

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE) CİNSİ
RITRODES BUNGE SEKSİYONUNA AİT TAKSONLARIN
cpDNA SEKANS ANALİZİ İLE İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Leyla KIRIM**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Cem VURAL**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Ocak 2011
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE) CİNSİ
RITRODES BUNGE SEKSİYONUNA AİT TAKSONLARIN
cpDNA SEKANS ANALİZİ İLE İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Leyla KIRIM**

**Tezi Yöneten
Doç. Dr. Cem VURAL**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FBY-09-1015 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2011
KAYSERİ**

Doç. Dr. Cem VURAL danışmanlığında **Leyla KIRIM** tarafından hazırlanan “**Türkiye *Echinops L.* (Asteraceae) Cinsi *Ritrodes Bunge* Seksiyonuna Ait Taksonların cpDNA Sekans Analizi ile İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

10/01/ 2011

JÜRİ:

Başkan : Doç.Dr. Cem VURAL

Üye : Doç.Dr. Mehmet Yaşar DADANDI

Üye : Yrd. Doç.Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 25/01/2011 tarih ve 2011/03-03 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Necmettin MARAŞLI

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve bu çalışmanın her aşamasında yönlendirici katkıları ve değerli yardımları için danışman hocam sayın Doç. Dr. Cem VURAL'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın laboratuvar aşamasında öneri ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımını ve desteğini esirgemeyen sevgili Güler TOPRAK, Osman İBİŞ, değerli arkadaşım Esma ÖZHÜNER, dostum Dilek Sönmezer'e, laboratuvar ortamını uyum içinde paylaştığım çalışma arkadaşlarım Dilek CEYLAN, Metin KILIÇ, Handan ŞAPÇI, Dilek Dabanlı'ya teşekkürler.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için FBY-09-1015 numaralı proje kapsamında gerekli maddi desteği sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Ayrıca benim bu günlere gelmemde her türlü destek ve teşviklerini esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

**TÜRKİYE *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE) CİNSİ *RITRODES* BUNGE
SEKSIYONUNA AİT TAKSONLARIN cpDNA SEKANS ANALİZİ İLE
İNCELENMESİ**

Leyla KIRIM

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2011
Tez Danışman: Doç. Dr. Cem VURAL**

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Echinops* L. cinsi, *Ritrodes* Bunge seksiyonuna ait taksonlar arasındaki filogenetik ilişki, cpDNA dizi analizi ile araştırılmıştır.

Ritrodes seksiyonuna ait taksonların filogenetik ilişkileri belirlenirken; cinsin diğer seksiyonlarına ait taksonlar da çalışmaya dahil edilmiştir. Böylece daha sağlıklı bir filogenetik dendogram elde edilmiştir. Her bir taksonun kloroplast DNA’sı *rps16* geninin (800bp) bir bölümünün dizi analizi yapılmıştır. Taksonlar arasındaki genetik uzaklık değerleri 0,0131-0,0013 arasında bulunmuştur. Filogenetik ağaçlar Parsimoni ve Neighbor Joining (NJ) analizi ile üretilmiş ve sonuçta taksonlar dört farklı grup oluşturmuşlardır. Birinci grup tamamen asıl araştırma konumuz olan, *Ritrodes* seksiyonuna ait üç taksonu içermektedir. İkinci grupta *Oligolepis* seksiyonuna ait türler ile birlikte *Echinops* seksiyonundan da *E.ritro* gruplanmıştır. Üçüncü grupta ise *Echinops* seksiyonuna ait türlerden *E. pungens*’in; *pungens*, *polyacanthus* ve *transcaucasicus* varyeteleri bulunmaktadır. Dördüncü grupta ise *E.emilia* tek başına diğer türlerden ayrı olarak bulunmaktadır. Analizi yapılan gen bölgesine göre ortaya çıkan filogenetik sınıflandırma daha önce morfolojik karakterlere göre yapılmış mevcut taksonomiye büyük ölçüde desteklemektedir. Sonuç olarak bu gen bölgesi taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için kullanışlı bir moleküler karakterdir.

Anahtar Kelimeler: Kloroplast DNA (cpDNA); *rps16*; *Ritrodes*.

**INVESTIGATION OF TAXA IN THE GENUS *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE)
RITRODES BUNGE SECTION OF TURKEY BY cpDNA SEQUENCE
ANALYSIS**

Leyla KIRIM

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Science

M.Sc. Thesis, January 2011

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Cem VURAL

ABSTARCT

In this study phylogenetic relationships among taxa of *Ritrodes* Bunge, section of genus *Echinops* L. in Turkey was investigated by using cpDNA sequence analysis. Also some taxa of the other section in this genus were included in this research for generating a more reliable dendrogram. Portion of *rps16* (800bp) gene in which placed in chloroplast DNA was sequenced for each taxon. Genetic distances among taxa ranged from 0,0013 to 0,0131. Taxa were divided into four distinct groups by Parsimoni and Neighbor Joining (NJ) trees analysis. The first group included three taxa of *Ritrodes* section. The second group comprised of the species in *Oligolepis* section while the third group contained *E.ritro*, *E. pungens* var. *pungens*, *E. pungens* var. *polyacanthus* and *E. pungens* var. *transcaucasicus*. The last group included only *E.emilia*. Results of the analysis supported the morphological data. Eventually, this gene region is a useful molecular character for determining the phylogenetic relationships among the taxa used.

Keywords: Kloroplast DNA (cpDNA); *rps16*; *Ritrodes*.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alt sınıf Asteridae	3
2.2. Asterales Takımı	3
2.3. Asteraceae (Compositae) Familyasının Özellikleri.	3
2.4. <i>Echinops</i> L. Cinsi.....	4
2.4.1. <i>Echinops</i> L. Cinsinin Taksonomisinde Kullanılan Morfolojik Karakterler.....	5
2.5. <i>Echinops</i> L. Cinsinin Seksiyon Teşhis Anahtarı (Türkiye’de Yayılış gösteren seksiyonlar).....	6
2.6. <i>Echinops</i> L. Cinsinin Taksonomisi	7
2.6.1. <i>Echinops</i> Seksiyonu	7

2.6.2. <i>Oligolepis</i> Bunge Seksiyonu	8
2.6.3. <i>Ritrodes</i> Bunge Seksiyonu	8
2.7. Moleküler Sistematiik ve Kullanılan Markırlar	10
2.7.1. Morfolojik Markırlar	12
2.7.2. Biyokimyasal Markırlar	12
2.7.3. Moleküler Markırlar	13
2.8. Moleküler Markır Olarak Kloroplast DNA (cpDNA)	14
3. BÖLÜM	
MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Bitki Materyallerinin Temin Edilmesi	16
3.2. Moleküler Çalışmalar	18
3.2.1. DNA İzolasyonu	18
3.2.2. DNA' nın Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	19
3.3. <i>rps16</i> Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	19
3.4. PCR Ürünlerinin Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	21
3.5. <i>rps16</i> Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi	22
3.6. İstatistiksel Analiz	22
4. BÖLÜM	
BULGULAR	24
4.1. Moleküler Çalışmalar	24
4.1.1. DNA Sonuçlarının Gözlenmesi	24
4.1.2. Örneklerin Baz Dizileri	25

4.1.3. Örneklerin Haplotip Çeşitliliği.....	27
4.1.4. Örneklerin Baz Oranları ve İçeriği.....	27
4.1.5. Uzaklık (Distance) Analizi.....	29
4.1.6. Tutumluluk (Parsimony) Analizi	30
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA VE SONUÇLAR	32
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
bp, bç	: Baz Çifti
C	: Sitozin
cpDNA	: Kloroplast DNA'sı
dNTP	: Di Nükleotid Tri-Fosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
G	: Guanin
g	: Göreceli santrifüj gücü
M	: Molar
mM	: Milimolar
NJ	: Neighbor Joining
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
subsp.	: Alttür
T	: Timin
TAE	: Tris, Glasial Asetik Asit, EDTA
V	: Volt
var.	: Varyete
U	: Urasil
u	: Ünite
UV	: Ultraviyole
µl	: Mikrolitre

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. <i>Echinops</i> L. cinsinin seksiyon teşhis anahtarı	6
Tablo 3.1. Bitki materyallerinin listesi ve toplayıcı numaraları.....	16
Tablo 3.2. <i>rps16</i> gen bölgesinin analizi için kullanılan primer.....	19
Tablo 3.3. PCR reaksiyon karışımı	20
Tablo 3.4. PCR döngü programı	20
Tablo 4.1. Örneklere ait dizi eşleştirme sonuçları.....	25
Tablo 4.2. Örneklerin baz içeriği	28
Tablo 4.3. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş örnekler arasındaki genetik uzaklığı gösteren tablo.....	29

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>Echinops</i> L. cinsinin kapitulum ve çiçek yapısı.....	6
Şekil 2.2. <i>Echinops</i> L. cinsine ait taksonların fotoğrafları.....	10
Şekil 4.1. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, sonuçları. M: 100-3000bp DNA moleküler ağırlık belirteci	24
Şekil 4.2. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş örnekler arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren NJ (Neighbor Joining).....	30
Şekil 4.3. Maksimum Parsimoni ağacı.....	31

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Echinops L. cinsi 125 ile 130 kadar türle temsil edilmektedir. Çoğunlukla Kuzey yarıkürede yayılış göstermektedir. Yoğun 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. Genel olarak, birkaç tek yıllık ve iki yıllık tür içeren çok yıllık bir cinstir. *Echinops*, *Ritrodes* Bunge ve *Oligolepis* Bunge olmak üzere üç seksiyona ayrılmıştır. Bu seksiyonlardan *Echinops* ve *Ritrodes* seksiyonlarına ait taksonlar ülkemizin hemen hemen her tarafında yayılış göstermektedir, ancak *Oligolepis* seksiyonuna ait taksonlar Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir [1].

