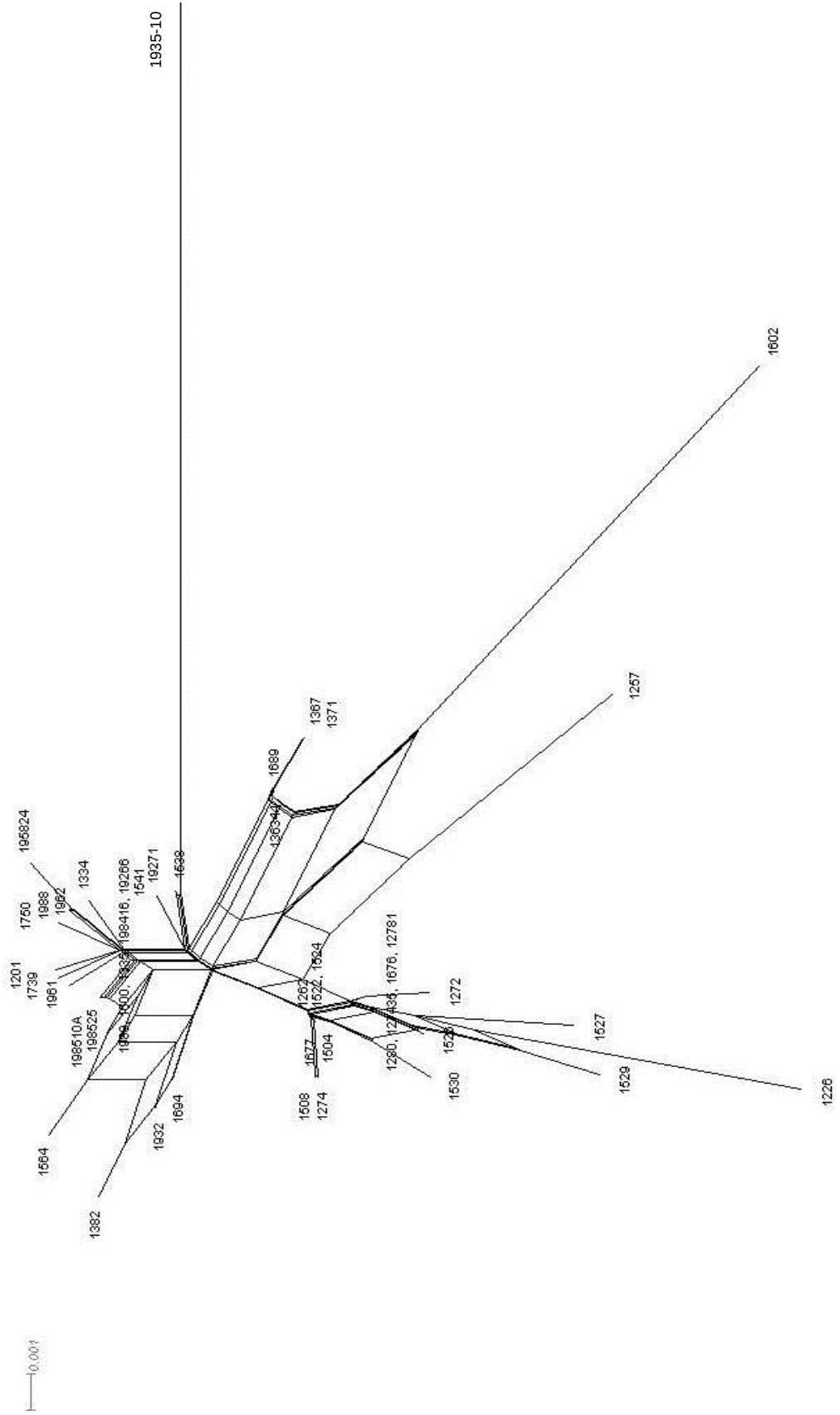
gruplanan ikinci atasına ise çok sayıda kutucuklarla bağlanmıştır (1541-1 kodlu *P. lunariifolia* x *monocephala* melezi 1529 kodlu *P. lunariifolia* x *leucophracta* melezine yatay kenarla bağlanmış ve bu iki melez de 1526 kodlu *P. lunariifolia* olan ortak ataya yatay kenarla bağlanmışlardır ve melez diğer türler ve melezlerle gruplanan ikinci atası olan 1538 kodlu *P. monocephala*'ya çok sayıda kutucuklarla bağlanmıştır) (9) Melez atalarının ve diğer türlerin de yer aldığı bir kutucukta atalarıyla birlikte gruplanmıştır (1600 kodlu *P. capitata* x *kurdica* melezi ataları olan 1984 kodlu *P. capitata* ve 1989 kodlu *P. kurdica*'nın ve diğer türlerin de bulunduğu bir kutucukta yer almıştır) (10) Melez bir kutucuğun bir ucunda yer alırken aynı kutucuğun diğer ucunda atalarından biri yer almış ve diğer atasına da kutucuklarla (3 kutucuk veya 4 paralel kenarla) bağlanmıştır (1201-2 kodlu *P. oppositiflora* x *linearis* melezi bir kutucuğun bir ucunda yer alırken ebeveynlerinden biri olan 1961 kodlu *P. oppositiflora* aynı kutucuğun başka bir ucuna bağlanmış ve 1335 kodlu *P. linearis* olan ikinci atası da diğer türlerle birlikte bu kutucukta yer almıştır) (11) Ataları aynı olan iki melez paralel kenarlarla birbirine bağlanmış ve melezler iki atasının arasında yer almış ve kutucuklarla atalarına bağlanmıştır (1985-10A ve 1985-25 kodlu *P. kurdica* x *oppositiflora* melezleri bir birbirlerine paralel kenarlarla bağlanarak ataları olan 1961 kodlu *P. oppositiflora* ve 1964 kodlu *P. kurdica* arasında yerleşmiş ve atalarına kutucuklarla bağlanmıştır) (12) Melez yatay kenarla atalarından birinin hemen yanında yer alırken diğer türlerle grup oluşturan ikinci atasına da bir çok kutucukla bağlanmıştır (1382 ve 1694 kodlu *P. capitata* x *nissolii* melezleri 1932 kodlu *P. nissolii*'ye yatay kenarla bağlanmışlar ve ikinci ataları olan 1984-16 kodlu *P. capitata*'ya ise kutucuklarla bağlanmışlardır) (13) Melez atalarından birine yatay kenarla bağlanarak bir kutucukla atasının yanında yer alırken diğer atası ise bunlara tabandan bir kutucukla bağlanmıştır (1367 kodlu *P. armeniaca* x *linearis* melezi *P. armeniaca*'ya bir kutucukla bağlanmış diğer ata olan 1363-44 kodlu *P. linearis* ise bunlara tabandan bir kutucukla bağlanmıştır) (14) Melez diğer türler ve melezlerle bir grup oluşturmuş ve kutucuklarla atalarının birine yakın bir şekilde bağlanmış diğer türlerle grup oluşturmuş ikinci ataya ise kutucuklarla uzaktan bağlanmıştır (1257 kodlu *P. armeniaca* x *nissolii* melezi 1371 *P. armeniaca* atasına kutucuklarla yakından bağlanmış ve 1926-6 kodlu *P. nissolii* atasına ise kutucuklarla uzaktan bağlanmıştır) (15) Melez atalarından biriyle aynı kutunun bir kenarında yer almış ve ikinci atasına da bir çok kutucukla bağlanmıştır (1524 kodlu *P. bourgaei* x *chimera* melezi ise atalarından biri olan 1677 kodlu *P. chimera*'ya aynı kutuda bir

paralel kenarla bağlanırken ikinci atası olan 1272 kodlu *P. bourgaei*'ye bir çok kutucukla bağlanmıştır) (16) Melez paralel kenarlarla (kutucuklarla) atasının birinin hemen yanında yer alırken diğer ataya da paralel kenarlarla bağlanmış ve bu iki ata arasında atalardan birinin iki melezi yer alarak bir grup oluşturmuşlardır (1530 kodlu *P. leucophracta* x *lunariifolia* melezi 1526 kodlu *P. lunariifolia* olan atasına paralel kenarlarla bağlanıp bu atanın hemen yanında yer almış ve melez 1527 kodlu *P. leucophracta* olan ikinci atasına da paralel kenarlarla bağlanmış fakat bu iki ata arasına 1526 kodlu *P. lunariifolia*'nın diğer iki melezi de yerleşerek hepsi bir grup oluşturmuştur) (Şekil 3.9).

