

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**Türkiye'deki Echinops L. (Asteraceae) cinsi taksonlarının nüklear ribosomal
DNA ve kloroplast DNA dizileri kullanarak filogenetik analizi ve DNA
barkodlaması**

FBA-11-3561

ProjNormal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Cem VURAL
Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Araştırmacının Adı Soyadı

Doç. Dr. Servet ÖZCAN
Öğr. Gör. Handan ŞAPCI
Yl. Öğr. Gülsün GÜÇLÜ

Temmuz 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı FBA-11-3561 nolu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz. Ayrıca bu proje kapsamında Tubitak TBAG-106T526 nolu proje kapsamında toplanılan örneklerden de yararlanılmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	4
3.1. Çalışma Materyalinin elde edilmesi	4
3.2. Toplanan örneklerle ait dokulardan total DNA eldesi:	4
3.3. Nükleer ribosomal DNA ve kloroplast DNA gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması	5
3.4. DNA barkodlaması	7
3.5. PCR ile çoğaltılan bölgelerin DNA dizi analizleri	8
3.6. Sekans analizi ve verilerin değerlendirilmesi	8

ÖZET

Bu çalışmada, bir nüklear ribosomal DNA (ITS) ve üç farklı kloroplast DNA (*rbcL*, *trnL-trnF*, *MatK*) gen bölgelerinin dizi analizleri kullanarak Türkiye *Echinops* cinsi türlerinin genetik yapısının belirlenmesi, türlerin birbirleriyle olan filogenetik ilişkilerinin araştırılması ve taksonomik durumlarının moleküler tabanlı olarak yeniden değerlendirilmesi, *MatK* ve *rbcL* gen bölgeleri kullanılarak *Echinops* cinsine ait türlerin taksonomistler ve nadir türlerin korunması ile yasadışı ticaretinin önlenmesi içinde önem arz eden DNA barkodlamasının yapılması amaçlanmıştır.

Kloroplast ve nüklear DNA dizi analizleri için gerekli total DNA, *Echinops* örneklerine ait yaprak dokularından elde edilmiştir. Total DNA'lar kullanılarak hedeflenen gen bölgelerinin (kloroplast DNA *matK*, *rbcL*, *trnL-trnF*, nüklear ribosomal DNA ITS), PCR ile çoğaltılması işlemi yapılmıştır. *Echinops* taksonlarına ait örnekleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için JC baz değişim modeli kullanılarak NJ ve bayesian ağacı elde edilmiştir.

Türkiye *Echinops* taksonlarının DNA barkodlarının belirlenebilmesi amacıyla evrensel çekirdek barkod olarak kabul edilen cpDNA *matK* (719 bp) ve *rbcL* (1091 bp) gen bölgeleri birlikte değerlendirilerek analizler yapılmıştır.

Echinops cinsinin Türkiye' deki taksonları için ortaya konmuş sınıflandırmanın seksiyon ve tür ayrımlarında, DNA dizilerine göre oluşturulan filogeniye uymadığı görülmektedir. Ayrıca morfolojik olarak da farklılık gözlemlenen *E. sphaerocephalus* türünün iki varyetesi iki farklı tür olarak ayrılmaktadır. Benzer şekilde *E. pungens* türüne ait olan tür altı taksonlar da ayrı türler olarak dendogramda yer almaktadır. Sonuç olarak DNA verileri göz önüne alındığında bu taksonların tür seviyesine yükseltilmesinin daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Compositae, *Echinops*, DNA Barkodlama, ITS, *rbcL*, *trnL-trnF*, *MatK*

ABSTRACT

In this study, It is aimed to determine the genetic structure of *Echinops* taxa; investigate the phylogenetic relationships among taxa and re-evaluation taxonomic status of the genus due to nuclear ribosomal DNA (ITS) and chloroplast DNA (MatK) gene sequence analysis, to investigate the phylogenetic relationships of the species and to re-evaluating the taxonomic status of species based on molecular data and also In addition, taxa belonging to the genus *Echinops* will determine barcode which is so important for taxonomists and prevention studies of illicit trade with protection of rare species.

Total DNA required for chloroplast and nuclear DNA sequencing was extracted from leaf tissue on *Echinops* examples. Targeted gen regions (chloroplast DNA *matK*, *rbcL*, *trnL-trnF*, nuclear ribosomal DNA ITS) was amplified using total DNA. To determine the phylogenetic relationships among *Echinops* taxa was obtained the NJ and Bayesian

cpDNA *MatK* (719 bp) and *rbcL* (1091 bp) gene regions accepted universally core barcode were analyzed to determine DNA barcoding of Turkish *Echinops* taxa,

Classification revealed for section and species distinctions of *Echinops* taxa in Turkey is different phylogenetic based on DNA sequences. in our study, not only morphological, but also molecular findings shows *E. sphaerocephalus* is not as subspecies of *E. sphaerocephalus* and should be evaluated on its own as a separate species. Similarly, the varieties belonging to *E. pungens* was located separately in the dendogram. Consequently, the findings of this study show some of taxa should be correct evaluation in species level.

Keywords: Compositae, *Echinops*, DNA Barcoding, ITS, *rbcL*, *trnL-trnF*, *MatK*

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Echinops L. cinsi dünya üzerinde 125 ila 130 kadar türle temsil edilmektedir. Çoğunlukla kuzey yarıkürede olmak üzere, bütün dünya'da geniş yayılım göstermektedir. Yaygın olarak da, tropik Afrikanın yarı nemli alanları, Kuzey Afrika'nın yarı kurak alanları, Akdeniz havzası ve Orta Asya'ya kadar Avrasya'nın ılıman kuşağında yayılım göstermektedir. İran-Turan fitocoğrafya elementi olan ve genel olarak birkaç tek yıllık tür dışında çok yıllık bir cins olan *Echinops* cinsinin ülkemizde son çalışmalara göre 28 taksonu yayılım göstermektedir.

Dünya genelinde geniş bir yayılım alanına sahip olmasına rağmen *Echinops* cinsinin taksonomik durumu mevcut türlerin sayısı bakımından hala tartışmalıdır. Bu tartışmalı durum ülkemiz *Echinops*'ları için de geçerlidir. Morfolojik verilere göre yapılmış çalışmalarda ülkemiz taksonları ile ilgili pek çok değişiklik yapılmıştır.

Bu çalışmada, bir nüklear ribosomal DNA (ITS) ve üç farklı kloroplast DNA (*rbcL*, *trnL-trnF*, *MatK*) gen bölgelerinin dizi analizleri kullanarak Türkiye *Echinops* cinsi türlerinin genetik yapısının belirlenmesi, türlerin birbirleriyle olan filogenetik ilişkilerinin araştırılması ve taksonomik durumlarının moleküler tabanlı olarak yeniden değerlendirilmesi, *MatK* ve *rbcL* gen bölgeleri kullanılarak *Echinops* cinsine ait türlerin taksonomistler ve nadir türlerin korunması ile yasadışı ticaretinin önlenmesi içinde önem arz eden DNA barkodlamasının yapılması amaçlanmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada elde edilen DNA dizi verileriyle dünyanın çeşitli bölgelerindeki araştırmacılar tarafından gen bankasında depo edilen veriler birleştirilerek *Echinops* cinsinin evrimsel geçmişi ve filocoğrafyasının belirlenmesine katkı sağlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Compositae, *Echinops*, Gen Barkodlama, ITS, *rbcL*, *trnL-trnF*, *MatK*

2.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

Echinops L. cinsi toplam 125 ila 130 kadar türle temsil edilmektedir. Çoğunlukla kuzey yarıkürede olmak üzere, bütün dünya'da yoğun olarak da, tropik Afrikanın yarı nemli alanları, Kuzey Afrika'nın yarı kurak alanları, Akdeniz havzası ve Orta Asya'ya kadar Avrasya'nın ılıman kuşağında yayılış göstermektedir. Genel olarak, birkaç tek yıllık tür dışında çok yıllık bir cinstir [1, 2]. İran-Turan fitocoğrafya elementi olan tek türe sahip cins *Acantholepis* Less. ile yakın akrabadır. Hatta bazı araştırmacılar *Acantholepis* cinsine ait olan tek türü, *Echinops* cinsine ait bir tür olarak sınıflandırmaktadırlar [3].

Davis'in editörlüğünü yaptığı "*Türkiye Florası*"nda *Echinops* cinsini yazan Hedge'e göre ülkemizde 16 tür, (tür altı taksonlarla beraber 21 takson) bulunurken; 1992 yılında Gemici ve Leblebici tarafından ülkemizden bir yeni tür daha ülkemizden tanımlanmıştır [4,5]. Türkiye *Echinops* cinsi taksonlarını konu alan en son çalışma ise 2010 yılında sonuçlanmış ve proje yöneticisine ait bir Tübitak Projesidir (TBAG-106T526). Bu proje kapsamında şu sonuçlar elde edilmiştir:

Echinops seksiyonuna ait *E. sintenisii* Freyn ve *E. pannosus* Rech. fil. taksonları sırasıyla *E. ossicus* ve *E. heterophyllus* P.H.Davis'un sinonimi yapılmıştır.

Ülkemiz için endemik olarak belirtilen *E. vaginatus* Boiss. & Hausskn., türünün endemik olmadığı tespit edilmiştir.

Şüpheli kayıt olarak bilinen taksonlardan, *E. kurdicus* Boiss.&Hausskn.'un ülkemizde bulunmadığı ve İran'ın orta kesiminde yüksek dağlara endemik olduğu; *E. bicolor* Náb.'un ise ülkemizde var olduğu ancak literatür kayıtlarına göre *E. phaeocephalus* Hand.-Mazz.'un sinonimi olduğu belirlenmiştir.

Echinops adenocaulos Boiss., *E. chardinii* Boiss. & Buhse *E. gaillardotii* Boiss., *Echinops ritrodes* Bunge ve *E. tenuisectus* Rech. f. türleri ülkemiz için yeni kayıt olarak belirlenmiştir.

Bilim dünyası için yeni ve *E. dumanii* C. Vural, *E. antalyensis* C. Vural, *E. borae* C. Vural ismi verilen üç tür belirlenmiştir. Bu türlerden *E. dumanii*'ye ait makale yayınlanmış diğer ikisi ise yayınlanma aşamasındadır [6].

Morfolojik verilere göre yapılmış bu çalışmalarda Ülkemiz taksonları ile ilgili pek çok değişiklik yapılmıştır. Bu değişiklikler ve yeni kayıtlar ile yeni türlerin *Echinops* taksonları

içerisindeki filogenetik yerini tespit etmek, ülkemiz taksonlarının genetik yapısını belirlemek ve taksonomik durumlarının moleküler tabanlı olarak yeniden değerlendirilmesi için moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

Cinsin filogenisi ile ilgili bazı moleküler tabanlı yayınlar bulunmasına rağmen; bu makalelerde Asteraceae familyasından çeşitli cinsler de dâhil edilerek, ülkemizden oldukça sınırlı sayıda tür genellikle farklı primerler kullanılarak çalışılmıştır. Bu çalışmalarda da asıl amaç büyük taksonomik grupların filogenisinin belirlenmesidir. Adı geçen çalışmaları şu şekilde özetleyebiliriz:

Panero ve Funk (2008), içerisinde *Echinops* cinsinin de yer aldığı Asteraceae familyasına ait bazı taksonların, 10 kloroplast DNA bölgesi dizilerini belirleyerek bu familyanın büyük kladlarının (soy hatlarının) filogenetik analizini yapmıştır [7]. Susanna ve ark. (2006), Cardueae tribusuna dahil olan *Echinops* ve bazı diğer cinslerin ITS, MatK ve *trnL-trnF* dizilerini analiz ederek moleküler açıdan bu tribusun filogenisini incelemiştir [8]. Garcia-Jacas ve ark. (2002), Asteraceae familyasına ait 34 cinse ait bazı türlerin ITS ve MatK gen dizileri birlikte değerlendirilerek familyanın filogenisi hakkında değerlendirmeler yapmışlardır [9].