Cinse ait üyeler genellikle insanların yaşama ortamlarına yakın alanlarda, yol kenarlarında, kurak taşlık alanlarda, step alanlarda, az olarak ta korunmuş alanlar ile dağlık bölgelerde yayılış göstermektedir. Çoğu botanikçi bu cinsin taksonlarını toplamaktan kaçınır. Çünkü bitkiler dikenli ve hacimli olduğundan toplaması ve preslenmesi zordur. Aynı zamanda toplanan örneklerin de kapitulumları kurudukça dağılarak muhafazası çok zor bir duruma gelmektedir. Çoğu herbaryum örneğinde rastladığımız dağılmamış kapitulumlar ise çok genç olduğundan bu örneklerin teşhisi oldukça zordur. Çünkü teşhisler olgun kapitulum özelliklerine dayanmaktadır [2,3]. Ayrıca Türkiye Florasının yazımı tamamlandıktan sonraki yıllarda toplanan çok sayıda materyal teşhis edilirken karşılaşılan sorunlar sonucu bazı cinslerdeki problemler dikkati çekmiştir. Birçok cinsin bazı türlerinde, hatta seksiyonlarında açıklığa kavuşturulamamış taksonomik sorunlar vardır. Bu problemleri cinslerin arasında Asteraceae familyasından *Echinops* cinsi de bulunmaktadır [4].

Morfolojik olarak birbirinin aynısı gibi görünen ve farklı isim verilen türler, ancak genotipik yönden farklılıklarının belirlenmesinden sonra kesin olarak tanımlanabilirler. DNA yapısının 1950’li yıllarda keşfedilmesiyle gelişmeye başlayan ve moleküler düzeydeki çalışmalar için kullanılırlar, bitkilerin genetik yapıları ve gen haritalamaları filogenetik çalışmalar için yeni bir dönem başlatmıştır. DNA’nın çoğaltılmasına dayanan PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu, Polymerase Chain Reaction)’ın 1983 yılında Kary Mullis tarafından bulunmasıyla moleküler çalışmalar hızla gelişmeye başlamıştır [5].

Türkiye’de yayılış gösteren *Echinops* cinsi *Ritrodes* seksiyonunun taksonları arasında yaprak morfolojisi, tüy örtüsü ve tüy örtüsünün gövde üzerinde dağılımına göre morfolojik olarak farklılıklar tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı; morfolojik karakterlerin yetersiz kaldığı durumlarda seçilen moleküler yöntemlerin kullanılabilirliğini sınamak ve *Ritrodes* seksiyonun taksonları ve diğer seksiyonlarla arasındaki genetik ilişkiyi ve çeşitliliği kloroplast DNA (cpDNA)’sında bulunan *rps16* geninin (800bç) bir bölümünün dizi analizi ile açıklamaktır.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. Alt sınıf Asteridae

Asteridae altsınıfı 11 takım, 49 familya ve yaklaşık 56 000 türden oluşmuştur. Türlerin 1/3'ü Asteraceae familyasında toplanmıştır. Çok çeşitli ürünleri, çoğunlukla iridoid bileşikler ve alkaloidlerin çeşitli tiplerini veya glikositleri içerirler. Nadiren siyagonetik daha ender olarak saponin ve tanenli maddeler içerirler. Çiçekleri hipoginden epigine kadar değişken, genellikle iyi gelişmiş ve çoğunlukla gösterişli, nadiren çok indirgenmiştir. Korolla çoğunlukla simpetal, nadiren polipetal ve küçük veya yoktur. Stamenler korollo tüpüne bağlı, lob sayısı kadar ve onlarla alternat veya çoğunlukla dairenin bazı üyeleri eksik veya staminodyumlu, apetal çiçeklerde stamen hiçbir zaman 5'den fazla değildir. Polen tanenleri binukleat, triaperturattır. Karpeller 2-5 adettir. Stilus bazen ginobazik, bazen terminaldir. Plasentasyon eksensel, parietal, bazal apikal veya serbest sentral, tohumlar endospermli veya endospermsizdir [6].

2.2. Asterales Takımı

Asterales takımının tek familyası vardır. Otsular nadiren ağaçlardır. Yapraklar alternat, karşılıklı veya hepsi kaidede, stipülsüzdür. Çiçekler erdişi veya tek eşeylidir. Kaliks değişik yapılarda ve tüy şeklinde, petaller 3-5, birleşik bazen bulunmaz. Stamenler 4-5, petallere bağlı, ovaryum 1 lokusludur [6].

2.3. Asteraceae (Compositae) Familyasının Özellikleri

Asteraceae ya da diğer adıyla Compositae çiçekli bitkilerin en büyük familyasıdır. Papatyagiller olarakta isimlendirilen familyaya ait taksonlar dünyanın ekvatorial yağmur ormanları hariç, tamamına yakın kısmında görülebilirler. Yağmur ormanlarının sadece açık alanlarında az sayıda bulunurlar. *Senecio* belkide en büyük ve en geniş yayılışlı

(kozmpolitan) cinstir [6]. Bununla birlikte *Aster*, *Artemisia*, *Chrysanthemum* ve *Saussurea* familyanın en büyük cinsleri arasındadır. Çok zengin olan bu familya yaklaşık 1100 cins ve 2500 kadar tür içerir. Ülkemizde 133 cins ve 1156 kadar türü bulunur. Bazıları süt içeren otsular, çalılar, nadiren ağaç veya tırmanıcılardır. Yapraklar genellikle alternat veya karşılıklı, nadiren dairesel, basit veya birleşiktir. Çiçekler kapitulum durumunda, kapitulumun çevresi 1 veya çok serili involukrum brakteleri ile örtülmüş, erdişi veya tek eşeyli, ışınsal veya zigomorf simetrilidir. Kaliks genellikle papus halini almış veya hemen hemen yoktur. Petaller 4-5, birleşiktir. Korolla iki şekilde, tüpsü ve dilsî; tüpsü korolla uçta belirgin 5 dişli, dilsî korolla 3-5 dişli veya belirgin değildir. Stamenler 5, petallere bağlı, filamentler serbest, anterler birleşiktir. Pistil 1, ovaryum alt durumlu, tek lokuslu, 2 karpelli, ovül tek ve anatropur, plasantasyon bazaldır. Meyve aken ve ucunda genellikle bir papus veya kaliks kalıntısı taşır [6].

2.4. *Echinops* L. Cinsi

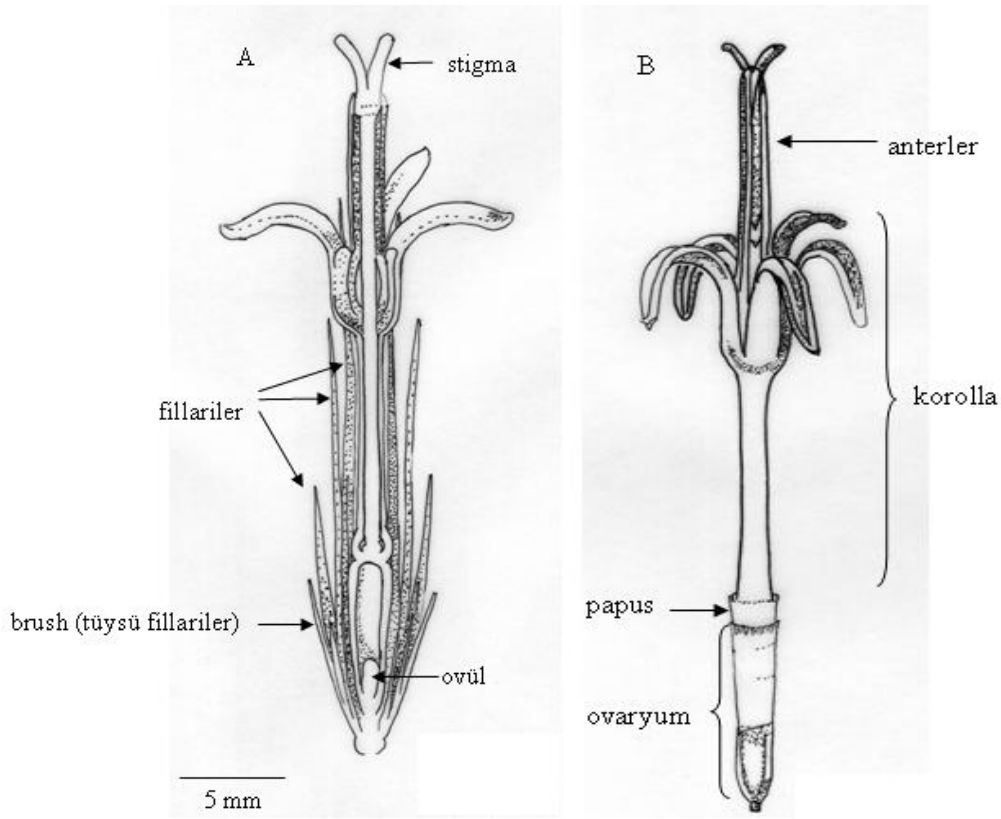
Gövde dik, çoğunlukla sadece en uç kısımlarda seyrek dallı, keçemsi tüylü, tomentoz, bazen salgı tüylü veya çok nadiren tüsüzdür. Yapraklar alternat, pinnat parçalı şekilde bölünmüş (1–2-pinnat) olup, gövdenin tabanından yukarı doğru boyutları küçülür, alt yapraklar petiollu, üsttekiler sesildir. Yapraklar çoğunlukla üzeri yumuşak tüylü, hatta bazen salgı tüylü, nadiren tüsüzdür [1]. Çiçek durumu (kapitulum) tek çiçeklidir ve dal uçlarında yalancı başçıklarda (pseudocephala) toplanmıştır. Kapitulumların bağlandığı merkez küre veya ters-ovat şekilde ve tüsüzdür. Yalancı başçıklar involukrum ile çevrilmiştir. Kapitulumun etrafı çok sayıda fırça şeklinde beyaz sert tüylerle kaplıdır. İnvolukral brakteler 3–5 sırada dizilmiştir. Dıştakiler kısa, linear, üst taraf genişlemiş, orta sıradaki brakteler lanseolat, karinat, kılçık şeklinde daralır. İçtekiler bazen ortadakilerden daha uzun, serbest, alt kısımlar kısmen birleşik ya da birleşerek tüp oluşturmuş üst taraf serbest, keskin sivri uçlu ya da siliat şeklindedir [1]. Korolla, beyaz ya da açık mavi renklindedir. Derince bölünmüş beş lopludur. Stamen 5, adettir. Stigma 2 parçalı, stillusun üst kısımlarında tüsü yapılar taşıyan bir şişkinlik bulunur. Akenler iğ şekilli, yüzey üzerinde paralel olarak yoğun tüylerle çevrili, papus kısa fırça şeklinde serrat tüylerden oluşmuş bir halkasal yapıdadır. Papusdaki dişli sert tüyler alt kısımda az ya da çok birleşmiş; gövdenin uçlarında çok sayıdadır.