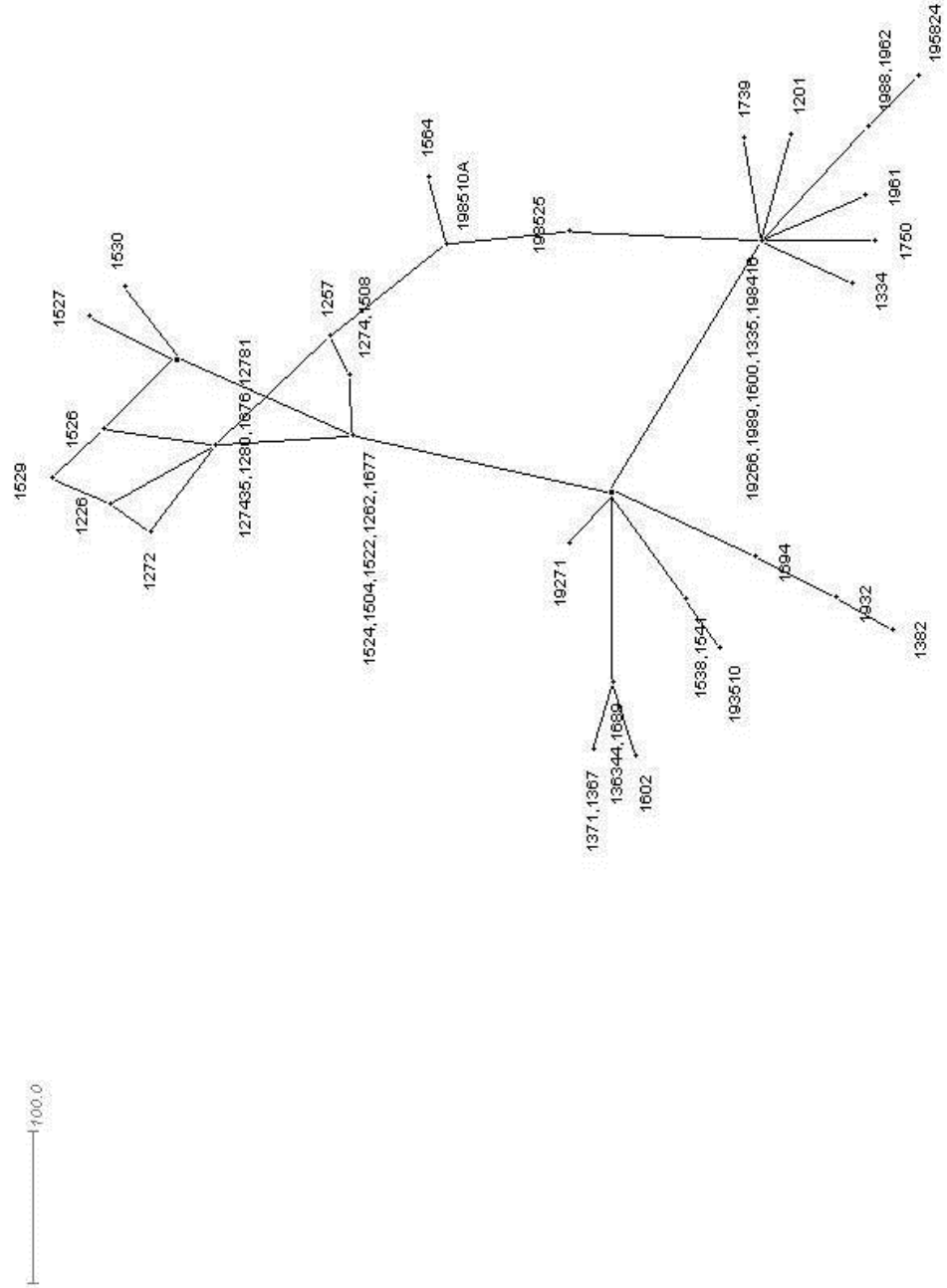
Uygulanan diğer bir network analizi de median-joiningtir. Şekil 3.10 incelendiğinde örneklerin 3 grupta toplandığı gözlenmektedir. *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait bireyler iki ayrı grup oluştururken *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait bireyler bir grupta toplanmıştır.



Şekil 3.8. Dış grup içeren neighbour-net analizi



Şekil 3.9. Dış grup dalı kesilmiş neighbour-net analizi



Şekil 3.10. Dış grup içeren median-joining analizi

4. BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇLAR ve ÖNERİ

4.1. Tartışma

Lamiaceae familyası Türkiye Florası'nda 45 cins, 565 tür ve toplam 756 taksonla temsil edilmektedir ve endemizm oranı % 45'tir [3]. *Phlomis* cinsinin tür-türaltı endemizm oranı %58,8, melez endemizm oranı ise % 100'dür. Tür-türaltı-melez endemizmi ise % 65,3'ü bulmaktadır. Endemizm oranının yüksek olması Anadolu'nun gen merkezlerinden biri olmasından kaynaklanmaktadır [3;11]. Bu sonuçlar doğrultusunda *Phlomis* cinsi *Lamiaceae* familyası içerisinde en fazla meleze sahip olan cinstir. Endemizm oranının yüksek olması ve cins içerisinde endemik türler bulunması Anadolu'nun gen kaynaklarının korunması açısından önemli olması nedeniyle *Phlomis* cinsi üzerine çalışmalarla revizyonlar yapılmıştır. Dadandı'nın "Türkiye'nin *Phlomis* Cinsi Revizyonu" adlı doktora tezinde *Phlomis* cinsi 39 tür ve tür altı, 19 melezle toplam 58 takson ile sınıflandırılmıştır [2]. *Phlomis* cinsinin 19 melezle temsil edilmesi, bu cinste melezleşmenin yüksek bir seviyede meydana geldiğini göstermektedir.

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonucunda *P. x termessi*'nin morfolojik ve moleküler olarak atalarının arasında yer aldığı gözlenmiştir [19].

Bu çalışmada *Phlomis* cinsine ait 12 melezin atalarıyla olan ilişkisi 23 karakterde morfolojik olarak ve cpDNA metodu ile moleküler yönden incelenmiş ve bazı melez türlerin atalarından en az birine bağlandığı gözlenirken, bazı melez bireyler bağımsız bir dalda yer almış, bazıları ise ataları kabul edilen türlerin dışındaki bir türe bağlanmıştır.