Bu çalışmada nüklear ribosomal DNA (ITS) ve kloroplast DNA gen (*rbcL*, *trnL-trnF*, MatK) dizi analizleri yardımıyla Türkiye *Echinops* cinsi türlerinin genetik yapısı belirlenerek türlerin birbirleri ile olan filogenetik ilişkilerinin araştırılarak, *Echinops* türlerinin sistematik ve evrimsel tarihi hakkında yeni bakış açıları sağlanması ile birlikte taksonomistler ve nadir türlerin korunması ve yasadışı ticaretinin önlenmesi içinde önem arz eden her taksonun DNA barkodunun belirlenmesi sağlanacaktır. Bunlardan başka Türkiye'nin biyolojik çeşitliliğine, çevre ve canlı koruma stratejilerine, çalışılan taksonlar seviyesinde ciddi anlamda bilimsel veri sağlanacaktır.

Ayrıca, bu çalışmada elde edilen DNA dizi verileriyle dünyanın çeşitli bölgelerindeki araştırmacılar tarafından gen bankasında depo edilen veriler birleştirilerek *Echinops* cinsinin evrimsel geçmişi ve filocoğrafyasının belirlenmesine katkı sağlanabilecektir.

3. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Materyalinin elde edilmesi:

Ülkemizde yayılış gösteren *Echinops* cinsine ait 28 taksona ait örnekler çalışmamızın materyalini oluşturmaktadır. Elimizde bulunan, önceden toplanmış (TBAG 106T26 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında toplanan örnekler) örneklerle ait tohumların çimlendirilmesiyle elde edilecek yaprak dokuları, total bitki DNA'sı elde etmek için kullanılacaktır. Taze örnek temininde güçlük çekilirse, kuru herbaryum materyallerinden de yararlanılacaktır. Bazı geniş yayılışlı taksonların (*E. spinosissimus*, *E. albidus*, *E. pungens*, *E. orientalis*) birden fazla lokasyondan farklı örnekler alınarak çalışılacağından eldeki örneklerle ek olarak yeni örnekler toplanması gerekecektir. Bu sebeple başta Marmara, Ege ve Doğu Anadolu bölgeleri olmak üzere; bazı arazi çalışmaları yapılması planlanmaktadır. Araziden toplanan yaprak örnekleri silika jel içerisinde kurutularak saklanacaktır. Tohum örnekleri ise bez torbalarda muhafaza edilecektir.

3.2. Toplanan örneklerle ait dokulardan total DNA eldesi:

Öncelikle *Echinops* örneklerine ait tohumların çimlendirilmesiyle elde edilecek yaprak dokularından izole edilecek total bitki DNA'sı kullanılacaktır. Taze örnek temininde güçlük çekilirse, kuru herbaryum materyallerinden de yararlanılacaktır. Total DNA izolasyonu için Qiagen adlı firma tarafından üretilmiş ve ticari olarak satılmakta olan Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kullanılacaktır. Çalışma esnasında, total DNA izolasyonu kit ile birlikte gönderilen üretici firmanın protokolü temel alınacaktır. Tüm örneklerin total DNA'sı bu kit ile elde edilmesinden sonra, karışımdaki total DNA varlığı araştırılmak üzere % 0.8' lik agaroz jelde yürütülecek ve jel görüntüleme sisteminde, UV altında görüntülenip, fotoğrafı çekilecektir. Ardından elde edilen DNA'lar, çalışılacak bölgeler için kaynak olarak kullanılacak ve PCR reaksiyonu ile çoğaltılacaktır.

QIAGEN Kit Protokolü;

- 1) Ezilmiş dokudan 20 mg alınarak steril bir tüp içine tartılır.
- 2) Tüpdeki dokunun üzerine 500 µl AP1 buffer ve 100 mg/µl 5 µl RNase eklenir ve vortekslenir.
- 3) 65 OC'de 10 dakika bekletilir.(birkaç defa alt-üst yaparak karıştırılır).
- 4) Tüplerin üzerine 130 µl AP2 tamponu eklenip vortekslenir ve 5 dakika buzda bekletilir.

- 5) Tüpler 20000g'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı mor kolonlara aktarılır.
- 6) Kolonlar 20000g'de 2 dakika santrifüj edilir. Kolon atılır, süpernatant temiz ependorfa aktarılır.
- 7) Aktarılan süpernatantın 1.5 katı kadar AP3 tamponu eklenir ve pipetleyerek karıştırılır. Bundan 650 µl alınarak beyaz kolona aktarılır.
- 8) 6000g'de 1 dakika santrifüj edilir. Kolonun altında kalan kısım atılır. Tüpte kalan örnek aynı kolona aktarılır ve 6000g'de yine 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Kolon 2 ml'lik temiz reaksiyon tüplerine alınır. Üzerine 500 µl AW tamponu eklenir.
- 10) 6000g'de 1 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı dökülür ve tekrar 500 µl AW tampon eklenir.
- 11) 20000g'de 2 dakika santrifüj edilir. Kolon 1.5 ml'lik temiz tüplere alınır. 23
- 12) Üzerine 150 µl AE tamponu eklenir. Oda sıcaklığında 5 dakika beklenir.
- 13) 6000g'de 1 dakika santrifüj edilir. Kolon atılır ve elde edilen DNA kullanıma hazır halde -20°C'de saklanır.

3.3. Nüklear ribosomal DNA ve kloroplast DNA gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması:

Her bir bitki örneğinin bir nüklear ribosomal DNA (ITS) ve üç farklı kloroplast DNA gen bölgesi (*trnL-trnF*, *rbcL*, *MatK*) PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılacaktır. Bunun için farklı hedeflenen bölgeye spesifik primer çifti kullanılacaktır.

Tablo 3.1. PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler

Primer	Baz dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (C°)	Kaynak
ITS1 (F)	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	52 C°	[10]
ITS 4 (R)	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	52 C°	[10]
TrnL F (R)	5'- ATTTGAACTGGTGACACGAG - 3'	48 C°	[11]
trnL-C (F)	5'- GGTTCAAGTCCCTCTATCCC- 3'	48 C°	[11]
trnL-E (F)	5'- GGTTCAAGTCCCTCTATCCC- 3'	48 C°	[11]
trnL-D (R)	5'- GGGGATAGAGGGACTTGAAC -3'	48 C°	[11]
MatK-3F	5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'	50 C°	[12]
MatK 1R	5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'	50 C°	[12]
rbcL-1F	5'- ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC- 3'	50 C°	[13]
rbcL-1460R	5'-CTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG-3'	50 C°	[13]

Her bir primer çifti için PCR bileşenlerinin optimizasyon çalışmaları yapılmış ve primerlerin en uygun bağlanma sıcaklığı gradient PCR ile belirlenmiştir. PCR bileşenlerinin miktarı ve en uygun bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra, hedeflenen gen bölgesinin çoğaltılması sırasında primerlerin en uygun ve doğru şekilde bağlanması ve özgüllüğünün arttırılması için PCR yapılmıştır. PCR bileşenlerinin hazırlanması aşamasında her bir örnek için 10 µl veya 50 µl reaksiyon hacmi olacak şekilde Master Mix hazırlanmıştır. Her bir örnek için PCR tüplerine Master Mix karışımından 8.5 µl veya 49 µl alınarak bunun üzerine 1.5 veya 1 µl Total DNA eklenmiştir. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.2. *rbcl*, *MatK*, *trnL-trnF*, ITS gen bölgeleri için PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Alın Hacim
Tag Buffer (10x)	5 µl
MgCl (25mM)	3 µl
BSA (10mg/ml)	4 µl
dNTP (10 µM)	1.33 µl
Primer (F) (10 mM)	1 µl
Primer (R) (10 mM)	1 µl
Tag Polimeraz (500u)	0.25 µl
DNA	1 µl
D. Distile Su	33.42 µl

Elde edilen karışımının oluşturulduğu PCR strip tüplerin kapakları kapatılarak istenilen gen bölgesinin çoğaltılması için Thermo-Cycler'ra (SensoQuest LabCycler) alınarak PCR yapılmıştır. Her bir primer çifti için PCR döngü programları Tablo 3.3-6'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Nüklear Ribosomal DNA ITS gen bölgesinin ITS1 ve ITS4 primer çiftleri için PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık (C°)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	95 C°	5:00 dk	1
2. Basamak	94 C°	1:00 dk	35
3. Basamak	51 C°	1:10 dk	35
4. Basamak	72 C°	1:00 dk	35
5. Basamak	72 C°	10:00 dk	1

Tablo 3.4. Kloroplast DNA MatK gen bölgesinin MatK 3F ve 1R primer çiftleri için PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık (C°)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	95 C°	2:45 dk	1
2. Basamak	94 C°	1:00 dk	35
3. Basamak	51 C°	1:45 dk	35
4. Basamak	72 C°	1:45 dk	35
5. Basamak	72 C°	10:00 dk	1

Tablo 3.5. Kloroplast DNA rbcL gen bölgesinin rbcL 1F ve 1460R primer çiftleri için PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık (C°)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	95 C°	2:45 dk	1
2. Basamak	94 C°	1:00 dk	30
3. Basamak	51 C°	1:45 dk	30
4. Basamak	72 C°	1:10 dk	30
5. Basamak	72 C°	10:00 dk	1

Tablo 3.6. Kloroplast DNA *trnL-trnF* gen bölgesinin trnL-E, trnL-F, trnL-C ve trnL-D primer çiftleri için PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık (C°)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	95 C°	2:30 dk	1
2. Basamak	94 C°	1:00 dk	30
3. Basamak	48 C°	1:30 dk	30
4. Basamak	72 C°	1:45 dk	30
5. Basamak	72 C°	9:00 dk	1

3.4. DNA barkodlaması:

DNA barkodlaması için her bir bitki örneğinin iki farklı kloroplast DNA gen bölgesi (rbcL, MatK) PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılacaktır. Bunun için toplam dört farklı spesifik primer çifti kullanılacaktır. Angiosperm grubu bitkilerin için bu gen bölgeleri universal barkod olarak tercih edilmektedir.

Tablo 3.7. DNA Barkodlama amacıyla kullanılan primerler

Primer	Baz Dizisi	Bağlanma sıc. (C°)	Kaynak
MatK-3F	5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'	50 C°	[12]
MatK 1R	5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'	50 C°	[12]
rbcL-1F	5'- ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC- 3'	50 C°	[13]
rbcL-1460R	5'-CTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG-3'	50 C°	[13]

3.5. PCR ile çoğaltılan bölgelerin DNA dizi analizleri:

Bu çalışmada tüm *Echinops* örneklerine ait PCR ürünlerinin saflaştırılması ve çoğaltılan bölgelerin dizi analizleri, hizmet alımı şeklinde ve hem ileri (Forward) hem de geri (Reverse) çift-yönlü okuma yaptırılacak ve bu sayede mümkün olan en doğru sonucun elde edilmesi amaçlanmıştır.

3.6. Sekans analizi ve verilerin değerlendirilmesi

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan DNA dizilerinin sekans analizi hizmet alımı şeklinde ABI 3100 Genetic Analyzer (Bu cihazda 50 cm'lik kapiller ile standart 800 baz fakat bazen purifikasyon kalitesi ve DNA dizisine göre okuma 750-850 baz arasında değişmektedir) adlı cihaz ile yapılacaktır. Her bir örnek için en az iki okuma yaptırılacaktır. Analizi yapılan kloroplast ve nüklear ribosomal DNA bölgelerinin dizilerinin hizalanması ve düzenlenmesi (Sequence alignment and editing) için Geneious ve BioEdit version 7.0.9.0. programları kullanılacaktır. Her bir örnek için tüm bölgelere ait DNA dizileri tek tek kontrol edilerek birleştirilecek ve elde edilen dizilerin ortak dizisi oluşturulacaktır.

DNA dizi analizinden elde edilen veriler, Geneious, DnaSP, Mega5, PAUP gibi filogenetik analiz programlarına aktararak değerlendirilecek ve filogenetik ağaçlar oluşturulacaktır. DNA dizi analizi verileri kullanılarak filogenetik sonuçları elde etmek için parsimoni-, distans-, likelihood- tabanlı metotlar kullanılacaktır. Haplotip çeşitliliği, nükleotid çeşitliliği vb. analizler DnaSP isimli bilgisayar yazılımı, korunmuş bölgeler, variable bölgeler, parsimonik bilgi içeren bölgeler tespiti için ise Geneious, MEGA5 ve DnaSP isimli bilgisayar yazılımları kullanılacaktır.