Çoğunlukla Kuzey yarıkürede yayılış göstermektedir. Yoğun 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. Genel olarak, birkaç tek yıllık ve iki yıllık tür içeren çok yıllıktır, 125 ile 130 kadar türle temsil edilmektedir [1].

Echinops taksonlarının bilinen çok önemli ekonomik bir kullanımı yoktur. Yine de bu bitkiler tamamen yararsız olarak değerlendirilemez. Tarım arazilerinde tarla yabancı otu olarak görülen türleri tarımsal alanlara çok fazla zarar vermez. Çünkü klasik tarımsal tekniklerle kolayca yok edilebilirler. Bu alanlar dışında da dikenli görüntüsünden dolayı çoğu zaman insanlar tarafından tahrip edilmektedir [1]. *Echinops* cinsinin bazı türleri uzun zamandır peyzaj amaçlı süs bitkisi olarak kullanılmak için batı ülkelerinde yetiştirilmektedir. Örneğin bazı *Echinops* türlerinin Batı Avrupa'da yaygın olarak kültürü yapılır. Bu açıdan bakıldığında henüz kullanılmayan pek çok türün de aynı şekilde süs bitkisi olarak değerlendirilebileceği açıktır. Bazı türlerin süs bitkisi olarak değeri, çiçek açmadan önce ya da çiçekli iken taban yaprakların kurumasıyla azalmaktadır. Bu durum ise stebik ve yarı çöl alanlardaki çoğu tür için geçerlidir. *Echinops* türlerinin bazıları ise bal üretiminde kullanılır ve bu türlerin bal üretimini artırmak için kültürü yapılır. Bu açıdan düşünüldüğünde normalde kültüre uygun olmayan arazilerde kolayca yetiştirilip arıcılıkta kullanılabilir [1].

2.4.1. *Echinops* L. Cinsinin Taksonomisinde Kullanılan Morfolojik Karakterler

- Gövde boyu, çapı, tüy durumu ve rengi.
- Yaprak ayasının genel şekli, tipi ve tüylülük durumu.
- Çiçek durumu (başların) çapı.
- Kapitulum boyu.
- Tüysü fillarilerin (brush) özellikleri, boyu.
- Fillarilerin sayısı ve tüylülük durumu.
- En içteki fillarilerin birleşik olup olamaması ve birleşme oranı.
- Korolla tüpü boyu.
- Aken boyu.



Şekil 2.1. *Echinops* L. cinsinin kapitulum ve çiçek yapısı. A) Kapitulum, B) Çiçek [1].

2.5. *Echinops* L. Cinsinin Seksiyon Teşhis Anahtarı (Türkiye’de Yayılış gösteren seksiyonlar)

Tablo 2.1. *Echinops* L. cinsinin seksiyon teşhis anahtarı [1, 2].

1a. En içteki involukrum brakteleri uzunluklarının yarısı kadar ya da daha fazla birleşmişler.....	Sect. <i>Ritrodes</i> Bunge
b. En içteki involukrum brakteleri serbest ya da en fazla 1\5 kadarlık kısmı birleşmiş 2	
2a. İnvolutrum brakteleri 16-25 adet, en içtekiler birleşerek zarsı silindirik tüp oluşturmuş.....	Sect. <i>Echinops</i>
b. İnvolutrum brakteleri 12-15 adet, En içtekiler birleşerek sağlam derimsi yapıda (genellikle pentagonal) tüp oluşturmuş	Sect. <i>Oligolepis</i> Bunge

2.6. *Echinops* L. Cinsinin Taksonomisi

Alem	: Plantae
Şube	: Magnoliophyta Reveal (çiçekli bitkiler)
Sınıf	: Magnoliopsida Brongn. (iki çenekliler)
Altsınıf	: Asteridae Takht.
Takım	: Asterales Lindl.
Familya	: Asteraceae (Compositae) Berch.&Presl.
Altfamilya	: Carduoideae Cass.ex Sweet
Tribus	: Cardueae Cass.
Subtribus	: Echinopinae O.Hoffm.
Cins	: <i>Echinops</i> L.

2.6.1. *Echinops* Seksiyonu

İnvolutkrum brakteleri 16-25 adet, en içtekiler birleşerek zarsı silindirik tüp oluşturmuştur [1]. Hedge (1975)' e göre bu seksiyondaki türler:

1. *Echinops ritro* L.
2. *Echinops microcephalus* Sibth. & Sm.
3. *Echinops sphaerocephalus* L.
4. *Echinops galaticus* Freyn.
5. *Echinops sintenisii* Freyn.
6. *Echinops pungens* Trautv.
 - a) *E. pungens* var. *polyacanthus* Hedge.
 - b) *E. pungens* var. *transcaucasicus* Hedge.

c) *E. pungens* var. *adenocladus* Hedge.

d) *E. pungens* var. *pungens* Hedge.

7) *Echinops tournefortii* Ledeb.

8) *Echinops heterophyllus* P.H.Davis.

9) *Echinops pannosus* Rech. f.

10) *Echinops vaginatus* Boiss. & Hausskn.

11) *Echinops onupordum* P.H.Davis.

11a) *Echinops mersinensis* Gemici & Leblebici.

12) *Echinops emiliae* O. Schwarz ex P.H.Davis.

2.6.2. *Oligolepis* Bunge Seksiyonu

İnvolutkum brakteleri 12-15 adet, En içtekiler birleşerek sağlam derimsi yapıda tüp oluşturmuştur [1]. Hedge (1975)' e göre bu seksiyondaki türler:

1) *Echinops phaeocephalus* Hand-Mazz.

2) *Echinops melitenensis* Hedge & Hub.-Mor.

2.6.3. *Ritrodes* Bunge Seksiyonu

İnvolutkum brakteleri 16-25 adet, en içtekiler birleşerek zarsı, silindirik tüp oluşturmuştur [1].

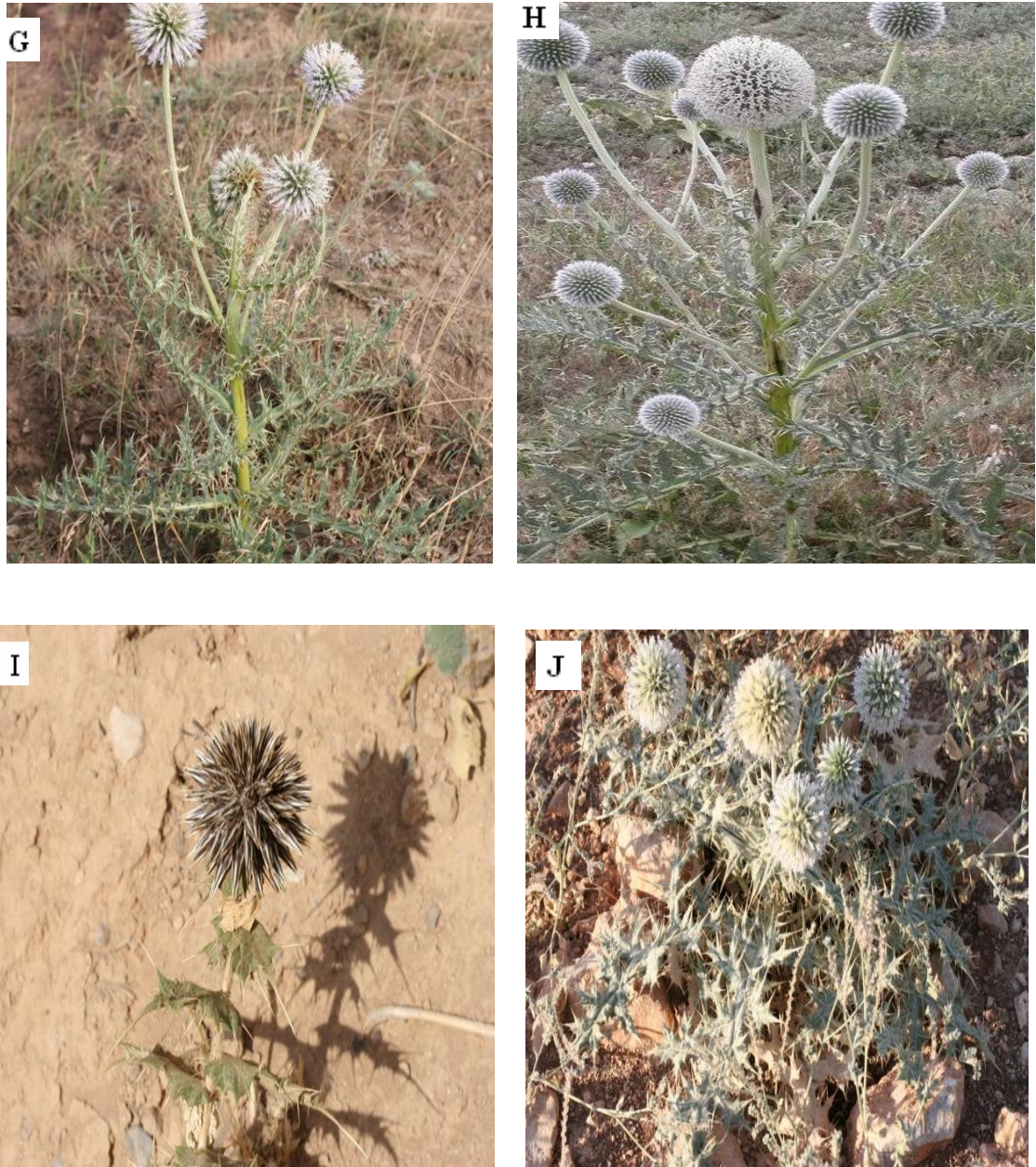
1) *Echinops viscocus* D. C.

a) *E. viscocus* var. *viscocus* Rech. f.

b) *E. viscocus* var. *bithynicus* Rech. f.