Phlomis seksiyonu, pembe–mor çiçekli ve otsu bitkilerden oluşan *Oxyphlomis* alt seksiyonu, sarı çiçekli ve otsu *Gymnophlomis* alt seksiyonu ve odunsu *Dendrophlomis* alt seksiyonu olmak üzere 3 alt seksiyona ayrılmaktadır [2]. Bu ayrım, bu çalışmada

yapılan maximum likelihood, maximum parsimoni, neighbour-joining ve UPGMA analizlerinde gruplanmalar halinde gözlenmektedir. Analizler karşılaştırılmalı olarak incelendiğinde, bütün filogenetik ağaçlarda beklendiği üzere dış grup olan *Marrubium parviflorum*'un öncelikle ayrıldığı gözlenmektedir (Şekil 3.4-3.7).

Bu çalışmada sunulmuş filogenetik ağaçlar genel olarak incelendiğinde *Phlomis* örneklerinin 2 ana gruba ayrıldığı açıkça görülmektedir. *Oxyphlomis* alt seksiyonuna ait tek birey olan *P. pungens* UPGMA analizi ile oluşturulmuş filogenetik ağaç haricinde bağımsız bir dalda yerleşmiştir. *Dendrophlomis* ve *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait bireyler genellikle bir arada toplanırken, bu alt seksiyonlara ait bazı bireyler tek tek ya da küçük gruplar halinde, gruplarından ayrı dallanmıştır (Şekil 3.4-3.6).

Maximum likelihood ve neighbour-joining analizleri ile oluşturulan filogenetik ağaçlarda 6 bireylik *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait bir grubun, aynı alt seksiyona ait bireyler yerine *Dendrophlomis*'e ait bireylerin oluşturduğu gruba dışarıdan bağlandığı gözlenmektedir. UPGMA analizi ile oluşturulmuş filogenetik ağaçta ise, *Oxyphlomis* alt seksiyonuna ait *P. pungens* ve *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait 2 birey ile bir grup oluşturarak, *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait bireylerin oluşturduğu gruba dıştan bağlanmıştır (Şekil 3.4;3.6-3.7).

Birey bazında incelediğimizde de, bazı uyumlar ve bazı tutarsızlıklar mevcuttur.

Maximum likelihood ve maximum parsimoni ağaçlarında dış gruptan sonra ilk olarak *P. monocephala* (1538) ve *P. lunariifolia x monocephala* (1541) bir monofiletik grup oluşturarak ayrılmıştır. Bu bireyler neighbour-joining ağacında yine dış gruptan sonra fakat birbirlerine bağlanmadan dallanmışlardır. UPGMA ağacında ise bu bireyler *Oxyphlomis* alt seksiyonuna ait *P. pungens*'e (1927-1) bağlanarak *Gymnophlomis*'e ait bireylerin oluşturduğu gruba dışarıdan bağlanmıştır (Şekil 3.4-3.7).

P. linearis (1363-44), *P. capitata* (1689), *P. armeniaca x linearis* (1367), *P. armeniaca* (1371) UPGMA ve maximum parsimoni ağaçlarında bir grup oluşturarak ayrılmışlardır. *P. armeniaca x linearis* ve *P. armeniaca* bireyleri bütün ağaçlarda birbirine bağlanmış durumdadır. Maximum likelihood ve neighbour-joining ağaçlarında bu gruba *P. armeniaca x nissolii* (1257) melezi ve *P. kurdica*'nın (1602) oluşturduğu grup da bağlanmış ve bunlar *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait oldukları halde *Dendrophlomis*

alt seksiyonuna ait bireylerin oluşturduğu gruba dıştan bağlanmıştır. *P. armeniaca x nissolii* (1257) ve *P. kurdica* (1602) UPGMA ağacında birbirlerine bağlanmadan, birbirleri ardına dış gruptan sonra bağlanmışlardır (Şekil 3.4-3.7).

P. capitata x nissolii melezleri (1382 ve 1694) *P. nissolii* (1932), ağaçların hepsinde birlikte gruplanmışlardır. Bu bireylerin oluşturduğu grup, maximum parsimoni, maximum likelihood ve UPGMA ağaçlarında büyük soy hatlarının olduğu dalın diğer ucunda yer almıştır. UPGMA ağacında bu gruba *P. kurdica* (1564) da bağlanmıştır. Neighbour-joining ağacında, *P. kurdica* (1564) ve *P. kurdica x oppositiflora* (1985-10A) nın oluşturduğu grup da bu gruba bağlanmış ve *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait bireylerin toplandığı grupta yer almışlardır (Şekil 3.4-3.7).

Buradan sonra bireylerin iki büyük gruba ayrıldığı gözlenmektedir. Bu gruplar *Gymnophlomis* ve *Dendrophlomis* alt seksiyonlarına ait türler iki grup oluşturmuş ve çoğunlukla bir arada toplanmışlardır.

P. kurdica (1564), *P. kurdica x oppositiflora* melezleri (1985-10A ve 1985-25) ve *P. capitata* (1334) maximum parsimoni ve maximum likelihood ağaçlarında bir grupta yer almışlar ve *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait türlerin birinci dalını oluşturmuşlardır. Neighbour-joining ağacında *P. kurdica* ve 1985-10A (*P. kurdica x oppositiflora*) kodlu melezin oluşturduğu grup, *P. capitata x nissolii* melezleri ve *P. nissolii*'nin oluşturduğu grupla birleşerek birinci dalda yer alırken, 1985-25 (*P. kurdica x oppositiflora*) kodlu melez ve *P. capitata* ikinci daldaki bireylere sırasıyla birbirlerinden bağımsız olarak bağlanmışlardır. UPGMA ağacında ise *P. kurdica*, *P. capita* ve *P. capitata x nissolii* melezlerine bağlanmış, *P. capitata* bağımsız olarak dallanmış ve *P. kurdica x oppositiflora* melezleri ayrı bir monofiletik grup oluşturmuşlardır (Şekil 3.4-3.7).

P. physocalyx x oppositiflora (1958-24), *P. physocalyx* (1962) ve *P. oppositiflora* (1988) bütün ağaçlarda birlikte yer almışlardır. Maximum likelihood ve UPGMA'da ayrı bir dalda gruplanmışken, maximum parsimoni ağacında *P. oppositiflora x linearis* (1201) melezi ve *P. capitata* üyelerinin (198416 ve 1750) oluşturduğu gruba bağlanmış, neighbour-joining ağacında ise bu gruba *P. capitata* (198416) bağlanmış ve oluşturdukları bu grup başka bir grupla birleşmiştir (Şekil 3.4-3.7).

P. oppositiflora x linearis (1201) melezi neighbour-joining ağacında *P. oppositiflora* (1961), maximum parsimoni ağacında *P. capitata* (198416 ve 1750), maximum likelihoodda *P. kurdica*'ya (1989) bağlanmış ve UPGMA'da bağımsız olarak dallanmıştır (Şekil 3.4-3.7).

Maximum likelihood ve neighbour-joiningde *P. nissolii* (1739) ve *P. capitata* (1750) monofiletik bir grup oluşturmuştur. Neighbour joiningde *P. linearis* (1335) ve *P. nissolii* (1739) de monofiletik bir grup oluşturmuştur (Şekil 3.4;3.6).

P. kurdica x capitata (1600) melezi bütün ağaçlarda bağımsız dallanmış, herhangi bir *P. capitata* ya da *P. kurdica* türünden bireye bağlanmamıştır.

Diğer ana grup incelendiğinde çoğunlukla *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait odunsu bireylerden oluştuğu görülmektedir.