4. BÖLÜM

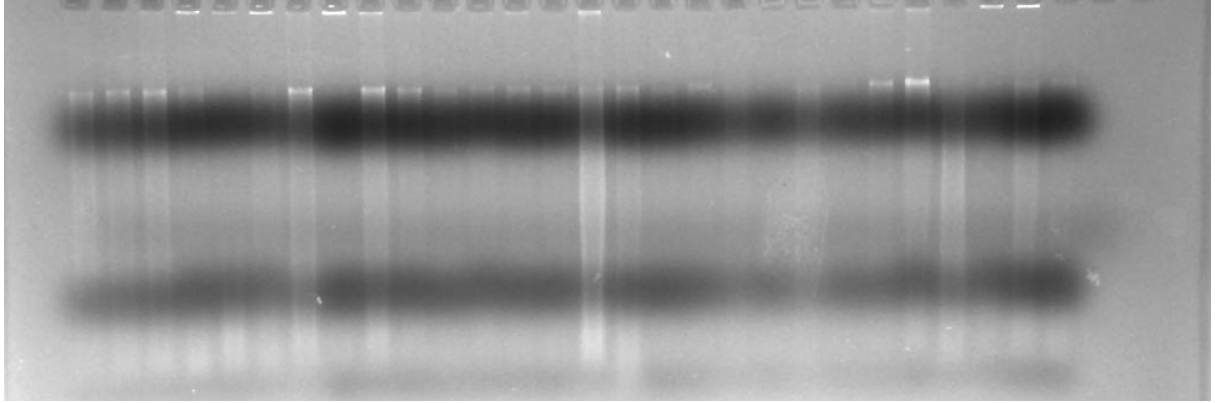
BULGULAR

4.1. Türkiye *Echinops* cinsi taksonlarının Kloroplast ve Nüklear DNA Dizi Analizleri

Kloroplast ve nüklear DNA dizi analizleri için gerekli total DNA, *Echinops* örneklerine ait yaprak dokularından elde edilmiştir. Total DNA'lar kullanılarak hedeflenen gen bölgelerinin (kloroplast DNA *matK*, *rbcL*, *trnL-trnF*, nüklear ribosomal DNA ITS), PCR ile çoğaltılması işlemi yapılmıştır.

4.1.1. Total DNA Elde Edilmesi

Echinops cinsine ait örneklerin dokularından DNA izolasyonu için QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit) kullanılmıştır. Elde edilen total DNA'lar % 0.8'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV altında görüntülenmiştir (Şekil 4.1).



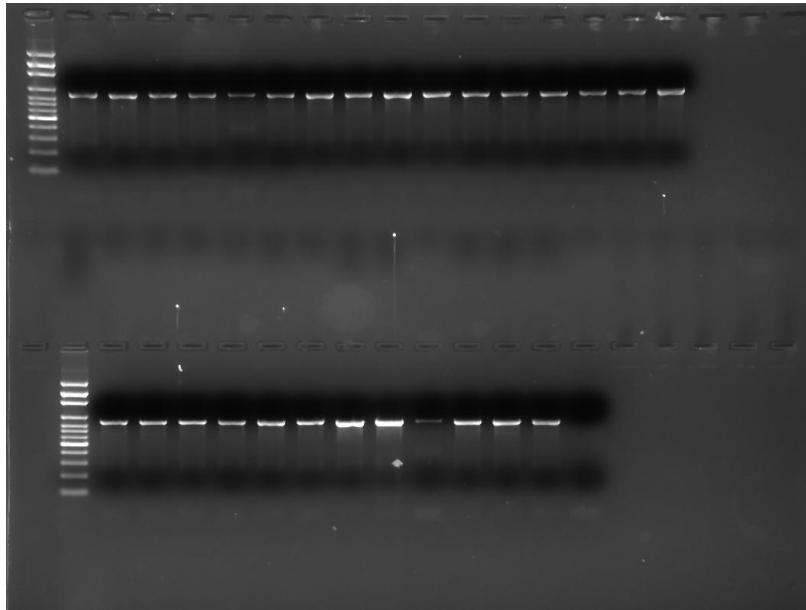
Şekil 4.1. *Echinops* cinsine ait 28 taksonun total DNA agaroz jel fotoğrafı, 1. *E. ritro*, 2. *E. ritrodes*, 3. *E. microcephalus*, 4. *E. sphaerocephalus*, 5. *E. albidus*, 6. *E. ossicus*, 7. *E. pungens*, 8. *E. polyacanthus*, 9. *E. adenocladus*, 10. *E. transcaucasicus*, 11. *E. tournefortii*, 12. *E. heterophyllus*, 13. *E. vaginatus*, 14. *E. onopordum*, 15. *E. mersinensis*, 16. *E. emiliae*, 17. *E. spinosissimus*, 18. *E. spinosissimus* ssp. *bithynicus*, 19. *gaillardotii*, 20. *E. adenocaulos*, 21. *E. orientalis*, 22. *E. chardinii*, 23. *E. tenuisectus*, 24. *E. phaeocephalus*, 25. *E. dumanii*, 26. *E. melitenensis*, 27. *E. borae*, 28. *E. antalyaense*.

4.1.2. Hedeflenen Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

Elde edilen total DNA'lar, kloroplast (*rbcL*, *matK*, *trnL-trnF* ve nükleer gen (*ITS*) bölgelerinin spesifik primer çiftleri ile çoğaltılması için kaynak olarak kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin kalitesi ve büyüklüğünü kontrol etmek amacıyla PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek jel fotoğrafları elde edilmiştir.

4.1.2.1. Kloroplast DNA MatK Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

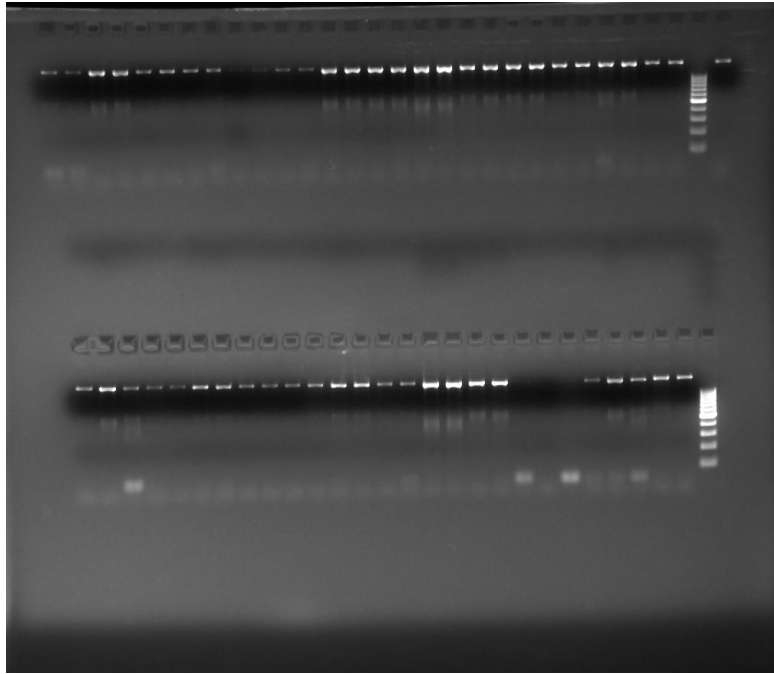
Kloroplast DNA ya ait MatK gen bölgesi spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Şekil 4.2). Çoğaltılan gen bölgelerinin hedeflenen gen bölgesi olması ve yanlışlıkla pseudogenlerin çoğaltılmaması için literatürde mevcut ve aynı organizmalar için çeşitli çalışmalarda kullanılmış olan spesifik primer çiftleri seçildi. Ayrıca seçilen spesifik primerler çiftleri ile çoğaltılan parçaların beklenen büyüklükte olup olmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Jelde istenilen büyüklükte bandın olup olmadığı ve spesifik olmayan bantların varlığı kontrol edildi. Dizi analizinden gelen sonuçlar incelenerek içerisinde herhangi bir dur kodonunun olup olmadığı ve uygun baz dizisi ile başlayıp başlamadığı kontrol edildi. Elde edilen dizi analiz sonuçlarında kromatogramların kalitesi incelenerek üst üste çakışan piklerin olup olmadığı kontrol edildi. Ayrıca Gen Bankası'nda BLAST analizi yapılarak türlere ait diğer örnek dizileriyle karşılaştırılarak benzer olup olmadığı kontrol edildi.



Şekil 4.2 *Echinops* örneklerine ait MatK geni için 3F ve 1R primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.1.2.2. Kloroplast DNA *rbcL* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Kloroplast DNA ya ait *rbcL* gen bölgesi spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Şekil 4.3). Çoğaltılan gen bölgelerinin hedeflenen gen bölgesi olması ve yanlışlıkla pseudogenlerin çoğaltılmaması için literatürde mevcut ve aynı organizmalar için çeşitli çalışmalarda kullanılmış olan spesifik primer çiftleri seçildi. Ayrıca seçilen spesifik primerler çiftleri ile çoğaltılan parçaların beklenen büyüklükte olup olmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Jelde istenilen büyüklükte bandın olup olmadığı ve spesifik olmayan bantların varlığı kontrol edildi. Dizi analizinden gelen sonuçlar incelenerek içerisinde herhangi bir dur kodonunun olup olmadığı ve uygun baz dizisi ile başlayıp başlamadığı kontrol edildi. Elde edilen dizi analiz sonuçlarında kromatogramların kalitesi incelenerek üst üste çakışan piklerin olup olmadığı kontrol edildi. Ayrıca Gen Bankası'nda BLAST analizi yapılarak türlere ait diğer örnek dizileriyle karşılaştırılarak benzer olup olmadığı kontrol edildi.

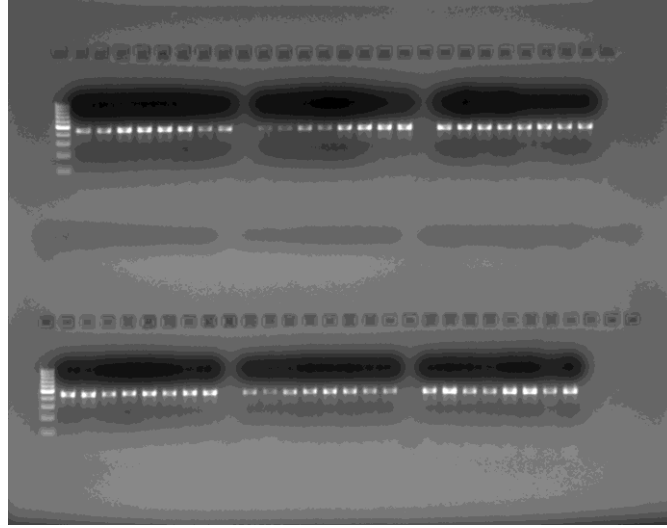


Şekil 4.3 *Echinops* örneklerine ait *rbcL* geni için 1F ve 1460R primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

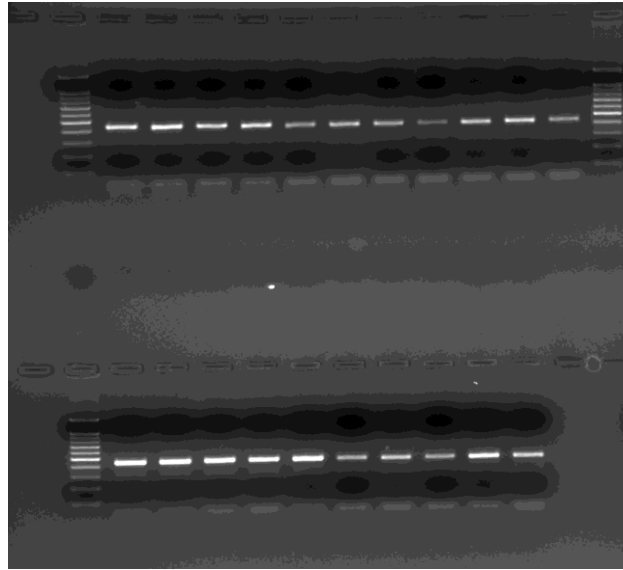
4.1.2.3. Kloroplast DNA *trnL-trnF* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Kloroplast DNA ya ait *trnL-trnF* gen bölgesi spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Şekil 4.5-6). Çoğaltılan gen bölgelerinin hedeflenen gen bölgesi olması ve yanlışlıkla pseudogenlerin çoğaltılmaması için literatürde mevcut ve aynı organizmalar için çeşitli çalışmalarda kullanılmış olan spesifik primer çiftleri seçildi. Ayrıca seçilen spesifik

primerler çiftleri ile çoğaltılan parçaların beklenen büyüklükte olup olmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Jelde istenilen büyüklükte bandın olup olmadığı ve spesifik olmayan bantların varlığı kontrol edildi. Dizi analizinden gelen sonuçlar incelenerek içerisinde herhangi bir dur kodonunun olup olmadığı ve uygun baz dizisi ile başlayıp başlamadığı kontrol edildi. Elde edilen dizi analiz sonuçlarında kromatogramların kalitesi incelenerek üst üste çakışan piklerin olup olmadığı kontrol edildi. Ayrıca Gen Bankası'nda BLAST analizi yapılarak türlere ait diğer örnek dizileriyle karşılaştırılarak benzer olup olmadığı kontrol edildi.