2) *Echinops orientalis* Trautv.





Şekil 2.2. *Echinops* L. cinsine ait taksonların fotoğrafları A: *E. ritro*, B: *E. pungens* var. *pungens*, C: *E. emiliae*, D: *E. orientalis*, E: *E. viscosus* subsp. *bithynicus*, F: *E. viscosus* subsp. *viscosus*, G: *E. pungens* var. *polyacanthus*, H: *E. pungens* var. *transcaucasicus*, I: *E. phaeocephalus*, J: *E. melitenensis* (Foto Cem Vural tarafından çekilmiştir).

2.7. Moleküler Sistematik ve Kullanılan Markırlar

Uzun yıllar boyunca araştırmacılar dünyadaki biyolojik çeşitliliği anlamak ve değerlendirmek için büyük bir çaba göstermişlerdir. 17. yüzyıl'da 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 sistematik diye adlandırılan yöntem sistematikte yer almaya başlamıştır [7]. 1960'larda moleküler sistematığın temelini oluşturan genetik materyalin yani DNA'nın keşfi ile bu alandaki çalışmalar daha da hızlanmıştır. Moleküler sistematik alanındaki ilerlemeyle elde edilen sonuçlar, morfoloji temelli sistematik yaklaşımını tamamen devre dışı bırakmasa da, filogenetik çalışmalarda moleküler düzeyde bir yaklaşımın daha güçlü sonuçlar elde edeceğini ortaya koymuştur [8].

Kalıtımları morfolojik, biyokimyasal, protein ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere markır denir [5].

Markırlar kullanılmaya başlandığı dönemden itibaren sürekli geliştirilmiştir. Özellikle PCR'ın keşfi ile bu gelişim hız kazanmıştır. Markır kullanılarak gen etiketlemesi, gen klonlaması, çeşitlilik belirleme, filogenetik analizler, istenilen genotipin seçimi gibi bir çok çalışma yürütülmektedir [5].

Geliştirilen her yeni metodla birlikte bir öncekinden daha etkin, daha basit kullanımı ve tesbiti olan, daha az zaman gerektiren yeni markır yöntemleri bulunmaktadır. Her birinin farklı avantaj ve dezavantajlarının olması sebebiyle çalışmanın amacına göre hangi markırın kullanılacağı belirlenmektedir [5].

Her markır sisteminin avantaj ve dezavantajları vardır. Tek başına bütün özellikleri taşıyan bir markır sistemi yoktur. Bunun sonucunda markır seçerken istenilen öncelikler iyi belirlenmelidir.

İdeal bir markır;

Farklılık göstermeli (polimorfik olmalı): Bireyler arasında farklılık olmalı ve en az %1 sıklıkla görülmeli.

Eşbaskın olmalı (ko-dominant olmalı): Her iki allelide ayırt edebilmeli.

Sonuçlar tekrarlanabilir olmalı (güvenilir olmalı): Farklı veya aynı laboratuvar koşullarında tekrarlanabilmeli, nesilden nesile aktarılabilmesi ve kolaylıkla belirlenebilir olmalı.

Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmemeli (nötr olmalı): Diğer allellerden bağımsız ve etkilenmez olmalı. Bireyin gelişim basamaklarından etkilenmemeli.

Otomasyona uygun ve ekonomik olmalı: Hızlı, kolay ve analiz maliyeti ucuz olmalı, çok amaçlı donanım gerektiren markır sistemleri tercih edilmeli.

Genomdaki dağılımı düzenli olmalı: Genom boyunca markırın sık oluşu polimorfizm için avantajdır [5].

2.7.1. Morfolojik Markırlar

Morfolojik markırlar bitki popülasyonu içinde, bir bitki ya da bir grubu diğerlerinden ayıran seçici özellik, o genotipi ayıran bir markır olarak değerlendirilir [9]. Geçmişte ve günümüzde yaygın olarak kullanılan markırlardır. Ancak sayılarının az olması, çevresel faktörlerden etkilenmeleri gibi dezavantajlara sahiptirler. Ayrıca çoğunlukla dominant özelliktedirler yani sadece dominant fenotipi (AA veya Aa) ve resesif (aa) fenotipten ayırabilirler. Heterozigotları (Aa) homozigot dominantdan (AA) ayırt edemezler. Asıl avantajları analizlerinin kolay olmasıdır [5].

2.7.2. Biyokimyasal Markırlar

Sistemik problemlerin çözümlenmesinde kullanılan ilk biyokimyasal markırlar proteinlerdir. Protein markırları, DNA teknolojisinin henüz gelişmediği dönemlerde önemli ilerlemeler sağlamıştır. Proteinlerin elektroforetik olarak ayrılmasına ve bu proteinlerin substratları ile enzimatik boyanmasını temel alan yöntemdir. 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. Analizlerinin çabuk, tekrarlanabilir ve güvenilir olması bu markırların en önemli avantajıdır [5].

Enzim markırları izoenzimler ve allozimler olmak üzere kendi içinde iki ana gruba ayrılırlar. 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 proteinler olduğu halde aynı tepkimeyi katalize eden enzimlerdir; farklı dokularda veya farklı intrasellüler kompartmanlarda farklı rollere sahiptirler. Eğer bir reaksiyon hücrenin hem sitozolünde hem mitokondrisinde oluyorsa, genellikle farklı izoenzimler tarafından katalize edilir

[5]. Alloenzimler ise aynı lokustaki farklı alleler tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formlardır [10].

İzoenzimlerin 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 [11].

2.7.3. Moleküler Markırlar

Moleküler sistematik çalışmalarda amaç, hedef popülasyonun yapısının aydınlatılması, filogenetik olarak sınırlarının belirlenmesi ve tür içi ve türler arası ilişkilerinin aydınlatılmasıdır. Bu amaçla moleküler markır sistemleri etkili şekilde kullanılmaktadır. DNA dizilerindeki değişime dayanan ve doğal olarak oluşan polimorfizm, bitki ve hayvan genomlarında tür içi ve türler arası varyasyonun temelini oluşturur. Genetik analizler için birçok moleküler markır sistemi geliştirilmiştir [8].

Son yıllarda sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar çeşitli avantajlara sahiptir; çevre faktörlerinden etkilenmezler, çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir, her bir ebeveyninden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini tespit edilebilir [9].

DNA markır sistemlerinin gelişimiyle beraber pek çok durumda protein markırlarına oranla çok daha yüksek derecede polimorfizmin bulunabileceği belirlenmiştir.

Genel olarak DNA markırları, DNA'yı oluşturan nükleik asitlerin sahip olduğu diziliş farkını ortaya koyan markırlardır. DNA markırları günümüzde bitki ıslah çalışmalarında moleküler biyolojinin başvurduğu en önemli araçların başında gelmektedir [12].

Nükleik asitlerdeki bölgelerin farklılıklarına dayalı moleküler markırlar; genetik varyasyonun araştırılması, türlerin taksonomik tanımlanması ve filogenetik akrabalıkların belirlenmesi, soyağacı analizleri, bağlantı haritalamaları ve seleksiyon programları gibi konularda ıslahçılara büyük kolaylık sağlamıştır. Ayrıca moleküler markırların uygulanmasında DNA'yı elde etmek için az miktarda bitki dokusu

gerektirmesi, bitkinin herhangi bir kısmının kullanılabilmesi, stabil olması, ekolojik koşullardan etkilenmemesi gibi yararları da mevcuttur [13].

2.8. Moleküler Markır Olarak Kloroplast DNA (cpDNA)

Moleküler yöntemler, populasyon ya da bireyler arasındaki var olan benzerlik ya da farklılıkların saptanmasında ve taksonomik birimlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla moleküler yöntemlerin kullanılması 1960'lara dayanmaktadır. Populasyon ve türlerin genetik çeşitliliği, polimorfizm ve heterozigotluk seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan ilk moleküler yöntemleri protein ve allozim elektroforezi oluşturmaktadır. Kullanılan moleküler yöntemlerden etkili bir tanesi de DNA dizi analizi yöntemidir. Son zamanlarda moleküler filogenetik çalışmalarda cpDNA'daki dizi farklılıklarının analizi yoğun olarak kullanılmaktadır [14].

cpDNA molekülü bireyler, populasyonlar ve türler arasındaki evrimsel ilişkinin belirlenmesinde etkili bir moleküldür [15].