P. bourgaei x grandiflora (1274) ve *P. lycia* (1508) bütün ağaçlarda birbirlerine bağlanmışlardır. *P. bourgaei* (1272), *P. bourgaei x grandiflora* (1274-35), *P. grandiflora* (1278-1), *P. lycia* (1280), *P. bourgai x chimera* (1676) bütün ağaçlarda bir dalda gruplandığı görülmektedir. Maximum parsimoni ağacında bu gruba *P. lunariifolia* (1280) de eklenmiştir (Şekil 3.4-3.7).

P. bougaei x chimera (1524), *P. chimera* örnekleri (1677 ve 1522) ve *P. bourgaei x lycia* melezleri (1504 ve 1262) maximum likelihood, neighbour-joining ve UPGMA ağaçlarında bir grup oluşturmuşlardır; maximum parsimoni ağacında ise *P. chimera* örnekleri 1262 kodlu *P. bourgaei x lycia* meleziyle birleşmiş, *P. bourgai x lycia* (1504) ve *P. bourgai x chimera* (1524) melezleri onların içinde bulunduğu gruba tek tek dışarıdan bağlanmışlardır. *P. bourgaei x lycia* melezlerinin atalarından en az birine bağlandığı gözlenmemiştir (Şekil 3.4-3.7).

P. lunariifolia x monocephala (1226), *P. leucophracta x lunariifolia* (1529), *P. leucophracta* (1527), *P. lunariifolia* (1526) ve *P. leucophracta x lunariifolia* (1530) maximum likelihood ve neighbour-joining ağaçlarında birlikte gruplanmışlardır. Maximum parsimoni ağacında, *P. leucophracta* (1527), *P. leucophracta x lunariifolia* (1530) meleziyle; *P. lunariifolia x monocephala* (1226), *P. leucophracta x lunariifolia* (1529) meleziyle bağlanmış, *P. lunariifolia* (1526) tek başına bağlanmış ve bunlar ayrı

gruplarda yer almıştır. *P. lunariifolia* x *monocephala* ve *P. leucophracta* x *lunariifolia*'ya, *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait *P. armeniaca* x *nissolii* (1257) ve *P. kurdica* (1602) bağlanmış ve onlarla birlikte *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait bireylerin oluşturduğu ana grupta yer almıştır. UPGMA ağacında ise *P. lunariifolia* x *monocephala* ve *P. leucophracta* x *lunariifolia* nın oluşturduğu monofiletik grup dıştan dallanmış, *P. leucophracta*, *P. leucophracta* x *lunariifolia* ve *P. lunariifolia* birbirlerinden bağımsız dallanmış ve *Dendrophlomis* alt seksiyonuna ait bireylerin oluşturduğu ana grupta yer almışlardır (Şekil 3.4-3.7).

Albaladejo ve arkadaşlarının 2005'te yaptığı çalışmada İspanya'da 5 farklı *Phlomis* taksonunda ITS markırları ve kodlanmayan kloroplast DNA bölgesine dayalı olan moleküler çalışmada ITS ve kloroplast DNA bölgesine dayalı bulguların çeliştiği, ITS ve morfolojik ölçüm sonuçlarının benzer olduğu gözlenmiştir. ITS bölgesinin tersine, plastid DNA markırlarının taksomik değil, coğrafik dağılım örneği gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada *trnT-trnL* bölgesinde indel bulunamamıştır [17].

Carrodus'un yüksek lisans tezinde ITS'in yetersiz kaldığı noktalar cpDNA *trnT-trnL* bölgesi analizi ile çözümlenmiştir [110]. Yeni Zelanda'nın farklı lokalitelerinden *Pittosporum* Banks & Sol. cinsine ait 25 taksonunun incelendiği bu tezde, *trnT-trnL* bölgesinde 7 adet indel bulunmuştur. *trnT-trnL* bölgesi 689 bç uzunluğunda ve ortalama % 25,8 G+C içeriği ile A+T'ce zengindir. 16'sı parsimoni olarak bilgi içeren toplamda 20 değişken karakter bulunmuştur. Bu çalışmada *trnT-trnL* bölgesi uzunluğu hizalanmadan önce ortalama 730 ve hizalandıktan sonra ortalama 790'dır ve diziler boşluk (gap) içermektedir. 1568 R dizisinde 643–905 bazları arasının heterozigot indel olma ihtimali olduğunu belirlemiştir (Skor: 25 (p: 18 baz; q=12) (b:18 baz; q=14)). *trnT-trnL* bölgesinde 19'u parsimoni olarak bilgi içeren 73 değişken bölge vardır ve toplam mutasyon sayısı (Eta) 76'dır. Ortalama % 31 G+C oranı ile A+T'ce zengindir.

Barber ve arkadaşlarının 2002'de 32 *Sideritis* L. (*Lamiaceae*) türünde çekirdek ve kloroplast dizi analizlerine dayanan çalışmalarında *trnT-trnL* bölgesi hizalanmadan önce 700 bç, hizalamadan sonra 1114–1195 bç uzunluğunda olduğu ve 76 karakterin filogenetik açıdan bilgi içerdiği ve dizilerde 52 indel olduğu bulunmuştur [111]. Yapılan filogenetik analizlerde otsu bireylerin monofiletik grup oluşturmaması bu grubun seksiyonel ayrılmasında sorun oluşturmıştır. Tek yıllık bireylerin sınırlı sayıda

örnekle çalışılması çalışmanın sağlam çıkarımlara gitmesine izin vermemiş, tek yıllık bireylerin kendi içerisinde ve odunsu bireylerle olan ilişkilerinin açıklığa kavuşturulabilmesi için daha kapsamlı örnekleme gerektiği belirtilmiştir. Bu çalışmada aynı türe ait farklı bireylerin filogenetik ağaçta farklı konumlandığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda, otsu bireylerden bir grup odunsu bireylerin oluşturduğu gruba dışarıdan bağlanmıştır. Gruplarda farklı altseksiyonlara ait bireyler olmasa da, dışarıdan bağlanarak olmuş ve bu çalışmaya benzer şekilde aynı türe ait farklı bireyler yan yana konumlanmamıştır.

Filogenetik ağaçlar melezleşme gibi bazı evrimsel olayları göstermede yetersiz kalırlar ve çatışan sonuçlar gösterebilir. Bu çalışmada yapılmış olan filogenetik analizlerdeki tutarsız sonuçları gözlemleyebilmek açısından filogenetik network analizleri yapılmıştır. Filogenetik network analizleri retikülat grafikler kullanması nedeniyle evrimsel ilişkileri daha iyi temsil edebilmektedir. Bu bağlamda yapılan neighbour-net ve median-joining analizleri incelendiğinde, bu grafiklerde oluşmuş olan kutucuklar (netted area) örneklerimizin evrimsel tarihinde retikülat olayların varlığını göstermektedir.

Neighbour-net analizi incelendiğinde örneklerin ikiye ayrıldığı açıkça görünmektedir. Üst tarafta *Gymnophlomis* seksiyonundan üyeler arasında retikülat olaylar gerçekleşmiştir. Grafiğin alt tarafında odunsu bireyler arasında yatay kenarlar vardır. *Gymnophlomis* altseksiyonuna bir grubun *Dendrophlomis* altseksiyonuna ait bireylerle daha fazla ortak geçmiş paylaştığı görülmektedir. Bu grubun üyeleri filogenetik ağaçların bazılarında odunsu bireylere bağlanmış gruptur.

Median-joining analizi incelendiğinde örneklerin analizlere paralel olarak 3 noktada gruplandığı görülmektedir (Şekil 3.10)

Network analizleri melezleşme bakımından incelendiğinde bazı melez bireylerin atalarıyla bağlantılı olduğu ve bazı melezlerin ataları olmayan türlerle bağlandığı görülmektedir. Genel tablo filogenetik ağaçlarla benzerlik göstermektedir (Şekil 3.8-3.9).