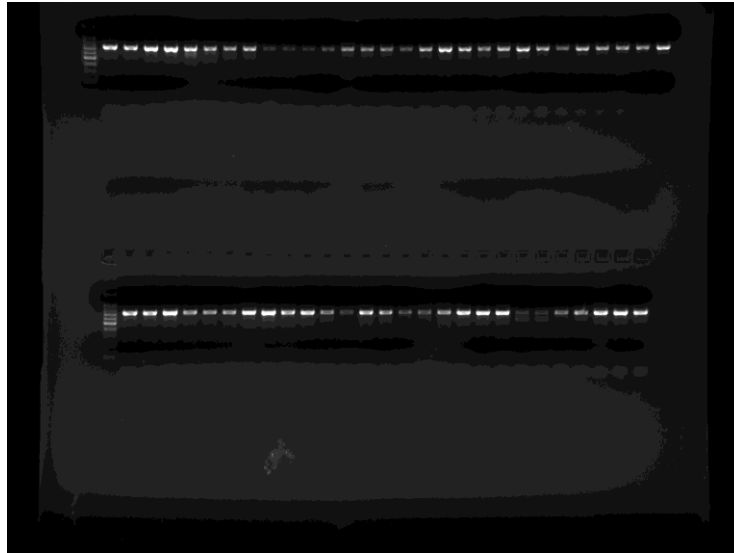
Şekil 4.5 *Echinops* örneklerine ait *trnL-trnF* geni için trnL-e ve trnL-f primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.6 *Echinops* örneklerine ait *trnL-trnF* geni için trnL-c ve trnL-d primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.1.2.4. Nüklear ribosomal DNA ITS Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Nüklear ribosomal DNA ITS gen bölgesi spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Şekil 4.7). Çoğaltılan gen bölgelerinin hedeflenen gen bölgesi olması ve yanlışlıkla pseudogenlerin çoğaltılmaması için literatürde mevcut ve aynı organizmalar için çeşitli çalışmalarda kullanılmış olan spesifik primer çiftleri seçildi. Ayrıca seçilen spesifik primerler çiftleri ile çoğaltılan parçaların beklenen büyüklükte olup olmadığı agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Jelde istenilen büyüklükte bandın olup olmadığı ve spesifik olmayan bantların varlığı kontrol edildi. Dizi analizinden gelen sonuçlar incelenerek içerisinde herhangi bir dur kodonunun olup olmadığı ve uygun baz dizisi ile başlayıp başlamadığı kontrol edildi. Elde edilen dizi analiz sonuçlarında kromatogramların kalitesi incelenerek üst üste çakışan piklerin olup olmadığı kontrol edildi. Ayrıca Gen Bankası'nda BLAST analizi yapılarak türlere ait diğer örnek dizileriyle karşılaştırılarak benzer olup olmadığı kontrol edildi.



Şekil 4.7 *Echinops* örneklerine ait ITS geni için ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak oluşturulan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

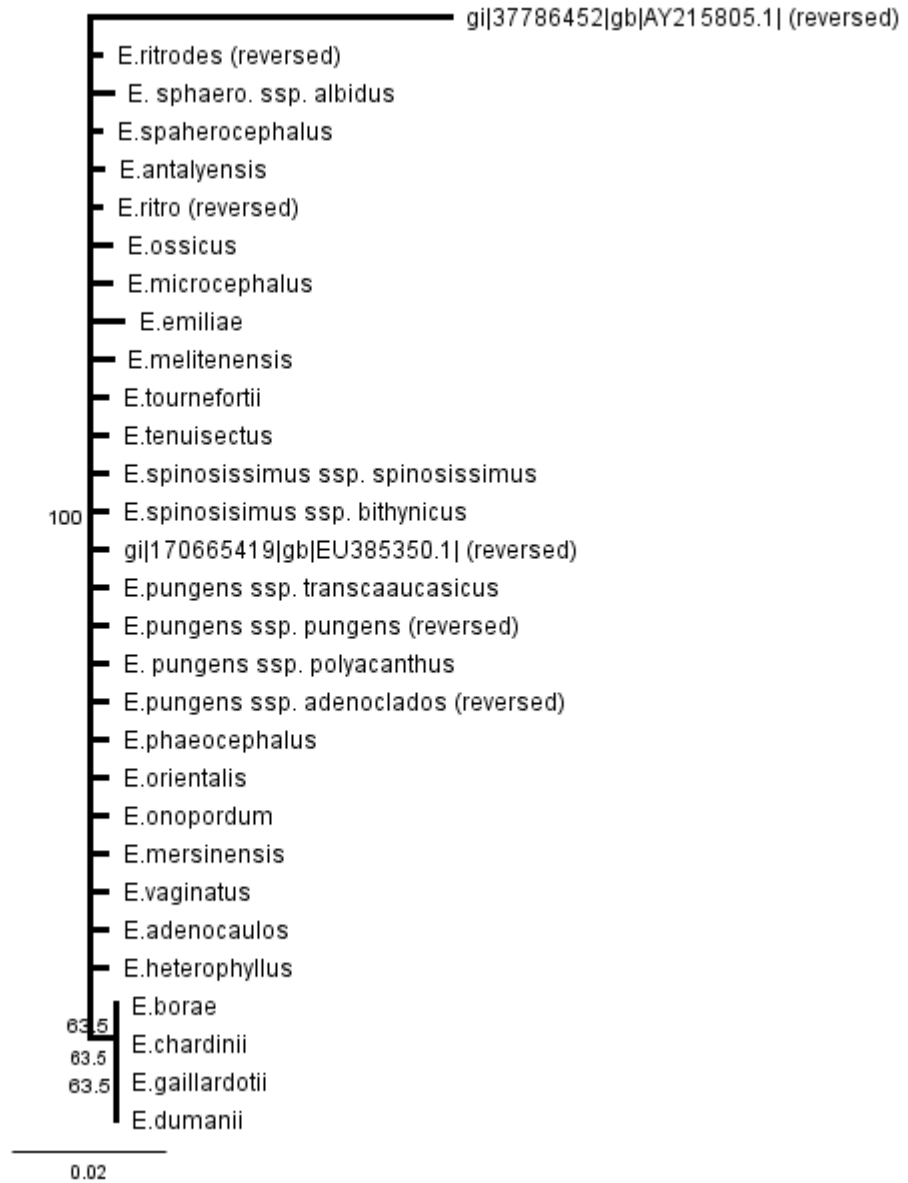
4.2 Türkiye *Echinops* taksonlarının Kloroplast MatK (*Maturase K*) Gen Bölgesinin Genetik Analizi

4.2.1 En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Echinops cinsine ait Türkiye örneklerini içeren veri seti için en uygun baz değişim modeli, dış gruplu olarak MEGA5 [14] ve jModelTest2 [15, 16] programları ile hem BIC [17] hem de AICc model seçim taslağına göre [18], Jukes-Cantor (JC) belirlenmiştir. Bundan dolayı Mrbayes ve NJ analizlerinde JC baz değişim modeli kullanılmıştır..

4.2.1.1 *Echinops* taksonlarının Neighbor Joining Analizi

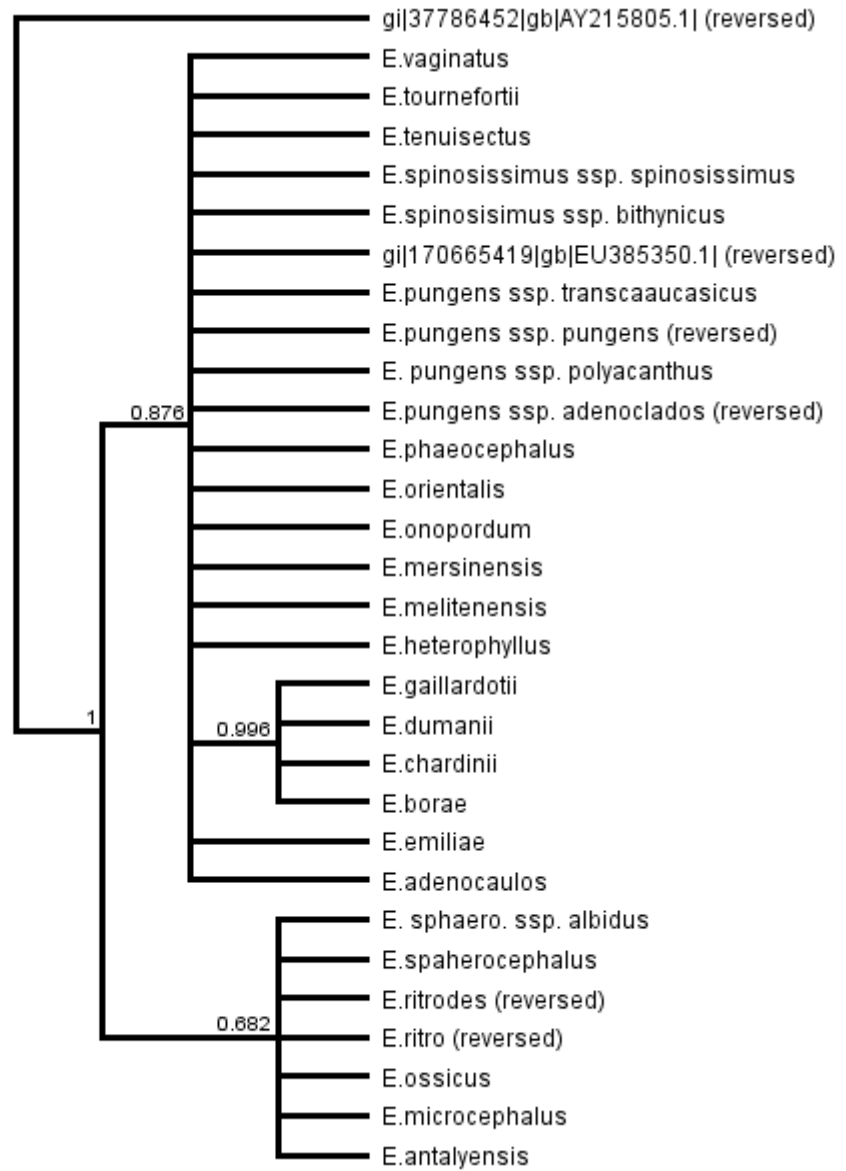
Echinops taksonlarına ait örnekleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için Neighbor Joining algoritması [19] ve 20.000 tekrarlı (replikasyon) JC baz değişim modeli kullanılarak NJ ağacı (Şekil 4.8) elde edilmiştir. *Helianthus annuus*'un dış grup olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.8. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı

4.2.1.2 *Echinops* taksonlarının MrBayes Analizi

Geneious programına [20] entegre edilen MrBayes 3.1 [21] programında 200.000 jenerasyon ile JC baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi [22] sonucunda elde edilen Bayesian Inference (BI) ağacı ve olasılık değerleri, Şekil 4.9'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan Mrbayes ağacı

4.3 Türkiye *Echinops* taksonlarının Kloroplast *rbcL* (ribulose-bisphosphate carboxylase gene) Gen Bölgesinin Genetik Analizi

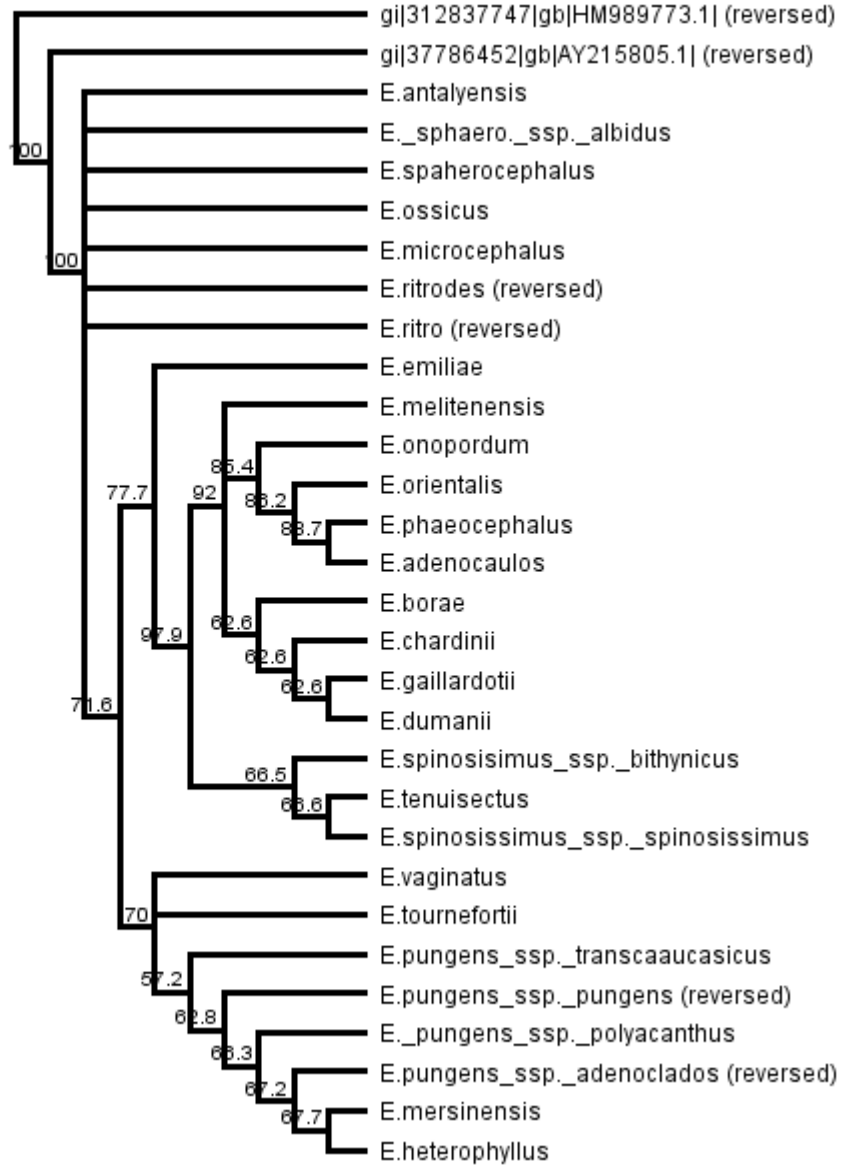
4.3.1 En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Echinops cinsine ait Türkiye örneklerini içeren veri seti için en uygun baz değişim modeli, dış gruplu olarak MEGA5 [14] ve jModelTest2 [15, 16] programları ile hem BIC [17] hem de

AICc model seçim taslağına göre [18], Juces-Cantor (JC) belirlenmiştir. Bundan dolayı Mrbayes ve NJ analizlerinde JC baz değişim modeli kullanılmıştır..

4.3.1.1 *Echinops* taksonlarının Neighbor Joining Analizi

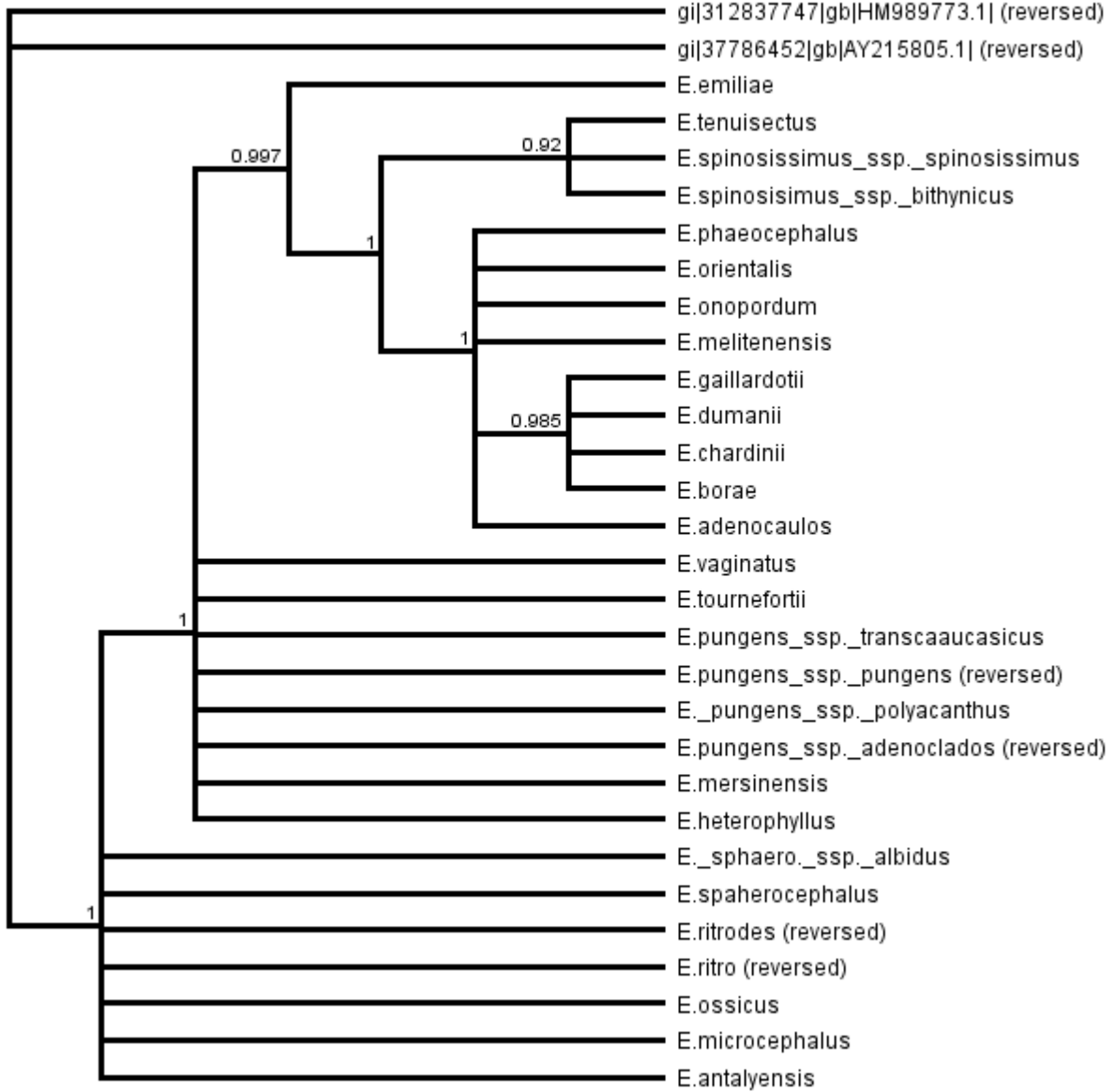
Echinops taksonlarına ait örnekleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için Neighbor Joining algoritması [19] ve 20.000 tekrarlı (replikasyon) JC baz değişim modeli kullanılarak NJ ağacı (Şekil 4.10) elde edilmiştir. *Helianthus annuus*'un dış grup olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.10. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı

4.3.1.2 *Echinops* taksonlarının MrBayes Analizi

Geneious programına [20] entegre edilen MrBayes 3.1 [21] programında 200.000 jenerasyon ile JC baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi [22] sonucunda elde edilen Bayesian Inference (BI) ağacı ve olasılık değerleri, Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan Mrbayes ağacı

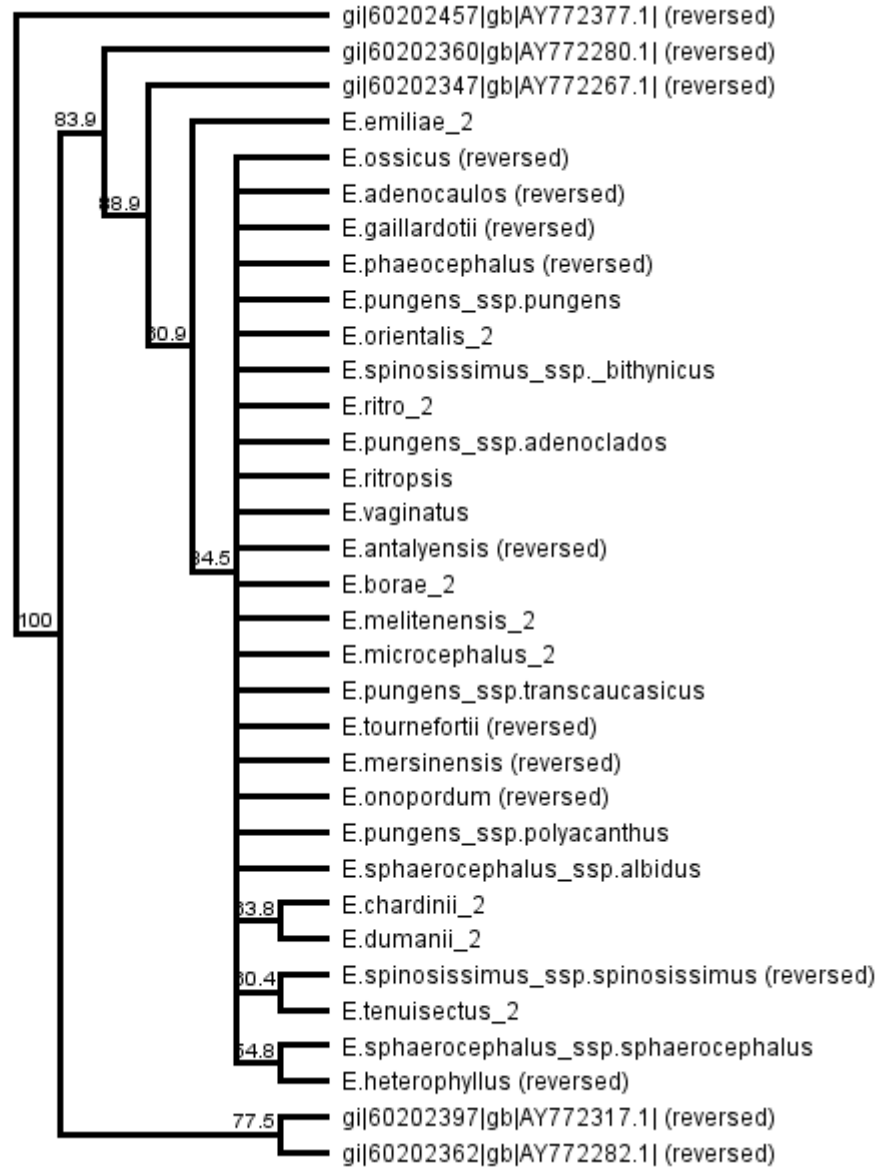
4.4 Türkiye *Echinops* taksonlarının Kloroplast *trnL-trnF* Gen Bölgesinin Genetik Analizi

4.4.1 En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Echinops cinsine ait Türkiye örneklerini içeren veri seti için en uygun baz değişim modeli, dış gruplu olarak MEGA5 [14] ve jModelTest2 [15, 16] programları ile hem BIC [17] hem de AICc model seçim taslağına göre [18], Jukes-Cantor (JC) belirlenmiştir. Bundan dolayı Mrbayes ve NJ analizlerinde JC baz değişim modeli kullanılmıştır..