Kloroplast, bitki hücrelerinde bulunan maternal kalıtmalı, çift zarlı kendine ait DNA'sı olan bir hücre içi organelidir. Bitkilerde cpDNA'nın aynı kloroplast içinde çok fazla kopyası bulunabilir. Ayrıca bir stoplazma içinde birden fazla (20-100) kloroplast bulunabilmektedir. Tamamen fonksiyonel bir kloroplast genomu 120-160 kb uzunluğunda tek bir dairesel DNA molekülünden oluşup, üzerinde yaklaşık 60-80 gen bulunmaktadır [5].

Kloroplast DNA'nın moleküler çalışmalarda etkili bir araç olarak yaygın bir şekilde kullanılmasının çeşitli sebepleri vardır. Bitkilerde cpDNA'nın aynı kloroplast içinde çok fazla kopyası bulunmasından dolayı dokulardan cpDNA izolasyonu kolay olmaktadır. cpDNA molekülü bitkilerde maternal kalıtım modeliyle kalıtılır. Bu sayede geçmişe dönük takipler yapılabilmektedir. Diğer bir özelliği de cpDNA molekülünün evrim hızının çekirdek DNA molekülünün evrim hızından daha düşük olmasıdır. Bu sayede cpDNA'nın gen düzeni ve genom boyutu iyi korunmuştur [16,17].

Bu organelin korunmuş olmasıda pek çok bitkide kodlanmayan bölgeleri amplifiye etmek için kullanılan, evrensel primer çiftlerinin tasarlanmasına olanak kılmıştır [18].

cpDNA üzerinde bulunan, *rps16* gen bölgesi *trnK* ve *trnQ* gen bölgeleri arasında yer almaktadır. *rps16* gen bölgesi, türler arasındaki evrimsel ilişkinin belirlenmesinde kullanılan moleküler araçtır. *rps16* gen bölgesindeki dizi farklılıkları türlerin, cinslerin ve familyaların karşılaştırılmalarında kullanılmaktadır. [19].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyallerin Temin Edilmesi

Çalışmada kullanılan bitkiler Tübitak 1001 Araştırma Projesi 106T526 nolu Proje kapsamında toplanmıştır. Örneklerin alındığı yerin adres bilgileri ve toplama tarihleri arazi defterine kaydedilmiştir. Örnekler gazete veya kurutma kağıtları arasında preslenerek kurutulduktan sonra, kartonlar üzerine örnekler ait ilk bilgilerin etiketlenerek kaydı yapılmıştır. Toplanan bitki örnekleri herbaryum materyali haline getirilerek Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda saklanmaktadır. Çalışma da kullanılan bitkilerin toplanma tarihleri, toplanma yeri ve toplayıcı bilgileri Tablo 3.1 verilmiştir.

Tablo 3.1.Bitki materyallerinin listesi ve toplayıcı bilgileri

Örnek No	Örnek Adı	Toplandığı yer, tarih ve toplayıcı bilgileri
1	<i>E. ritro</i>	Tekirdağ, Malkara-Keşan, yol kenarı, 40° 51.123'N, 26° 50.163'E, 125 m, 09.07.2008, C. Vural (4523)
2	<i>E. pungens</i> var. <i>pungens</i>	Giresun, Alvera Şebinkarahisar 5-6 km. Aktepe çevresi, 40° 18.882'N, 038° 41.659'E, 1522 m, 22.08.2007, M. Y. Dadandı, C. Vural (4414)
3	<i>E. pungens</i> var. <i>polyacanthus</i>	Erzurum, Horasan-Eleşkirt yolu, 39° 76.557'N, 42° 17.838'E, 1735 m, 18.08.2009, C. Vural (4757)

(Tablo 3.1'in devamı)

4	<i>E. pungens</i> var. <i>transcaucasicus</i>	Kars, Kars-Ardahan il sınırı, 41° 04.299'N, 43° 18.897'E, 1990 m, 19.08.2009, C. Vural (4763)
5	<i>E. emiliae</i>	Antalya, Antalya-Kemer, Tahtalı Dağı, Karapınar yaylası-Büyük Zirve, hareketli iri taşlıklar, dağ stepi, 36° 32.473'N, 30° 25.456'E, 2200 m, 21.08.2009, C. Vural (4603)
6	<i>E. orientalis</i>	Mersin, Mersin-Çamlıyayla, 37° 39.132'N, 034° 42.256'E, 896 m, 01.07.2008, C. Vural (4496)
7	<i>E. viscosus</i> subsp. <i>bithynicus</i>	Çankırı, Çankırı- Kastamonu 20.km Yol kenarı, 26.08.2009, C. Vural (4771)
8	<i>E. viscosus</i> subsp. <i>viscosus</i>	Antalya, Antalya Kaş-Finike arası 33-34.km, 36° 13.891'N, 029° 26.283'E, 74 m 19.07.2007, M. Y. Dadandı, C. Vural (4333)
9	<i>E. melitenensis</i>	Malatya, Malatya-Gölbaşı 23. km, 38°16.732'N, 38° 05.136'E, 1096 m, 05.08.2007, M. Y. Dadandı, C. Vural (4370)
10	<i>E. phaeocephalus</i>	Şırnak, Şırnak- Cizre Kasrik Boğazı, 37° 23.404'N, 42° 10.857'E, 404 m, 06.08.2008, C. Vural (4583)
11	<i>Senecio vulgaris</i>	Kayseri, Talas yolu 10.km, 20.07.2009, L. Kırım (1001)

Tablo 3.1 verilen 9 ve 10 kodlu örnekler *Oligolepis* seksiyonuna ait, 6, 7 ve 8 kodlu örnekler *Ritrodes* seksiyonuna ait 1, 2, 3, 4 ve 5 kodlu örnekler *Echinops* seksiyonuna ve 11 kodlu örnek *Senecio* cinsine aittir. Her bir örnekten birer birey çalışılmıştır.

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit) kullanılmıştır. Herbaryumda saklanmakta olan kuru örnekler havan ve tokmak yardımıyla sıvı azot kullanılarak ezilmiştir. Ezilen örnekler -20 °C’de saklanmıştır.

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 °C’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.
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.

3.2.2. DNA' nın Agaroz Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

İzolasyon işleminden sonra DNA %0,8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun için 25 ml'lik 0,5X TAE tamponu içerisinde 0,5 g agaroz konularak, mikrodalga fırında eritilmiştir. İçerisine 10 mg/ml'lik Ethidium Bromide çözeltisinden 6 µl ilave edilerek biraz soğuması beklenir ve manyetik karıştırıcıda karışım 50–55°C' ye gelinceye kadar karıştırılır. Hazırlanan taraklı jel kabine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülerek oda sıcaklığında 8-10 dakika polimerize olmaya bırakılmıştır. Taraklar çıkartılarak jel 0,5X TAE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirilmiş ve kuyucuklara 10 µl total DNA ve 2 µl 6X stok yükleme boyasından (%0,025 ksilen siyanol, %0,025 bromfenol blue ve %40 sukroz) otomatik pipetler aracılığı ile yüklenerek 60 V doğrusal akım verilerek örnekler jel üzerinde, elektriksel alanda 30 dakika yürütülmüştür. Jeller Kodak Gel Logic 1500 marka görüntüleme sistemi ile UV altında görüntülenip fotoğrafı çekilmiştir.

3.3. *rps16* Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Her bir örnek için elde edilen DNA'lar, Kloroplast DNA'nın *rps16* bölgesi için kaynak olarak kullanılmıştır. *rps16* gen bölgesini çoğaltmak için ileri Cp2F ve geri Cp2R primer çiftleri kullanılmıştır.

Tablo 3.2. *rps16* gen bölgesinin analizi için kullanılan primer [20,21].

Primer İsmi	Baz Uzunluğu (bç)	%GC	Primer Baz Dizisi (5'-3')
Cp 2F	24	45.8	5'-TGC GGA TCG AAC ATC AAT TGC AAC-3'
Cp 2R	24	50.0	5'-GTG GTA GAA AGC AAC GTG CGA CTT-3'

Tablo 3.3. PCR reaksiyon karışımı

Kimyasallar	Alınan Hacim	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	: 23.5µl	—
PCR tamponu (stok 10X)	: 5 µl	1X
MgCl ₂ (stok 25mM)	: 5 µl	2.5 mM
İleri Primer (stok 10µM)	: 1.67 µl	0.334 µM
Geri Primer (stok 10µM)	: 1.67 µl	0.334 µM
dNTPs (stok 10mM)	: 1.67 µl	0.334 mM
BSA (stok 10mg/ml)	: 4 µl	0.8 mg/ml
Taq DNA Polimeraz (5u/ µl)	: 0.83 µl	4.15 u
DNA (1/4 oranında seyreltilmiş)	: 6.67 µl	—
Toplam Hacim	: 50 µl	—

Tablo 3.4. PCR döngü programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94 °C	2.30 dk	1
Denatürasyon	94 °C	1.00 dk	35
Bağlanma	57 °C	1.00 dk	35
Uzama	72 °C	2.30 dk	35
Son- Uzama	72 °C	10.00 dk	1
Bekleme	4 °C	—	—

Çalışma koşullarının uygun olması için DNA, primer, $MgCl_2$, dNTP, Taq DNA polimeraz, BSA konsantrasyonları optimize edilmiştir. Çalışmada, PCR için son hacim 50 µl olacak şekilde steril 0,2 ml'lik steril ependorf tüpler hazırlanmıştır (Tablo 3.4). Her PCR reaksiyonu için 1 adet negatif kontrol (template DNA içermeyen kontrol reaksiyon tüpü) ve 1 adet pozitif kontrol (daha önce standart markıra göre doğru PCR ürünü veren DNA'ya sahip tüp) kullanılarak amplifikasyonun doğru olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.4. PCR Ürünlerinin Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için DNA %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun için 150 ml'lik 0,5X TAE tamponu içerisinde 3 g agaroz konularak, mikrodalga fırında eritilmiştir. İçerisine 8 µl ethidium bromide ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karışım 50–55°C' ye gelinceye kadar karıştırmış ve hazırlanan taraklı jel kabinine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülerek oda sıcaklığında 15-20 dakika polimerize olmaya bırakılmıştır. Tarakları çıkartılarak jel 0,5X TAE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirilmiş ve kuyucuklara 10 µl total DNA ve 2 µl 6X stok yükleme boyasından (%0,025 ksilen siyanol, %0,025 bromfenol blue ve %40 sukroz) otomatik pipetler aracılığı ile yüklenerek 90 V doğrusal akım verilerek örnekler jel üzerinde, elektriksel alanda 60 dakika yürütülmüştür. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların varlığı UV ışığı ile gözlenmiştir. Amplifikasyonu gerçekleştiren ürünlerin bir sonraki işleme kadar -20°C 'de muhafazası sağlanmıştır. Amplifikasyonu gerçekleşmeyen örnekler için PCR işlemi gerçekleşinceye kadar tekrar edilmiştir. PCR reaksiyonları Sensoquest labcycler marka gradiyent thermocycler kullanılarak yapılmıştır. Jeller Kodak Gel Logic 1500 marka görüntüleme sistemi ile UV altında görüntülenip fotoğrafı çekilmiştir.