P. physocalyx x oppositiflora, *P. kurdica x capitata*, *P. capitata x nissolii*, *P. armeniaca x linearis*, *P. bourgai x chimera*, *P. bourgai x grandiflora*, *P. leucophracta x lumarifolia*, *P. lunariifolia x monocephala* atalarından en az biri ile yatay kenarlarla bağlanmıştır.

P. oppositiflora x linearis, *P. armeniaca x nissolii*, *P. bourgai x grandiflora* filogenetik ağaçlara bağlandıkları bireylerle aralarında daha fazla retikulat olay olduğu gözlenmiştir.

Kloroplast DNA'sının tohumlu bitkilerde kalıtımının maternal olduğu düşünülmekteydi. Hansen ve arkadaşlarının *Passiflora*'da kloroplast kalıtımının hangi ebeveyne ait olduğuna açıklık getirmek için yaptıkları çalışmada Southern Blott yöntemini kullanmışlar ve bu cinste kloroplast DNA kalıtımının sadece maternal değil, aynı zamanda bazı bireyler için paternal ve bipaternal olduğu sonucuna varmışlardır [27]. McCauley ve arkadaşları *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) üzerine yaptıkları PCR/RFLP çalışmada kloroplast genomunun sadece maternal kalıtılmadığı gözlenmiştir [28]. Bu çalışmada bireylerin kloroplast DNA'sının hangi ebeveynden ya da her ikisinden mi geldiği sorusunu yanıtlayacak yeterli veri yoktur.

Morfolojik verilerle oluşturulmuş phylogram ağacı ve network şekli, incelenen *Phlomis* türlerinin evrimsel tarihinde retikulat olayların varlığına işaret etmektedir. Diyagramlar incelendiğinde moleküler veri sonuçlarının yanı sıra morfolojik sonuçlarda da bazı melez bireylerin atalarından en az birine bağlanırken, bazı melez bireylerin atalarından her ikisi de olmayan bir türe bağlandığını göstermektedir. Morfolojik verilerle oluşturulan phylogram ağacında bireyler gruplanarak dallanmıştır. Ancak bu dallanmalar yer yer ata birey–melez eşleşmesi ve alt seksiyonlara uygunluk gösterirken, bazı melezlerin atalarından herhangi biri olmayan bir bireye bağlandığı ya da bazı bireylerin ait olmadıkları alt seksiyona ait bireylerle birlikte gruplandığı gözlenmiştir. Örneğin, Manhattan mesafesi değerlerine göre oluşturulan phylogram ağacında *P. leucophracta x lunariifolia* (1529) ata bireylerinden herhangi biri olmayan *P. capitata*'ya (1984) bağlanmıştır. 1530 kodlu *P. leucophracta x lunariifolia* melezi ise diğer altseksiyondan bir gruba tabandan bağlanmıştır. *P. bourgaei x chimera* (1524) melezi odunsu bireylerden oluşan *Dendrophlomis* alt seksiyonuna aitken, *Gymnophlomis* alt seksiyonuna ait sarı çiçekli ve otsu *P. linearis* (1335-1) ve *P. kurdica* (1989) türlerinin oluşturduğu monofiletik gruba tabandan bağlanmıştır (Şekil 3.1).

4.2. Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, *Phlomis* cinsine ait örneklerde yapılmış olan kloroplast DNA'sı *trnT-trnL* bölgesi analizi, örneklerin genellikle altseksiyonlarına uygun olarak gruplandığını göstermektedir. Dış grubun ayrılıyor olması markırın cins düzeyinde ayırım

yapabileceğini göstermektedir. Melezlerin bir kısmı morfolojik olarak ataları varsayılan türlerle bir arada gruplanırken, atalarıyla bir arada gruplanmayan melez örnekleri de mevcuttur. Network analizleri örneklerimizin evrimsel tarihinde retikülat olaylar olduğuna işaret etmektedir. Filogenetik ağaç ve filogenetik network analizleri paralellik göstermektedir. Morfolojik veriler de moleküler verilerle paralellik göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Huber-Morath, A., 1982. *Phlomis* L. In Flora of Turkey and Aegean Islands, Davis, P. H. (Ed), Edinburg Univ. Press., Vol. 7, Edinburg. 1965-1982, Pp. 102-126.
2. Dadandı, M. Y., 2002. Türkiye'nin *Phlomis* L. (*Lamiaceae*) Cinsi Revizyonu, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
3. Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., 1988. Flora of Turkey and East Aegean Islands Supplement I, Davis P. H.(Ed) Edinburg Univ. Press., Vol. 10, Edinburg, Pp; 474-505.
4. Baytop. T., 1994. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Ankara.
5. Coombes, A. J., 2002. The A to the Z Plant Names, Timber Press, USA, Pp. 312.
6. Baytop. T., 1984. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, İst. Üniv. Yay., No. 3255, İstanbul.
7. Baytop, T., 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey, Past and Present, 2nd ed, Nobel Tıp Basımevi, İstanbul, Turkey, ISBN: 9754200211, 193 p.
8. Gürbüz, I., Üstün O., Yeşilada, E., Sezik, E., Kutsal, O., 2003. Anti-ulcerogenic activity of some plants used as folk remedy in Turkey, **Journal of Ethnopharmacolgy, Vol 88, no: 1:** 93-97.
9. Azizian, D., Moore, D. M., 1982. Morphological and palynological studies in *Phlomis* L., *Erumostachys* Bunge and *Paraphlomis* Prain (*Labiatae*). **Botanical Journal of Linnean Society, Vol. 185:** 225-248.
10. Moench, C., 1794. Methods Plantas Horti Botanici et Agri Marburgensis a Stramium Situ Describendi. Marburgi Cattorum, Marburg, Germany.
11. Hedge, I.C., 1986. Labiatae of south-west Asia: diversity, distribution and endemism. **Proceedings of the Royal Society of Edinburg, Vol. 89B,** 23-35.
12. Arnold, M. L., 1997. Natural Hybridisation and Evolution. Oxford Universty Press, New York, New York, USA.
13. Rieseberg, L. H., Carney, S. E., 1998. Tansley Review No. 102 Plant Hybridization, **New Phytologist. 140,** 599-624.