4.4.1.1 *Echinops* taksonlarının Neighbor Joining Analizi

Echinops taksonlarına ait örnekleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için Neighbor Joining algoritması [19] ve 20.000 tekrarlı (replikasyon) JC baz değişim modeli kullanılarak NJ ağacı (Şekil 4.12) elde edilmiştir.

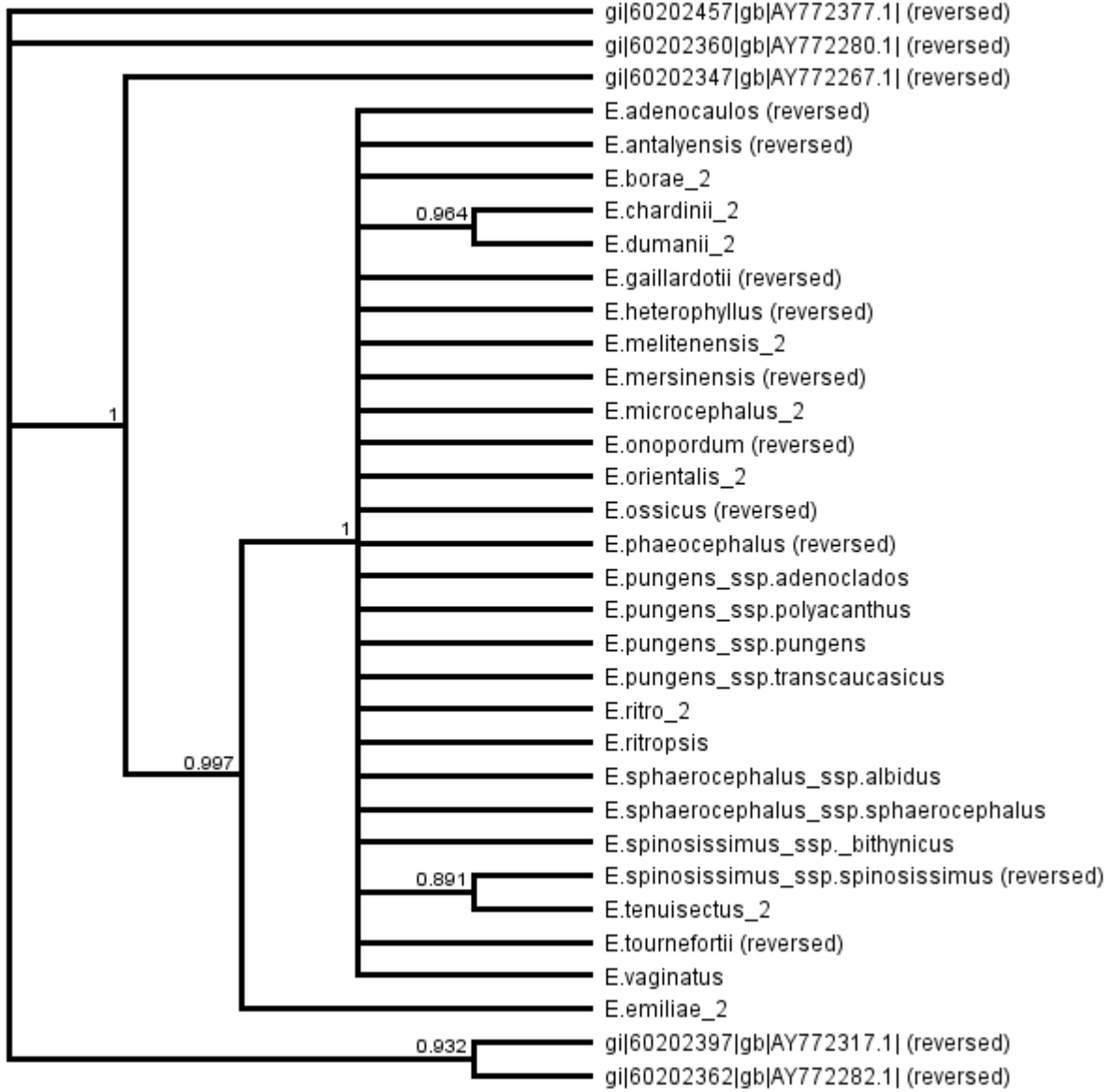


Şekil 4.12. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı

4.4.1.2 *Echinops* taksonlarının MrBayes Analizi

Geneious programına [20] entegre edilen MrBayes 3.1 [21] programında 200.000 jenerasyon ile JC baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi [22] sonucunda elde edilen

Bayesian Inference (BI) ağacı ve olasılık değerleri, Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan Mrbayes ağacı

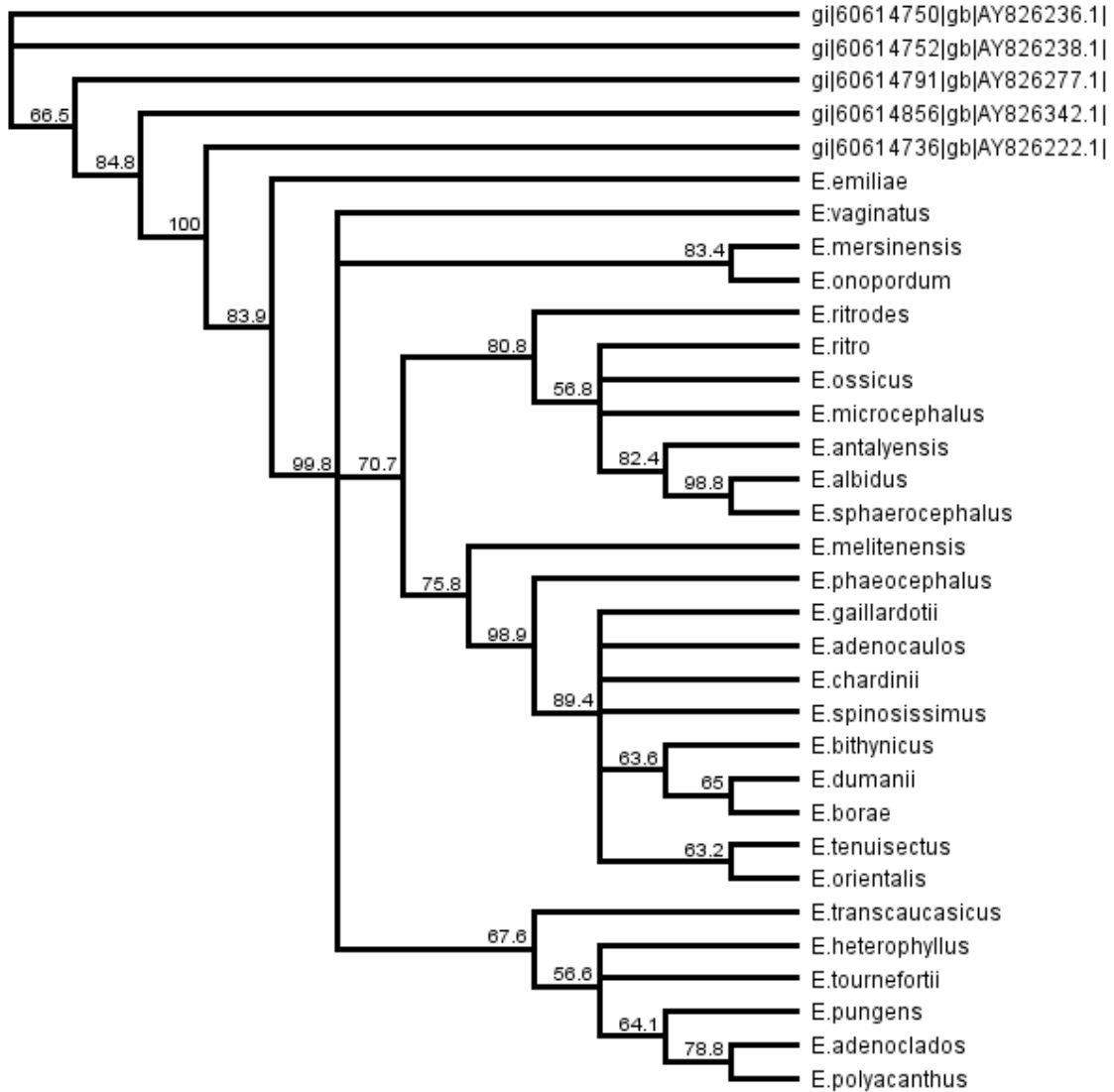
4.5 Türkiye *Echinops* taksonlarının Kloroplast ITS (Internal transcribed spacer) Gen Bölgesinin Genetik Analizi

4.5.1 En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Echinops cinsine ait Türkiye örneklerini içeren veri seti için en uygun baz değişim modeli, dış gruplu olarak MEGA5 [14] ve jModelTest2 [15, 16] programları ile hem BIC [17] hem de AICc model seçim taslağına göre [18], Jukes-Cantor (JC) belirlenmiştir. Bundan dolayı Mrbayes ve NJ analizlerinde JC baz değişim modeli kullanılmıştır.

4.5.1.1 *Echinops* taksonlarının Neighbor Joining Analizi

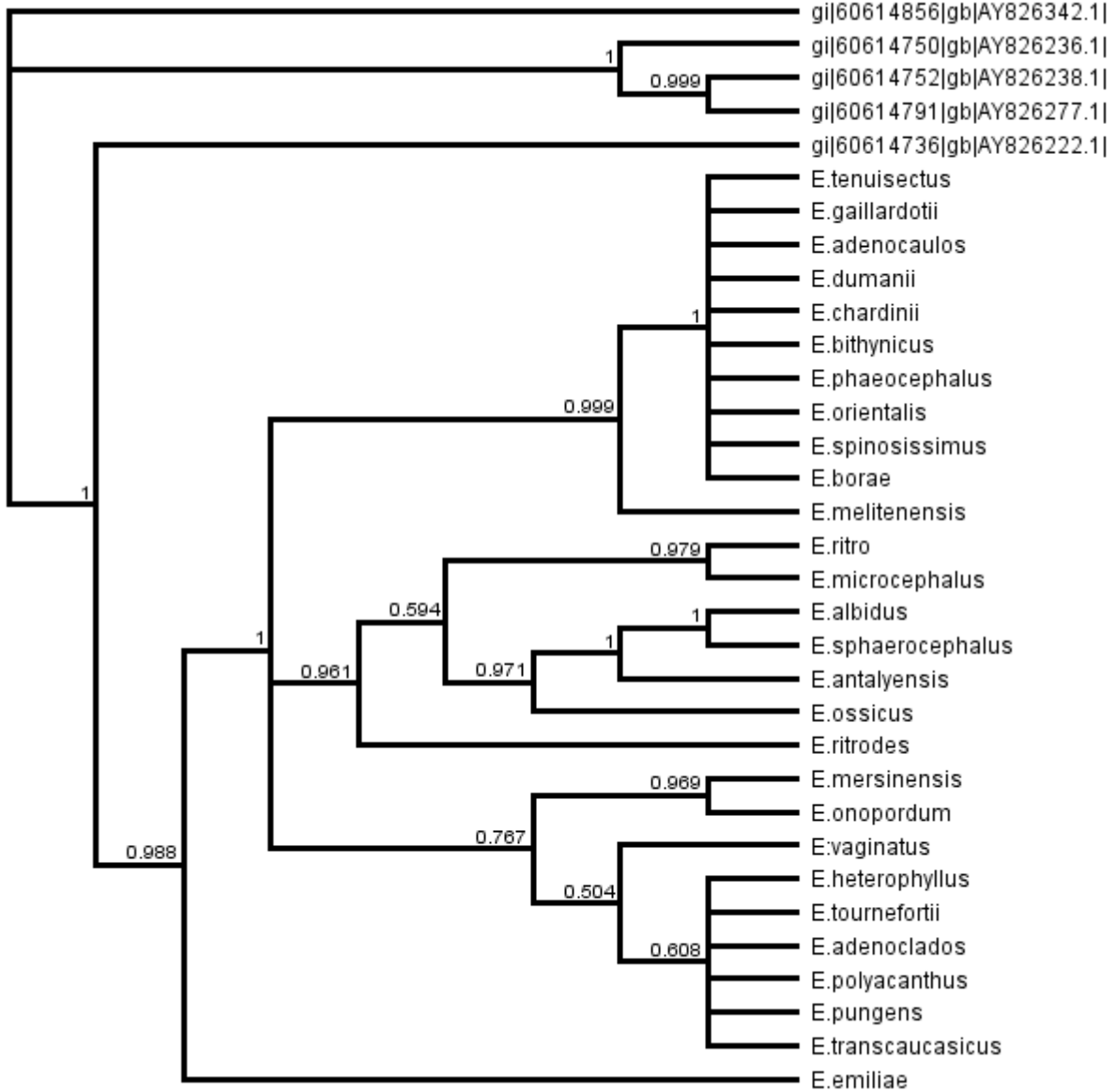
Echinops taksonlarına ait örnekleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için Neighbor Joining algoritması [19] ve 20.000 tekrarlı (replikasyon) JC baz değişim modeli kullanılarak NJ ağacı (Şekil 4.14) elde edilmiştir.