3.5. *rps16* Gen Bölgesinin DNA Dizi Analizi

Her bir örnek için elde edilen PCR ürünlerinin 10 µl'sinin agaroz jel elektroforezinde kontrolü yapıldıktan sonra geriye kalan kısım DNA dizi analizi için alınmıştır.

Her bir örnek için DNA dizi analizi her iki yönde de yapılmıştır. DNA dizi analizi, otomatik DNA dizi analizi sisteminde (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) RefGen (ODTÜ-Teknopark/Ankara) Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Her bir örnek için otomatik DNA dizi analizi sisteminden elde edilen ham dizi analiz verileri, dizilerin hizalanması ve düzenlenmesi (Sequence alignment and editing) için BioEdit version 7.0.9.0 [22] programına aktarılmıştır. Her bir örnek için aynı bölgeye ait ileri ve geri (Forward ve Revers) primerler ile elde edilen dizilerin kromatogramları tek tek gözden geçirilmiş ve her bir örnek için ilgili bölgenin en ortak (consensus) dizileri oluşturulmuştur. Hizalanan dizilerin başlangıç ve sondaki fazlalıkları kesilip aynı uzunluğa getirilmiştir.

Filogenetik analizler için evrimsel ağaç oluşturma metotlarından olan uzaklık (distance) ve tutumluluk (parsimoni) kullanılmıştır.

Örneklere ait dizi analiz verileri DnaSP Version 5.00.04 [23] adlı programa aktarılmış, monomorfik ve polimorfik bölgeler, parsimoni olarak bilgi içeren bölgeler, haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd), nükleotid çeşitliliği (nucleotide diversity, P_i , π) ayrı ayrı hesaplatılmıştır.

Örneklerin baz kompozisyonlarının hesaplanması için oluşturulan DNA matriksi MEGA version 4.02 [24, 25] adlı programa aktarılmış ve programdan Kimura 2-Parametre baz değişim modeli seçilerek uzaklık (distance) analizi bu programda yapılmıştır. Uzaklık (Distance) analizi için Neighbor Joining adlı algoritma , ağaç türetme tekniği olarak kullanılmıştır. Oluşturulan ağaçlardaki soy hatlarının istatistiksel olarak ne kadar desteklendiğini belirlemek için bootstrap analiziyle (10.000 replicates) elde edilen değerler oluşturulan ağaç üzerinde gösterilmiştir.

Oluşturulan DNA veri matriksi MEGA version 4.02 adlı programa aktarılmış ve tutumluluk (parsimoni) analizi gerçekleştirilmiştir. Üretilen olası en kısa ağaçların ağaç uzunlukları (tree lenght, TL), tutarlılık indeksi (consistency index, CI), ve koruma indeksi (retention index, RI) belirlenmiştir.

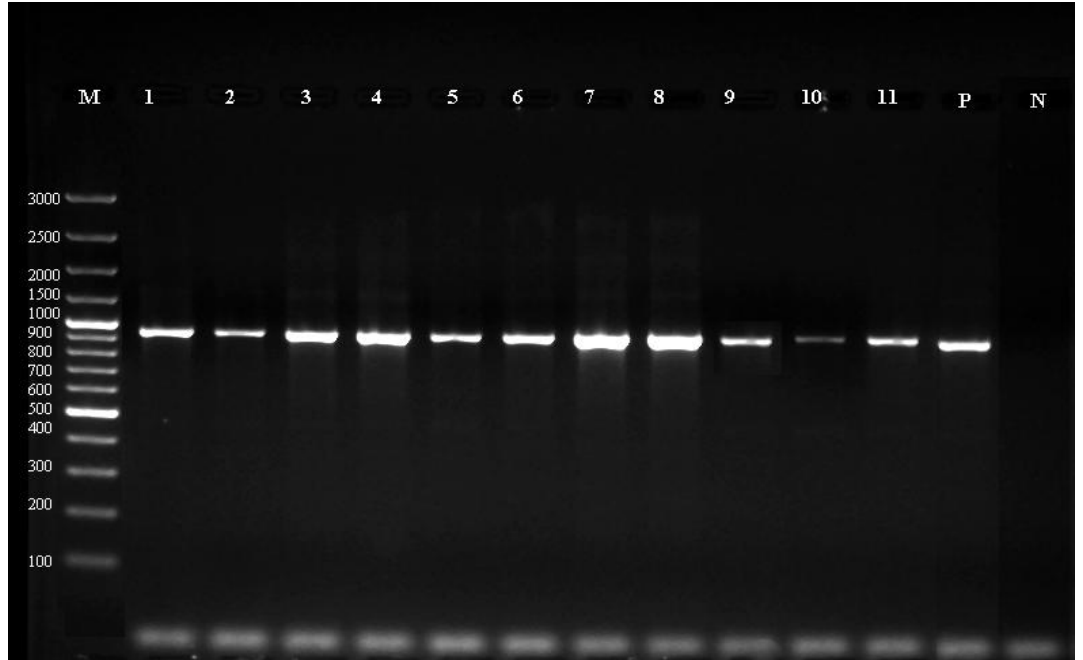
4. BÖLÜM

BULGULAR

4.1. Moleküler Çalışmalar

4.1.1. DNA Sonuçlarının Gözlenmesi

Çalışma kapsamında kullanılan örnekler kod numaraları ile birlikte Tablo 3.1 verilmiştir. Örneklerin PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir. Bütün örnekler için yapılan PCR'da bant elde edilmiştir. Jelde, pozitif kontrol için *E. orientalis* kullanılmıştır. Negatif kontrol ise reaksiyon karışımında genomik DNA dışındaki tüm bileşenleri içermektedir.



Şekil 4.1. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, sonuçları M: 100-3000bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

4.1.2. Örneklerin Baz Dizileri

Her bir örnek için aynı bölgeye ait ileri ve geri (Forward ve Revers) primerler ile elde edilen dizilerin kromatogramları tek tek gözden geçirildi ve Tablo 4.1’de verilen her bir örnek için ilgili bölgenin en ortak (consensus) dizileri elde edildi.

Tablo 4.1. Örneklerle ait dizi eşleştirme sonuçları. Noktalar (.) aynı nükleotitlere, atlamalar (-) delesyonlara karşılık gelmektedir.

	10	20	30	40	50	60	70
E.ritro	TCTTATTCTTACATCCTCCATTTTATATGGGAATGAAGGTGCTCTTGGCTCGACGTCGTTTGTCTATTCTACTA						
E.pungens var.pungens	.T.....A.....A.....						
E.pungens var.polyacanthus	A.....A.....						
E.pungens var.transcaucasicus	A.....A.....						
E.emiliae	A.....A.....						
E.orientalis	A.....A.....						
E.viscosus subp.bithnicus	A.....T.A.....						
E.viscosus subp.viscosus	A.....A.....						
E.melitenensis	GA..G..G.....A.....						
E.phaeocephalus	G.....A.....						
Senecio vulgaris	C.....TAG.A.....						

	80	90	100	110	120	130	140	150
E.ritro	GAACCCCTCTTTTTTATTGGGTTGTAATGTAAATAGTTCATGATGGAGCTCGAGTAGAAAGTATTGATTAATTTT							
E.pungens var.pungens								
E.pungens var.polyacanthus								
E.pungens var.transcaucasicus								
E.emiliae								
E.orientalis								
E.viscosus subp.bithnicus								
E.viscosus subp.viscosus								
E.melitenensis								
E.phaeocephalus								
Senecio vulgaris	T.....							