14. Whitham, T. G., Martinsen, G. D., Floate, K. D., Dungey, H. S., Potts, B. M., Keim, P., 1999. Plant hybrid zones affect biodiversity; tools for a genetic-based understanding of community structure. **Ecology** **80**: 416-428.
15. Arnold, M.L., Hodges, S. A., 1995. Arenatural hybrids fit or unfit relative to their parents?, **Trends in Ecology and Evolution** **10**: 67-71.
16. Seehausen, O., 2004. Hybridisation and adaptive radiation. **Trends in Ecology and Evolution** **19**: 198-207.
17. Albaladejo, R.G., Aguilar, J.F., Aparicio, A., Feliner, N.G., 2005. Contrasting nuclear-plastidial phylogenetic patterns in the recently diverged Iberian *Phlomis crinita* and *P. lychnitis* lineages (*Lamiaceae*), **Taxon**, **54** (4):987-998.
18. Pan, Y.Z., Fang, L.Q., Hao, G., Cai, J., Gong, X., 2009. Systematic positions of *Lamiophlomis* and *Paraphlomis* (*Lamiaceae*) based on nuclear and chloroplast sequences, **Journal of Systematics and Evolution**, **47**, 535-542
19. Yüzbaşıoğlu, E., Dadandı, M. Y., 2008. Phylogenetic relationship among species of the subsection *Dendrophlomis* Benthams, **Electronic Journal of Biotechnology**, **Vol. 11**, No:4, 1-9.
20. Yüzbaşıoğlu, E., Dadandı, M.Y., Özcan, S., 2008. Natural hybridization between *P. lycia* D. Don x *P. bourgaei* Boiss., (*Lamiaceae*) revealed RAPD markers, **Genetica**, **133**, 13-20.
21. Dadandı, M.Y., Yüzbaşıoğlu, E., Duman, H., Özcan, S., *P. x termesi* P.H. Davis (*P. bourgaei* Boiss. x *lycia* D. Don) Taksonunun Morfolojik ve Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi, XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-24 Haziran 2004, Adana, 5. Seksiyon, pp.94
22. Yüzbaşıoğlu, E., Dadandı, M. Y., Özcan, S., 2009. Estimation of phylogenetic relationship of *Phlomis* species based on seed protein polymorphism. **Electronic Journal of Biotechnology**, ISSN: 0717-3458, **Vol. 12 No. 2**. Pp. 1-9.
23. Evren, Ö. H., 2012. *Phlomis kurdica* ve *P. oppositiflora* Türlerinde Tür İçi Genetik Varyasyonun Belirlenmesi ve *P. x melitenense*'nin Melezliğinin Moleküler Yönden İncelenmesi. Akdeniz Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, 191 s.

24. Sezer, G., 2012. *Phlomis physocalyx* ve *P. oppositiflora* Türlerinde Tür İçi Genetik Varyasyonun Moleküler Düzeyde Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 243 s.
25. Palmer, J. D., 1985. Chloroplast DNA and molecular phylogeny, **BioEssays Vol. 2**, No: 6, Pp. 263-267.
26. Palmer, J. D. 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation, **The American Naturalist, Vol. 130 (suplement)**, Pp: 6-29.
27. Hansen, A. K., Escobar, L. K., Gilbert, L. E., Jansen, R. K., 2007. Paternal, maternal and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (*Passifloraceae*): Implications for phylogenetic studies, **American Journal of Botany, 94** (1): 42-46.
28. McCauley, D. E., Sundby, A. K., Bailey, M. F., Welch, M. E., 2007. Inheritance of chloroplast DNA is not strictly maternal in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae): Evidence from experimental crosses and natural populations, **American Journal of Botany 94** (8): 1333-1337.
29. Taberlett, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology 17**: 1105-1109.
30. Riggins, C., 2008. Molecular Phylogenetic and Biogeographic Study of the Genus *Artemisia* (*Asteraceae*), with an Emphasis on Section *Absinthium*. Doktora Tezi, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois. 294 p.
31. Metcalfe, C.R., Chalk, L., 1950. Anatomy of the Dicotyledones. Oxford University Press, Londra, 2, 1041 pp.
32. Seçmen , Ö., Gemici, Y., Görk, G., Behçet, L., Leblebici, E., 2004. Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 582.1, s : 276.
33. Taylor, J. M., 1998. *Phlomis*, the Neglected Genus, a Guide for Gardeners and Horticulturists. National Council for the Conservation of Plants and Gardens, Colouster, England. ISBN: 0953241300, Pp. 387.

34. Aparicio, A., Albaladejo, R. G., Porras, M., Ceballos, G., 2000. Isozyme evidence for natural hybridisation in *Phlomis* (*Lamiaceae*): Hybrid origin of the Rare *P. x margaritae*, **Annals of Botany**, **85**: 7-12.
35. Demirci, B., Başer, K. H., Dadandı, M. Y., 2004. Composition of the Essential Oils *Phlomis rigida* Labill. And *P. samia* L. 35th International Symposium on Essential Oils (USEO2004), Pp.133, September29-October2, Messina, Italy.
36. Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. (edlr), 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), Nezehat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.
37. Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., 2000. Red Data Book of Turkish Plants (Pteridophyta and Spermatophyta). TTKD and Van Centennian Universty Press, Ankara, Turkey, ISBN: 975-93611-0-8: 100-171.
38. Dafini, H., Lensky, Y. And Fahn A., 1988. Flower and nectar characteristics of nine species of Labiate and their influence on honeybee visits, **Journal of Apicultural Research**, **27**, 2, 103-114.
39. Petnidou, T., 1996. Labiatae: A key family for wild bees and the pollination ecology in mediterranean phryganic communities, **Lamiales Newsletter Iss**, **4**, 4-6.
40. Burke, J.M., 2000. Hybrids and Hybridization, Plant Sciences for Students, Macmillan, USA, New York. Pp: 32-35.
41. McDade, L. A., 1992. Hybrids and phylogenetic systematics II: The impact of hybrids on cladistic analyses, **Evolution**, **(46)** 5: 1329-1346.
42. Paun, O., Forest, F., Fay, M. T., Chase, M. W., 2009. Hybris Speciation in angiosperms: Parental divergence drives ploidy, **New Phytologist**, **182**: 507-518.
43. Mallet, J., 2005. Hybridisation as an invasion of genome, **Trends in Ecolgy and Evolution** **20** (5): 229-237.
44. Arnold, M. L., 1992. Natural hybridisation as an evolutionary process. **Annual Review of Ecology and Systematics** **23**: 237-261.

45. Rieseberg, L. H., 1997. Hybrid origin of plant species. **Annual Review of Ecology and Systematics** **28**: 359-389.
46. Grant, V., 1971. Plant Speciation. Columbia University Press, New York, USA.
47. Levin, D. A., Francisco-Ortega, J., Jansen, R. K., 1996. Hybridisation and the extinction of rare plant species, **Conservation Biology** **10**: 10-12.
48. Karcicio, M., 2006. Analysis of Genetic Diversity in Landraces of Macaroni Wheat (*Triticum durum* Desf.) by RAPD Technique, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
49. Moritz, C., Hillis, D.M., 1990. Molecular Systematics: Context and Controversies, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, Pp. 1-16.
50. Özcan, S., Gürel, E., Bababoğlu, M., 2004. Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi, Konya.
51. Bretting, P. K., Widrechner, M. P., 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management, **Hortscience**, **30** (7), 1329 – 1356.
52. Weising, K., Nybom, H., et al., Wolffe, K., Meyer, W., 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi, CRC Press, Pp. 12 – 13, Boca Raton, FL.
53. Kephart, S. R., 1990. Starch electrophoresis of plant isozymes, a comparative analysis of the techniques, **American Journal of Botany**, **77**, 693-712.
54. Sataub, J. E., Serquen, F. C., Gupta, M., 1996. Genetic markers map construction and their application in plant breeding, **Hortscience**, **31** (5), 729-741.
55. Tanksley, S. D., 1983. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Reporter**, **11**, 3-8.
56. Schlotterrer, C., 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?, **Nature Reviews Genetics**, **5**: 63-69.
57. Joshi, S. P., Gupta, V. S., Aggarwal R. K., Ranjekar, P. K., Brar, D. S., 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*, **Theoretical and Applied Genetics**, **100**: 1311-1320.