Şekil 4.14. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı

4.5.1.2 *Echinops* taksonlarının MrBayes Analizi

Geneious programına [20] entegre edilen MrBayes 3.1 [21] programında 200.000 jenerasyon ile JC baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi [22] sonucunda elde edilen Bayesian Inference (BI) ağacı ve olasılık değerleri, Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan Mrbayes ağacı

4.6 Türkiye *Echinops* taksonlarının Kloroplast ITS, *rbcL*, *trnL-trnF* MatK Gen Bölgesinin Genetik Analizi

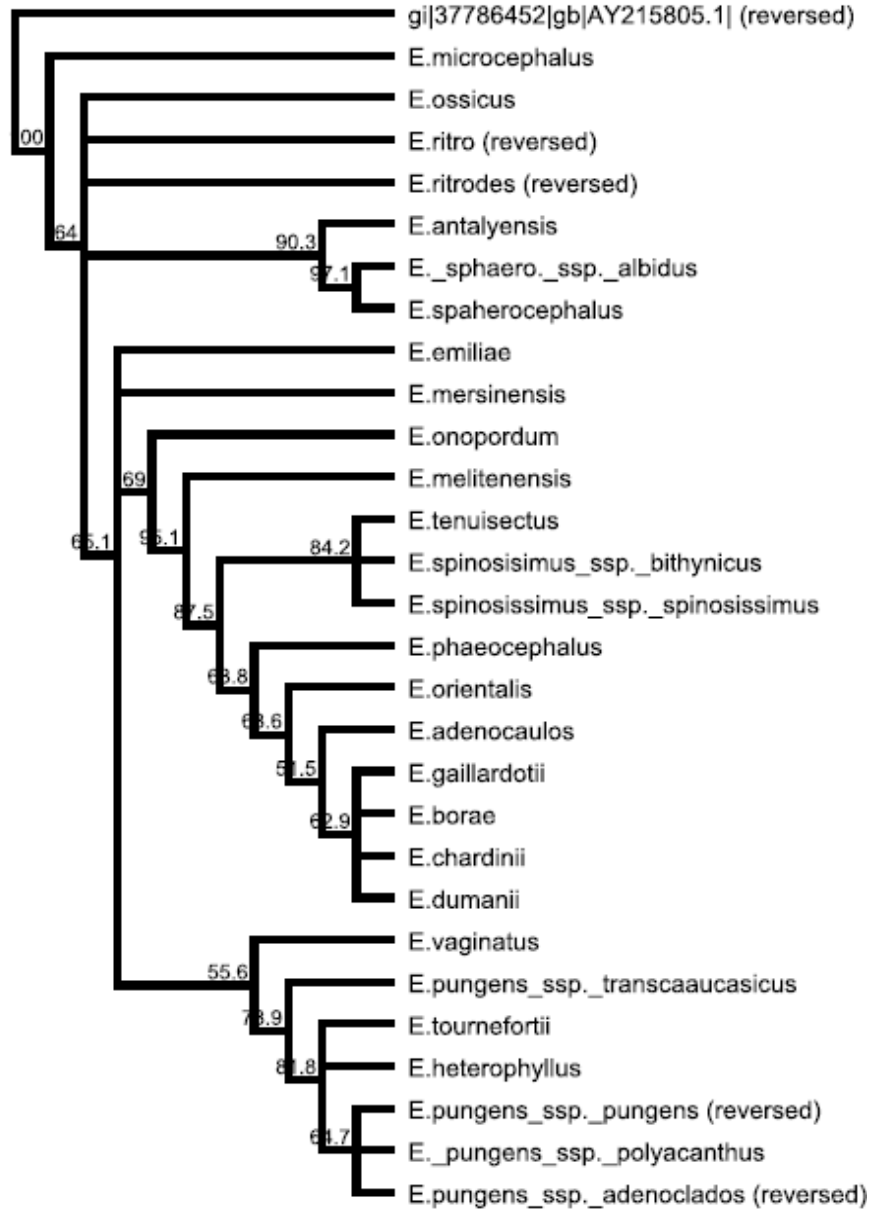
Bu çalışmada, Türkiye *Echinops* taksonlarının filogenetik ilişkilerinin belirlenebilmesi amacıyla ITS bölgesinden (676 bp), *trnL-trnF* (781 bp), matK (719 bp) ve *rbcL* (1091 bp) gen bölgeleri birlikte değerlendirilerek analizler yapılmıştır. Geneious programına entegre edilen MrBayes 3.1 programında JC baz değişim modeli kullanılarak Bayesian Inference (BI) ağacı oluşturulmuştur.

4.6.1 En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Echinops cinsine ait Türkiye örneklerini içeren veri seti için en uygun baz değişim modeli, dış gruplu olarak MEGA5 [14] ve jModelTest2 [15, 16] programları ile hem BIC [17] hem de AICc model seçim taslağına göre [18], Jukes-Cantor (JC) belirlenmiştir. Bundan dolayı MrBayes ve NJ analizlerinde JC baz değişim modeli kullanılmıştır.

4.6.1.1 *Echinops* taksonlarının Neighbor Joining Analizi

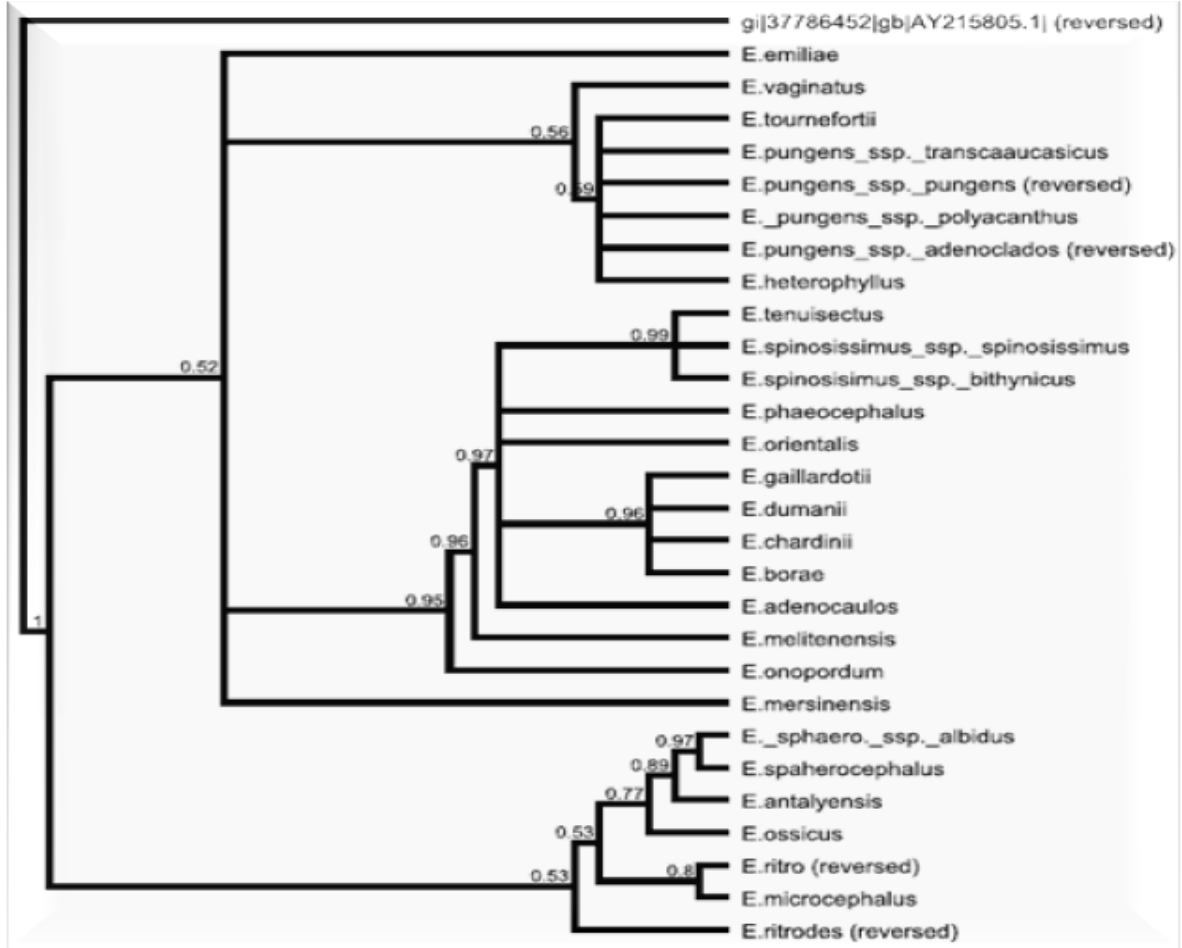
Echinops taksonlarına ait örnekleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için Neighbor Joining algoritması [19] ve 20.000 tekrarlı (replikasyon) JC baz değişim modeli kullanılarak NJ ağacı (Şekil 4.16) elde edilmiştir



Şekil 4.16. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan NJ ağacı

4.6.1.2 *Echinops* taksonlarının MrBayes Analizi

Geneious programına [20] entegre edilen MrBayes 3.1 [21] programında 200.000 jenerasyon ile JC baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi [22] sonucunda elde edilen Bayesian Inference (BI) ağacı ve olasılık değerleri, Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan MrBayes ağacı