	160	170	180	190	200	210	220
E.ritro	CTCAGGGGCAACGATCTAGGGTTAATGCCAATCAATAAATTGGAACAACCTCGTAAGTATATCTTCGATATAGAA						
E.pungens var.pungens							
E.pungens var.polyacanthus							
E.pungens var.transcaucasicus							
E.emiliae							
E.orientalis							
E.viscosus subp.bithnicus							
E.viscosus subp.viscosus							
E.melitenensis							
E.phaeocephalus							
Senecio vulgaris							

	230	240	250	260	270	280	290	300
E.ritro	ATCGAAAGGACCGATTCGAGCAAATTTTCAATTAAAAAAA-TTTGTTGGAACGGCTAAAACTTTTCGATCCAC							
E.pungens var.pungens	A.....							
E.pungens var.polyacanthus	A.....G.....							
E.pungens var.transcaucasicus	A.....							
E.emiliae	TT.....A.....							
E.orientalis	A.....							
E.viscosus subp.bithnicus	A.....							
E.viscosus subp.viscosus	A.....							
E.melitenensis	A.....							
E.phaeocephalus	A.....							
Senecio vulgaris	T..G.....T...C.....A..-.....C..A.....T...T.T							

(Tablo 4.1' in devamı)

	310	320	330	340	350	360	370
E.ritro	AGTGTATCGCGCGGGAATCAACCGTCGGTATGATTCTTTGATAGAAAGAAATCACAAAAGGGGTATGTTGCTACC						
E.pungens var.pungens							
E.pungens var.polyacanthus							
E.pungens var.transcaucasicus							
E.emiliae							
E.orientalis	A.....						
E.viscosus subp.bithnicus	A.....						
E.viscosus subp.viscosus	A.....						
E.melitenensis	A.....						
E.phaeocephalus	A.....						
Senecio vulgaris	AC.....T.....						

	380	390	400	410	420	430	440	45
E.ritro	ATTTTGAAAGGATTAAAGAAGCACCGAAGTAATGCCTAAACCCAATGATTTAAAACAAAGATAAAGGATCCCAGAA							
E.pungens var.pungens								
E.pungens var.polyacanthus								
E.pungens var.transcaucasicus								
E.emiliae	T.....							
E.orientalis								
E.viscosus subp.bithnicus								
E.viscosus subp.viscosus								
E.melitenensis								
E.phaeocephalus								
Senecio vulgaris	T.....T.....							

	460	470	480	490	500	510	520
E.ritro	CAAGGAAACACCACTTCAATTGTCTCACGGATCCGAATAAAGAATCCAAATAGATTTTAAACGAGACAAAA--GG						
E.pungens var.pungens	--..						
E.pungens var.polyacanthus	--..						
E.pungens var.transcaucasicus	--..						
E.emiliae	--..						
E.orientalis	--G..						
E.viscosus subp.bithnicus	-GG..						
E.viscosus subp.viscosus	-GG..						
E.melitenensis	-GG..						
E.phaeocephalus	-GG..						
Senecio vulgaris	TG..G.....A.G..T.....A.....C.....AG..						

	530	540	550	560	570	580	590	60
E.ritro	GGGGTTAAAGACCACTCAATAAAAAATATCTTAAAGAAAAATCTTTAAGATATTTGAGAATTATTCAACTTGAG'							
E.pungens var.pungens								
E.pungens var.polyacanthus								
E.pungens var.transcaucasicus								
E.emiliae								
E.orientalis								
E.viscosus subp.bithnicus								
E.viscosus subp.viscosus								
E.melitenensis								
E.phaeocephalus								
Senecio vulgaris	C.TTT---.....T.....T.....A..T.....							

	610	620	630	640	650	660	670
E.ritro	TTATGAGTACAAATGATTTGTTCTTTTTCAGTAAGGAAGCTAAATAAA-----TATGAGTTAAATT						
E.pungens var.pungens	G.....						
E.pungens var.polyacanthus	G.....						
E.pungens var.transcaucasicus	G.....						
E.emiliae	G.....						
E.orientalis	G.....						
E.viscosus subp.bithnicus	G.....						
E.viscosus subp.viscosus	G.....						
E.melitenensis	G.....						
E.phaeocephalus	G.....						
Senecio vulgaris	T..AG.....G.....AATATAAAAGGAC.....						

(Tablo 4.1.' in devamı)

	680	690	700	710	720	730	740	750
E.ritro	ATAGGCTAATTTATTTTACGGATTCCCTTCCTATTTATTATAAATTTATTATTATAAATTTATCCATAGACAAAAC							
E.pungens var.pungens								
E.pungens var.polyacanthus								
E.pungens var.transcaucasicus								
E.emiliae								
E.orientalis								
E.viscosus subp.bithnicus								
E.viscosus subp.viscosus								
E.melitenensis								
E.phaeocephalus								
Senecio vulgaris								

	750	760	770	780	790	800
E.ritro	ACTTCGAATCATTCTTCGAGCCGTACGAGGAGAAACTTCCTATACGG					
E.pungens var.pungens						
E.pungens var.polyacanthus						
E.pungens var.transcaucasicus						
E.emiliae						
E.orientalis						
E.viscosus subp.bithnicus						
E.viscosus subp.viscosus						
E.melitenensis						
E.phaeocephalus						
Senecio vulgaris						

4.1.3. Örneklerin Haplotip Çeşitliliği

Örneklerin haplotip sayısını belirlemek için DnaSP Version 5.00.04 adlı programa aktarıldı, haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd) 1,000 olarak tespit edildi. Haplotip çeşitliliğinin 1'e yakın olması dizi analizi yapılan bireylerin her birinin farklı bir haplotipe sahip olduğu anlamına gelmektedir. Nükleotid çeşitliliği (nucleotide diversity, P_i , π) 0,01366 olarak tespit edildi. Nükleotid çeşitliliği (n) populasyon içerisinde pozisyon başına düşen nükleotid farklılıklarının veya diziler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalaması olup genetik varyasyonun ölçüsü olarak gösterilmektedir.

4.1.4. Örneklerin Baz Oranları ve İçeriği

rps16 geninin dizi analizi yapılan 800 baz çiftlik kısmında elde edilen baz oranları Tablo 4.2'de verildi. Tablo 4.2 incelendiğinde A: % 35.1, G: % 17.6, C: % 15.6, T(U): 31.7 şeklinde olduğu görülür. Örneklerle ilişkin DNA dizileri A – T'ce nispeten zengin olup (%66.6), G – C oranı daha azdır (%33.2).

Tablo 4.2. Örneklerin baz içeriği

	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
E.ritro	32.0	15.7	34.9	17.4	788	28.5	17.1	34.6	19.8	263	36.1	14.4	31.2	18.3	263	31.3	15.6	38.9	14.1	262
E.pungens var.pungens	31.8	15.6	35.2	17.4	789	28.5	17.1	34.6	19.8	263	35.7	14.1	31.9	18.3	263	31.2	15.6	39.2	14.1	263
E.pungens var.polyacanthus	31.7	15.7	35.1	17.5	789	28.5	17.1	34.6	19.8	263	35.4	14.4	31.9	18.3	263	31.2	15.6	38.8	14.4	263
E.pungens var.transcaucasicus	31.7	15.7	35.2	17.4	789	28.5	17.1	34.6	19.8	263	35.4	14.4	31.9	18.3	263	31.2	15.6	39.2	14.1	263
E.emiliae	31.5	15.9	35.0	17.7	775	28.7	17.1	34.1	20.2	258	34.5	14.7	32.2	18.6	258	31.3	15.8	38.6	14.3	259
E.orientalis	31.4	15.6	35.4	17.6	789	28.4	16.3	34.8	20.5	264	35.1	14.5	32.1	18.3	262	30.8	16.0	39.2	14.1	263
E.viscosus subp.bithnicus	31.8	15.6	35.1	17.6	790	28.4	16.7	34.8	20.1	264	35.5	14.5	31.7	18.3	262	31.4	15.5	38.6	14.4	264
E.viscosus subp.viscosus	31.6	15.4	35.2	17.7	790	28.4	16.3	34.8	20.5	264	35.5	14.5	31.7	18.3	262	31.1	15.5	39.0	14.4	264
E.melitenensis	31.6	15.3	35.0	18.1	789	28.1	16.7	34.6	20.5	263	35.5	13.7	31.3	19.5	262	31.1	15.5	39.0	14.4	264
E.phaeocephalus	31.6	15.4	35.1	17.8	790	28.4	16.7	34.8	20.1	264	35.5	14.1	31.3	19.1	262	31.1	15.5	39.0	14.4	264
Avg.	31.7	15.6	35.1	17.6	787.8	28.5	16.8	34.7	20.1	262.9	35.4	14.4	31.7	18.5	262	31.2	15.6	39.0	14.3	262.9

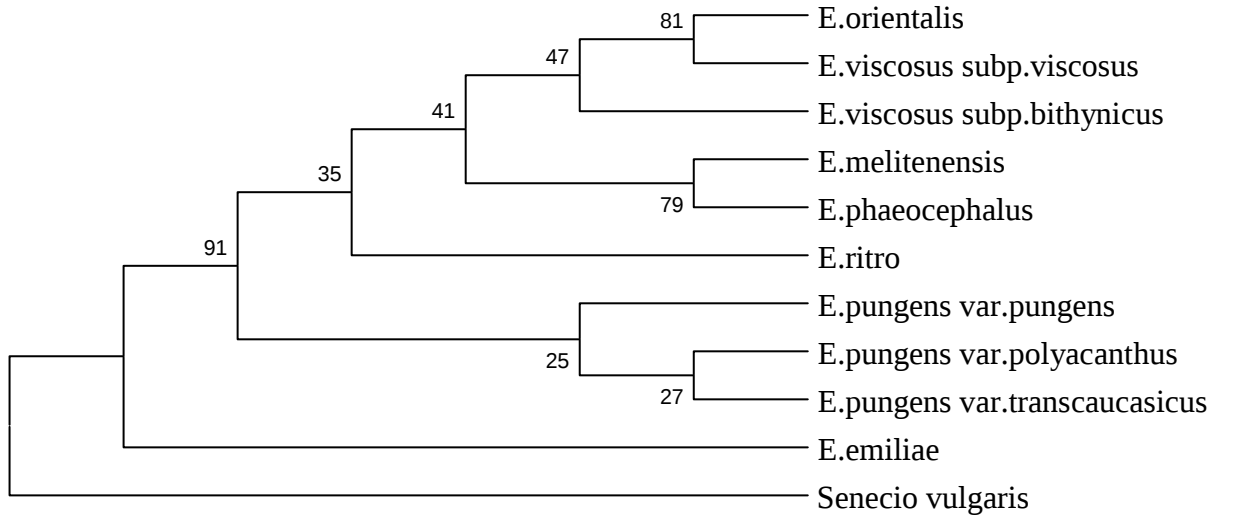
4.1.5. Uzaklık (Distance) Analizi

MEGA programı ve Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak elde edilen örnekler arası uzaklık matrisi Tablo 4.3’de verildi. Tablo 4.3 incelendiğinde en küçük genetik uzaklık değeri (0,0013); 2 ve 4, 3 ve 4 kod numaralı örnekler arasında gözlenirken en büyük genetik uzaklık değeri (0,0131) ise 5 ve 9 kod numaralı örnekler arasında gözlemlendi. Bu değerler, cins içerisinde genetik olarak önemli derecede farklılıklar olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.3. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş örnekler arasındaki genetik uzaklığı gösteren tablo.