58. Kesawat, M. S., Das, B., K., 2009. Molecular Markers: It's application in crop improvement, **Journal of Crop Science and Biotechnology** 12 (4): 169-181.
59. Filiz. E., Koç. İ., 2011. Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler, **GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi**, 28 (2), 207-214.
60. Saiki R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., 1988. Primer directed enzymatic amplifications of DNA with a thermostable DNA polymerase, **Science**, 239, 487-491.
61. XU, D. H., Kanazawa, J. A.A., Gai, J.Y., and Shimamoto, Y., 2001. Identification sequence variations by PCR-RFLP, and its application to the evolution of cpDNA diversity in wild and cultivated soybeans, **Theoretical Applied Genetics**, 102 (5): 683-688.
62. Gupta, P. K., Chyi, Y.-S., Romero-Severson, J., Owen, J. L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using simple primers of simple sequence repeats, **Theoretical Applied Genetics**, 89, 998-1006.
63. Ergül, A., 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. Cvs) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon, Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi, Ankara.
64. Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi II – Genetik mühendisliği ve Uygulamaları, S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu (eds), Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
65. Walton M., 1993. Molecular markers: Which ones to use?, **Seed World**, July, 23 – 29
66. Backeljau, T., Bruyn, L. D., Wolf, H. D., Jordaens, K., Dongen, S. V., Verhagen, R., Winnepenninckx, B., 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods, **Cladistic**, 11, 119-130.
67. Gülşen O., Mutlu N., 2005. Bitki biliminde kullanılan Genetik Markerlar ve Kullanım Alanları, **Alatarım**, 4/2, 27-37.
68. Karşlı, T., Karabağ, K., vd. DNA Marker Yöntemleri ve Hayvancılıkta Kullanımı, 100. Yıl Üniversitesi, Van, II. Ulusal Zootehni Öğrenci Kongresi, Mayıs 2006.

69. Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA. Pp: 176-187.
70. Godwin ID, Aitken AB, Smith L. W., 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics, **Electrophoresis**, **18**, 1524-1528.
71. Paran, I., Michelmore, R.W., 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, **Theoretical and Applied Genetics**, **85**, 985-993.
72. Alvarez, I., Wendel, J. F., 2003. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetic inference, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, **29**, 417-434.
73. Poczai, P., Hyvönen, J., 2010. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: Problems and prospects, **Molecular Biology Reporter**, **37**, 1897-1912.
74. Curtis, S. E., Clegg, M. T., 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. **Molecular Biology and Evolution** **1**: 291-301.
75. Wolfe, K. H., 1991. Protein-coding genes in chloroplast DNA: Compilation of nucleotide sequences, data base entries and rates of molecular evolution, 467-482. *In*: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 7B (Eds: L. Bogorad and I. K. Vasil). Academic Press, New York, USA.
76. Gaut, B. S., 1998. Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants, 93-120. *In*: *Evolutionary Biology*, Vol. 30 (Eds: M. K. Hech, R. J. MacIntyre, M. T. Clegg). Plenum Press, New York, USA.
77. Perry, A. S., Wolfe, K. H., 2002. Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat, **Journal of Molecular Evolution** **55**: 501-508.
78. Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu. W, Miller, J. Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E., Small, R. L., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis, **American Journal of Botany** **92** (1): 142-166.

79. Wakasugi, T., Sugita, M., Tsudzki, T., Sugiura, M., 1998. Updated gene map of tobacco chloroplast DNA, **Plant Molecular Biology Reporter** **16**: 231-241.
80. Borsch, T., Hilu, K. W., Quandt, D., Wilde, V., Neinhuis, C., Barthlott, W., 2003. Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. **Journal of Evolutionary Biology** **16**: 558-576.
81. Fukuda T., Yokoyama, J., Tsukaya, H., 2003. Phylogenetic relationships among species in the genera *Chisocheton* and *Guarea* that have unique indeterminate leaves as inferred from sequences of chloroplast DNA. **International Journal of Plant Sciences** **164**: 13-24.
82. Downie, S. R., Katz-Downie, D. S., Cho, K-J., 1996. Phylogenetic analysis of *Apiaceae* subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast *rpoC1* intron, **Molecular Phylogenetics and Evolution** **6**: 1-18.
83. Small, R. L., Ryburn, J. A., Cronn, R. C., Seelanan, T., Wendel, J. F., 1998. The tortoise and the hare: Choosing between noncoding plastome and nuclear *ADH* sequences for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group, **American Journal of Botany** **85** (9): 1301-1315.
84. Zülal, A., 2001. İnsan Genomu, Kalıtım Şifresinin Peşinde 136 Yıl, Tübitak Yayınları, Mart; s. 5-11.
85. Maxam, A., Gilbert, W., 1997. A new method of sequencing DNA, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **74**: 560-564.
86. Sanger, F. N. S., Coulson A. R., 1977. DNA sequences with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **74**: 5463-5467.
87. Sambrock, J. F., E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular clonning, a laboratory manual. 2.nd edn., Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, Pp. 2.60-2.80.
88. Saraç, Ö. S., Alan, Ö., Bahçeci, E., Leblebicioğlu, K., 2003. Genetik algoritmayla çoklu dizi hizalama (Multiple sequence alignment using genetic algorithms), signal processing and communications applications assembly (SIU), Koç University, İstanbul, Pp. 1-3.

89. Edgar, R. C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, **Nucleic Acids Research** **32** (5): 1792-1797
90. Edgar, R. C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity, **Bioinformatics** **5** (1)
91. Brinkmann, F.S.L, Leipe, D. D, 2001. Chapter 14: Phylogenetic Analysis, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Second Edition, 0-471-38390-2. Pp. 323-359.
92. Saitou N., and Imanishi, T., 1989. Relative efficiencis of the fich-margoliash, maximum parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution and neighbour-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. **Molecular Biology and Evolution** **6**: 514-525.
93. Gregory, T. R., 2008. Understanding evolutionary trees, **Evolution: Education and Outreach**, **1**:121-137.
94. Meng, C., 2008. Phylogenetic Models for Hybridisation in a Coalescent Framework, PhD Thesis, The Universty of New Mexico, Pp 105.
95. Posada, D., Crandon, K., 2001. Intraspecific gene genelogies: Trees getting into networks, **Trends in Ecology and Evolution** **16**: 37-45.
96. Hallet, M., Lagergren, J., 2000. New algorithms for the duplication-loss model, 138-146. *In: Proceedings of the fourth annual international conference on computational molecular biology* (Eds: R. Shamir, S. Miyano, S. Istrail, P. Peuzner, M. Watermann). ACM press, New York, USA.
97. Durand, D., Halldorsson, B. V., Vernot, B., 2004. Hybrid micro-macroevoolutionary approach to gene tree reconstruction, 240-264. *In: Lecture Notes in Computer Science Vol. 3500* (Eds: R. Shamir, S. Miyano, S. Istrail, P. Peuzner, M. Watermann). Springer-Verlas, Berlin, Germany.
98. Templeton, A. R., Crandall, K. A., Sing, C. F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequences data III, **Cladogram Estimation Genetics**, **132**: 619-633.

99. Fitch, W. M., 1997. Networks and viral evolution, **Journal of Molecular Evolution** **44**: 565-575.
100. Legendre P. and Makarenkov., 2002. Reconstruction of biogeographic and evolutionary networks using reticulograms, **Systematic Biology** **51**: 199-216.
101. Huson, D. H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, **Molecular Biology and Evolution**, **23**(2):254-267.
102. Morrison D., 2005. Networks in phylogenetic analysis: New tools for population biology. **International Journal for Parasitology** **35**: 567-581.
103. CodonCode Corporation, www.codoncode.com
104. Tamura K, Stecher G., Peterson D, Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** **30**: 2725-2729.
105. Rozas, J., 2009. DNA Sequence Polymorphism Analysis Using DnaSp, 337-350. *In* Posada, D. (ed.) Bioinformatics for DNA Sequence Analysis, Methods in Molecular Biology Series Vol. 537. Humana Press, New Jersey, USA.
106. 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.
107. Rohlf, F. J., 1992. NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.7., Applied Biostatistics Inc., 10 Inwood Road, Port Jefferson, New York 11777.
108. Bentham, G., 1834. Labiatarum Genera et species, London, p:323-644.
109. Tamura K., Nei M., and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method, **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)** **101**:11030-11035.
110. Carrodus, S. K., 2009. Identification and the Role of Hybridisation in New Zealand *Pittosporum*, Yüksek Lisans Tezi, The University of Waikato, Yeni Zelanda, 150 p.