4.7 Türkiye *Echinops* taksonlarının Kloroplast *rbcL* ve *MatK* Gen Bölgelerinin kullanılması ile DNA barkodlanması

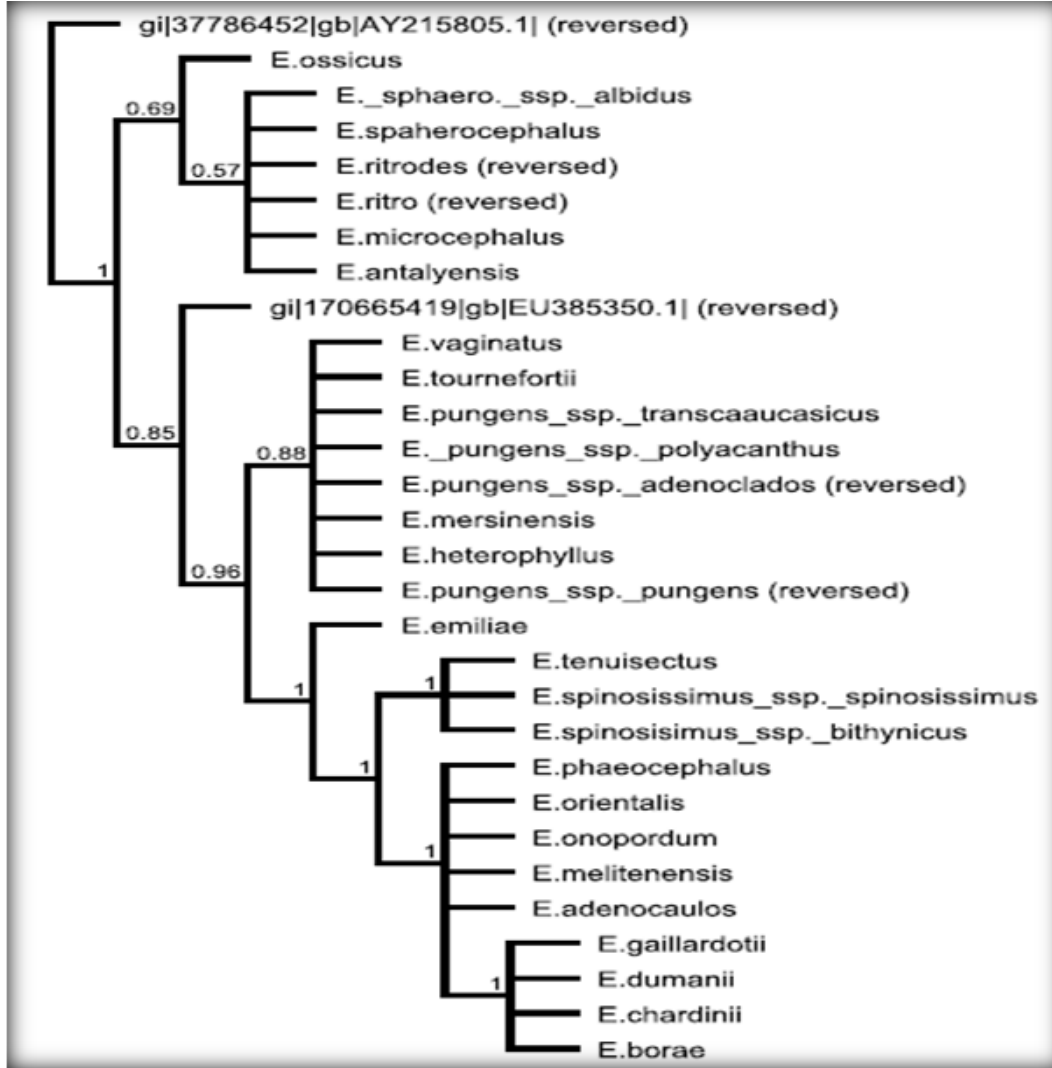
Türkiye *Echinops* taksonlarının DNA barkodlarının belirlenebilmesi amacıyla evrensel çekirdek barkod olarak kabul edilen cpDNA *matK* (719 bp) ve *rbcL* (1091 bp) gen bölgeleri birlikte değerlendirilerek analizler yapılmıştır. Geneious programına entegre edilen MrBayes 3.1 programında JC baz değişim modeli kullanılarak Bayesian Inference (BI) ağacı oluşturulmuştur.

4.7.1 En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Echinops cinsine ait Türkiye örneklerini içeren veri seti için en uygun baz değişim modeli, dış gruplu olarak MEGA5 [14] ve jModelTest2 [15, 16] programları ile hem BIC [17] hem de AICc model seçim taslağına göre [18], Jukes-Cantor (JC) belirlenmiştir. Bundan dolayı MrBayes ve NJ analizlerinde JC baz değişim modeli kullanılmıştır..

4.7.1.1 MrBayes Analizi

Geneious programına [20] entegre edilen MrBayes 3.1 [21] programında 200.000 jenerasyon ile JC baz değişim modeli kullanılarak yapılan Bayesian analizi [22] sonucunda elde edilen Bayesian Inference (BI) ağacı ve olasılık değerleri, Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren JC modeli kullanılarak oluşturulan Mrbayes ağacı

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Echinops L. cinsi dünya üzerinde 125 ila 130 kadar türle temsil edilmektedir. Çoğunlukla kuzey yarıkürede olmak üzere, bütün dünya'da geniş yayılış göstermektedir. Yaygın olarak da, tropik Afrika'nın yarı nemli alanları, Kuzey Afrika'nın yarı kurak alanları, Akdeniz havzası ve Orta Asya'ya kadar Avrasya'nın ılıman kuşağında yayılış göstermektedir. İran-Turan fitocoğrafya elementi olan ve genel olarak birkaç tek yıllık tür dışında çok yıllık bir cins olan *Echinops* cinsinin ülkemizde son çalışmalara göre 28 taksonu yayılış göstermektedir. Dünya genelinde geniş bir yayılış alanına sahip olmasına rağmen *Echinops* cinsinin taksonomik durumu mevcut türlerin sayısı bakımından hala tartışmalıdır. Bu tartışmalı durum ülkemiz *Echinops*'ları için de geçerlidir. Morfolojik verilere göre yapılmış çalışmalarda ülkemiz taksonları ile ilgili pek çok değişiklik yapılmıştır. Bu çalışmada, bir nüklear ribosomal DNA (ITS) ve üç farklı kloroplast DNA (*rbcL*, *trnL*, *MatK*) gen bölgelerinin dizi analizleri kullanarak Türkiye *Echinops* cinsi türlerinin genetik yapısının belirlenmiş, türlerin birbirleriyle olan filogenetik ilişkileri ve taksonomik durumları moleküler tabanlı olarak değerlendirilmiş, *matK* ve *rbcL* gen bölgeleri kullanılarak *Echinops* cinsine ait türlerin taksonomistler ve nadir türlerin korunması ile yasadışı ticaretinin önlenmesi içinde önem arz eden DNA barkodlaması yapılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, Türkiye *Echinops* cinsine ait örnekler ile Gen Bankasından temin edilen *Echinops* cinsine ait dünyanın farklı ülkelerinde yayılış gösteren örneklerle ait gen dizileri birlikte değerlendirilerek *Echinops* cinsine ait türlerin akrabalık ilişkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışma, Türkiye de yayılış gösteren *Echinops* cinsine ait 28 taksonun tamamının bir arada değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışılan türler arasında son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde cinse eklenen 3 yeni tür tanımlanmalarından sonra ilk kez bu çalışmaya dahil edilerek çalışılmıştır. Nüklear ribosomal DNA ITS gen bölgesi ve 3 farklı kloroplast gen bölgesine ait DNA dizileri hem ayrı ayrı analiz edilmiş hem de birlikte değerlendirilmiştir. Oluşturulan dendogramlar incelendiğinde türlerin filogenisinin en iyi gözlenebildiği dendogram bu dört bölgeye ait dizilerin birlikte kullanılması sonucunda ulaşıldığı gözlemlenmiştir.

ITS, *matK*, *rbcL* ve *TrnL-F* gen bölgelerinden elde edilen kombine dataseti kullanılarak Mrbayes filogenetik dendogram elde edilmiştir. Buradan sonraki kısımlarda yapılacak yorumlarda bu dendogram göz önünde bulundurulmuştur.

Echinops cinsine ait taksonlar iki ana kladda gruplanma göstermişlerdir. 1. kladda *E.sphaerocephalus*, *E. albidus*, *E. antalyensis*, *E. ossicus*, *E. ritro*, *E. microcephalus*, *E. ritrodes* taksonları birlikte gruplanmıştır. Diğer ana klad ise kendi arasında dört alt grupta sınıflanmıştır. Bu gruptan ilk olarak *E. emilae* ve *E. mersinensis* türleri diğer taksonlardan belirgin bir farkla ayrılarak gruplanmıştır. *E. pungens* türünün varyeteleri, *E. heterophyllus*, *E. tournefortii* ve *E. vaginatus* ile birlikte yer alırken *E.onopordum*, *E.mersinensi* ve *E. dumani* *E. orientalis* grubu ile birlikte sınıflanmıştır.

Genel olarak değerlendirdiğimizde *Echinops* cinsinin Türkiye’deki taksonları için ortaya konmuş sınıflandırmanın seksiyon ve tür ayrımlarında, dizilerine göre oluşturulan filogeniye uymadığı görülmektedir. Ayrıca morfolojik olarak da farklılık gözlemlenen *E. sphaerocephalus* türünün iki varyetesi iki farklı tür olarak ayrılmaktadır. Benzer şekilde *E. pungens* türüne ait olan tür altı taksonlar da ayrı türler olarak dendogramda yer almaktadır. Sonuç olarak DNA verileri göz önüne alındığında bu taksonların tür seviyesine yükseltilmesinin daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Türkiye *Echinops* taksonlarının DNA barkodlarının belirlenebilmesi amacıyla evrensel çekirdek barkod olarak kabul edilen cpDNA *matK* (719 bp) ve *rbcL* (1091 bp) gen bölgeleri birlikte değerlendirilerek analizler yapılmıştır. Elde edilen Mrbayes ağacında her bir *matK* gen bölgesinin *Echinops* cinsi için uygun barkod olabildiğini göstermiştir.

Bu proje kapsamında planlanan bütün hedeflere ulaşılmış olup, projenin planlandığı gibi başarı ile tamamlanması ile;

Echinops türlerinin genetik yapısı, belirlenmiş,

Elde edilen verilerin gen bankasında erişime açılmasıyla diğer araştırmacıların da yararlanabileceği evrensel bilgi birikimi sağlanmış,

Türkiye *Echinops* cinsi taksonlarının genetik varyasyonları belirlenmiş,

Türkiye’nin biyolojik çeşitliliğine özellikle de genetik çeşitliliğin belirlenmiş

Türkiye’nin sürdürülebilir kalkınmasına, biyolojik çeşitliliğinin belirlenmesi ve korunması açısından ciddi anlamda bilimsel veri sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Jäger, E.J., Arealkarten der *Asteraceen*-Tribus als Grundlage der ökogeographischen Sippencharacteristik. Bot. Jahrb. Syst., 108, 481—497, 1987.
2. Petit, D.P. Le genre *Echinops* L. (Compositae: Cardueae). 1. Position phylétique et interprétation de l'incapitulescence. *Candollea* 43: 467—481, (1988).
3. Susanna A, Garcia-Jacas N, Hidalgo O, Vilatersana R & Teresa G (2006) The Cardueae (Compositae) revisited: Insigns from ITS, trnL-trnF and matK Nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann. Missouri Bot. Grdn.* 93: 150-171.
4. Hedge IC (1975). *Echinops* L. – In: Davis P.H. (ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 5: 609-622.
5. Gemici, Y., Leblebici, E., A new species of *Echinops* (Asteraceae) from Anatolia (Turkey), *Candollea*, 47 (2), 597-599, 1992.
6. Vural C, Dadandı MY (2010). Türkiye *Echinops* L. (Asteraceae) Türlerinin Taksonomik Revizyonu, Proje No: 106T526
7. Panero JL & Funk VA (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and evolution* 47: 757-782.
8. Susanna A, Garcia-Jacas N, Hidalgo O, Vilatersana R & Teresa G (2006) The Cardueae (Compositae) revisited: Insigns from ITS, trnL-trnF and matK Nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann. Missouri Bot. Grdn.* 93: 150-171.
9. Garcia-Jacas N, Garnatje T, Susanna A and Vilatersana R (2002). Tribal and Subtribal Delimitation and Phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A Combined Nuclear and Chloroplast DNA Analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 22, 1:51–64.
10. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
11. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J., (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl. Molec. Biol.* 17: 1105–1109.
12. pers.comm. Ki-Joong Kim

13. Renner SS., (1999). Circumscription And Phylogeny Of The Laurales: Evidence From Molecular And Morphological Data
14. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731–2739.
15. Guindon, S, Gascuel, O., 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
16. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9 (8): 772.
17. Schwarz, G. E., 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6 (2): 461–464.
18. Akaike, H., 1974. A new look at statistical model identification. *IEEE Trans Auto Control*, 19: 716–723.
19. Saitou, N., Nei, M.,. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
20. Geneious version (R6.1.6) created by Biomatters. available from <http://www.geneious.com/>
21. Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
22. Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.