111. Barber, J. C., Francisco-Ortega J., Santos-Guerra A., Turner K. G., Jansen R. K., 2002. Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: *Lamiaceae*) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets, **Molecular Phylogenetics and Evolution** **23**: 293-306.

EKLER

EK 1. *Phlomis* örneklerinde incelenen morfolojik karakterlere ait ölçüm değerleri

Örnek Numarası	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
1201-2	57	5	5,5	4	9	1	2	7	4	7	0,6	2		1	5	0,2	1		1,5	1	0	1	3
1226-2	25,5	1		3	3	1	1	2	2	3,1	1,4	2	1	3,5	3,5	1,2	1	1,2	1,3	0	1	1	
1257	4,6	11	6	2	7	1	3	6						1,2	6	0,4	2		1	0	0	1	3
1262-1	41	2	6,5	2	5	1	2	2	3	4,5	1,8	3		1,2	3	0,4	2		1,2	0	0	1	2
1272	22	2	5,5		5		2	2	2	4		2	2	2,5	5	0,7	2		1,5	1	0	2	3
1274	20	2	5	3	8	1	3	4											1,5	1	0	2	3
1274-2	38	2	7	2	9	1	5	5						3,5	5	0,8	2		1,8	1	1	2	3
1278-1	51	2	8						6	9	2,4	5	1,5	4	7	1,5	3		1,6	1	0	1	3
1280-1	39	2	9						3	3	1,8	2	0,5	2,5	2,5	1,4	1	0,5	1,1	0	0	1	2
1334	22	5	2,8	2	3		1	3		3,2		1	1	1	2,2	0,6	1	0,5	0,8	0	0	0	
1335-1	31	3	3	2	7	1	1	6	6	6	1,1	1	2,5	2	6,5	0,4	1	1	1	1	0	1	2
1363-1	33	3	7,5	3	10	0	2	3	1	0,5	1,4	1	1	2,7	8	0,4	1	0,5	1,2		1	2	2
1367-1	25	4	4,2	3	7	1	2	5	5	5	1,1	1	0,7	2	3,8	0,6	1	0,2					
1371	37	5	4,5	5	7	1	2	7	5	6	1,6	2	1	1,4	4	0,5	2	0,5	1	1	0	1	3
1382	44	3	3,5	2	8	1	3	6	6	5,5	2	2		1	2	0,5	1		1,1	0	0	0	3
1504	29	2	7	2	3	1	1	2	2	5	0,6	3		2,5	4,5	1,5	2		1,3	0	0	1	3
1508	28	2	4	1	5	0	1	2	3	4,7	1,5	2	1,5	1,5	2	0,7	1	0,7	1	1	0	1	2
1522-6	26	2	2,5	1	4	1	2	2	2	2	1,6	2	0,5	1	2,5	0,5	2		1,5	1	1	2	3
1524	32	2	4,5	2	4	1	2	2	3	3,5	1,8	2	2	1,5	4	0,7	2		1,5	1	1	2	3
1526-1	45	1		1	8	1	2	7	5	6	1,5	2	2	3,5		1			1,2	0	1	2	2
1527-1	28	1		4	7	2	3	3	2	3,5	0,8	4	4	2,5	6	1	4	2	1,2	0	1	2	
1529	23	2	5,5	3	8	1	2	3	3	3,5	2,5	4	2	2,5	5	0,8	1	1	1,5	1	1	2	3
1530	30	2	3,5	3	6	1	3	2	2	2,5	2	3	1	2	3,5	1	1		1,6	1	1	2	3
1538-2	50	2	10	2	5	1	2	2	1	6	0,4	4	1,5	3	5,5	1,2	2	1	1	0	0	1	2
1541-1	34	2	4,5	2	6	1	2	5	3	4	2,5	3	2	2,5	4	1	2		1,5	1	0	1	3
1564	54	6	4	2	8	1	4	7	3	9	1,5	4	8	1,5	5	0,5	3		2	1	1	2	2
1600	39	7	3,5	3	7	2	3	5	4	6	2	3	1,5	2	3,5	0,8	2		1,5	1	1	0	3
1602	53	5	4,5	4	8	2	5	7	2	8	0,8	3	2	2	4,5	0,6	3		1,3	0	1		3
1676	40	2	4	2	6	1	3	3	2	4	1	3	3	3	4,5	1	2		1,3	0	1	2	3
1677	25	2	2,5	1	3	1	2	2	2	2	1	1	1	2	3	1	2	0,5	1	0	1	1	
1689-1	19	5	2	1	2	0	1	3	1	3,2	0,3	2	0,5	1	2,5	0,5	1	0,5	0,8	0	0	0	2
1694	85	4	4,5	3	5	1	2	5	2	5	1,5	3		1,5	3	0,6	1		1,2	0	0	0	2
1739	76	4	3	3	16	2	5	8	2	10	0,4	3	2,2	1,2	2,4	0,4	1	0,6	1	0	0	1	
1750	39	4	3	2	4	1	2	2	3	4	1,4	2	0,5	1,4	2,4	0,5	1	0,7	1	0	0	0	3
1926-9	91	4	2	4	9	1	4	9	2	10	0,6	3	4,5	2	5	0,8	2	0,8				0	
1927	43	5	5							7		3	1,2	3	7,2	0,6	2	1,2	1	0	0	2	2
1932-3	57	3		2	7	2	3	9	2	7,8	1	3	2,5		1,7		1	0,4				0	
1958-24	39,5	7	5	1	11	0	2	11	5	8,4	0,8	1	2,2	2,2	8,7	0,3	1		1,3	2	1	1	3
1961-6	46	6	7,5	3	9	0	1	6	2	11,3	0,3	1		1,3	7,1	0,2	1		1,5	1	0		
1962-3	54	5	9,7	4	8	0	1	3	10	10,5	0,4	1		2,2	8,3	0,2	1		1,5	0	0	0	3
1984	28,5	4	4	2	5	1	2	8	2	2,5	0,9	1	0,8	1,3	3	0,4	1	1,2	1	1	0	1	2
1985-10A	60	6	5,5	2	10	1	4	9	2	9,8	0,7	3	3	1,7	5	0,6	2	1,5	1,7	1	1	1	3

1985-25	51	4	6	3	11	0	3	8	2	6,7	0,7	2	1,2	1,7	3,3	0,5	1	0,8	1,6	1	31	0	3
1988	53	7	3,5	3	11	1	2	7	3	4,5	0,3	1		1,3	3	0,2	1		2	1	0		3
1989	31	4	3	2	7	1	3	7	4	4,3	2,3	3	1	1,2	3,3	0,3	2	0,6	1,7	1	1	1	3

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı: Fadime Öztoprak

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 27 Mayıs 1986, Şarkışla

Medeni Durumu: Bekâr

Tel: +905546121530

email: fadimeoztoprak@gmail.com

Yazışma Adresi:

Eğitim

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	EÜ FEF Biyoloji	2008
Lise	Şarkışla Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimleri

Yıl	Kurum	Görev
2012 - 2014	Özel Side Anadolu Hastanesi	Yardımcı Sağlık Personeli

Yabancı Dil

İngilizce