[	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10]
[1]	*									
[2]	0.0052	*								
[3]	0.0052	0.0026	*							
[4]	0.0039	0.0013	0.0013	*						
[5]	0.0091	0.0065	0.0065	0.0052	*					
[6]	0.0104	0.0078	0.0078	0.0065	0.0117	*				
[7]	0.0065	0.0039	0.0039	0.0026	0.0078	0.0065	*			
[8]	0.0065	0.0039	0.0039	0.0026	0.0078	0.0052	0.0026	*		
[9]	0.0091	0.0078	0.0091	0.0078	0.0131	0.0118	0.0078	0.0078	*	
[10]	0.0052	0.0052	0.0052	0.0039	0.0091	0.0078	0.0039	0.0039	0.0039	

Çalışmada *rps16* geninin 800 bazlık kısmının dizi analizine göre örnekler arasındaki ilişkiler Şekil 4.2’de verilen NJ ağacında gösterilmektedir. NJ ağacı oluşturmak için Kimura 2 Parametre baz değişim modeline göre elde edilen uzaklık matrisi kullanıldı. Bu NJ ağacı incelendiğinde (Şekil 4.2) farklı seksiyona ait *Senecio vulgaris*’nin ilk olarak ayrıldığı gözlenmiştir. Kalan örneklerin ise dört ana soy hattı şeklinde gruplandığı görülmektedir. Birinci ana soy hattı *E. orientalis*, *E. viscosus* subsp. *viscosus*, *E. viscosus* subsp. *bithynicus*, ikinci ana soy hattı *E. ritro*, *E. melitenensis*, *E. phaeocephalus*, üçüncü soy hattı *E. pungens* var. *transcausicus*, *E. pungens* var. *polyacantus*, *E. pungens* var. *pungens*, dördüncü soy hattı ise *E. emilia*’den oluşmaktadır. Birinci ana soy hattı % 91’lik bootstrap değeri ile desteklenmektedir.

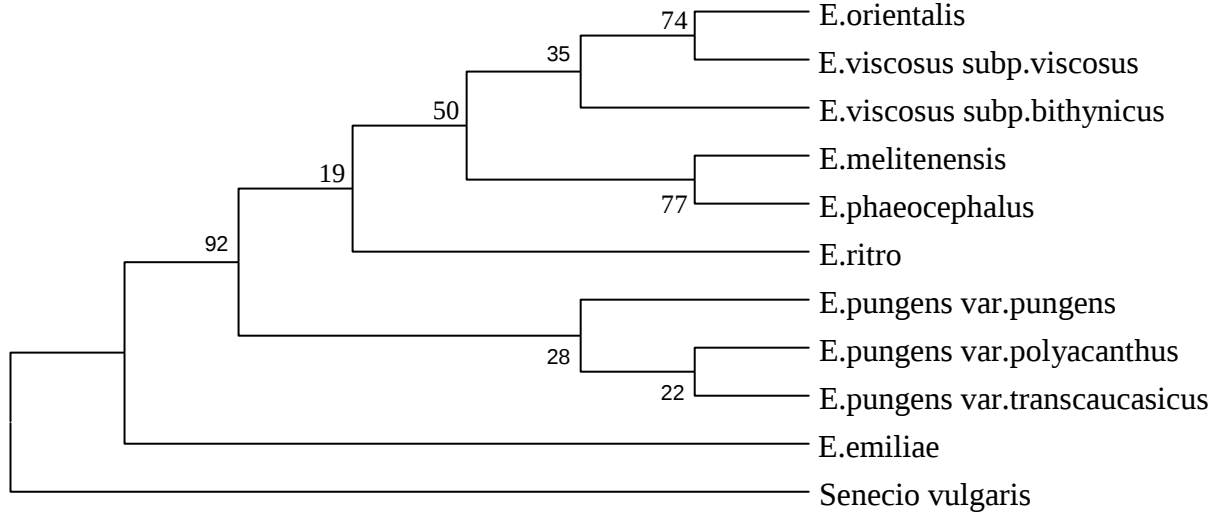


Şekil 4.2. Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak oluşturulmuş örnekler arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren NJ (Neighbor Joining) ağacı

4.1.6. Tutumluluk (Parsimoni) Analizi

Örneklerin bir araya getirilmesiyle elde edilen DNA veri setinde *rps16* geninin 800 bazlık kısmının 770 nükleotid pozisyonunda benzerlik (monomorfik bölge) tespit edilirken (% 96.25), 16 nükleotid pozisyonunda varyasyon (polimorfik bölge) gözlemlendi (% 2). Bu 16 değişken pozisyonlardan 4'si transisyon (% 25), 12'si transversiyondur (% 75). Bu pozisyonlardan 5 tanesi (8, 29, 355, 409, 723. bölgeler) parsimoni olarak bilgi içeren bölge, 11 tanesi (1, 2, 5, 17, 27, 260, 261, 276, 632, 791, 793. bölgeler) parsimoni olarak bilgi içermeyen bölgelerdir. On dört nükleotid pozisyonunda delesyon gözlemlendi (%1.75).

Bu bilgi içeren bölgeler kullanılarak MEGA programı programında yürütülen parsimoni analizi sonucunda Şekil 4.3'e verilen maksimum parsimoni oluşturulmuştur. Ağaç uzunluğu (tree length, TL) 63, tutarlılık indeksi (consistency index, CI) 0.83 ve koruma indeksi (retention index, RI) 0.90 bulunmuştur.



Şekil 4.3. Maksimum Parsimoni ağaç.

Maksimum Parsimoni ağacı incelendiğinde (Şekil 4.3) farklı seksiyona ait *Senecio vulgaris*'nin ilk olarak ayrıldığı gözlenmiştir. Kalan örneklerin ise dört ana soy hattı şeklinde gruplandığı görülmektedir. Birinci ana soy hattı *E. orientalis*, *E. viscosus* subsp. *viscosus*, *E. viscosus* subsp. *bithynicus*, ikinci ana soy hattı *E. ritro*, *E. melitenensis*, *E. phaeocephalus*, üçüncü soy hattı *E. pungens* var. *transcaucasicus*, *E. pungens* var. *polyacanthus*, *E. pungens* var. *pungens*, dördüncü soy hattı ise *E. emilia*'den oluşmaktadır. Birinci ana soy hattı % 92'lik bootstrap değeri ile desteklenmektedir. Dallar üzerindeki rakamlar söz konusu grubun yüzde kaçında bu grubun olduğunu göstermektedir.

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Türkiye Florasından *Echinops* L. cinsi üyelerine ait sınıflandırma 1975 yılında Hedge tarafından morfolojik özelliklere dayandırılarak düzenlenmiştir [2]. Floran'ın yazımı tamamlandıktan sonraki yıllarda toplanan çok sayıda materyal teşhis edilirken karşılaşılan olumsuzluklar nedeni ile bazı cinslerdeki problemler dikkati çekmiştir. Birçok cinsin bazı türlerinde, hatta seksiyonlarında açıklığa kavuşturulamamış taksonomik sorunlar vardır. Flora'nın yazımı esnasında sınırlı zaman ve materyal ile çalışıldığı için çoğu cins veya seksiyonlardaki eksiklikler florada belirtilmiş, ancak çözüm getirilememiştir. Bu durumda olan cinslerin problemleri saptanarak üzerlerinde daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiği flora editörünün bazı yayınlarında da kaydedilmiştir [2]. Bu durum göz önüne alınarak cinsin *Ritrodes* seksiyonuna ait taksonların filogenetik ilişkileri belirlenirken; cinsin diğer seksiyonlarına ait taksonlar ilişkisini tekrar gözden geçirilmesine yönlendirmiştir.

Bitkilerin evrimi ve sınıflandırılması çalışmalarında moleküler yöntemler, son yıllarda önemli bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır [26]. Kloroplast DNA (cpDNA), populasyonlar ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerin anlaşılmasında etkili bir metod olarak kullanılmaya başlanmıştır [15].

Wallender ve Albert [27], Oleaceae familyasına ait 76 türün filogenisini ve sınıflandırılması cpDNA'nın *rps16* ve *trnL-F* bölgelerinin dizi analizi verileri kullanılarak açıklamaya çalışmışlar. Çalışma da filogenetik ağacı Maksimum Parsimoni kullanılarak elde etmişler ve genel olarak mevcut sınıflandırmaya benzer sonuçlar elde etmişlerdir. *TrnL-F* ve *rps16* bölgelerin Oleaceae familyasının türleri arasında ilişkiyi belirleme de etkili olduğunu bulmuşlardır.

Oxelman ve ark. [21], Caryophyllaceae familyasına ait 46 türün filogenetik ilişkilerini yeniden oluşturmak amacıyla kloroplast DNA' nın *rps16* bölgesinin dizi analizi verilerini kullanmışlar. Çalışma da filogenetik ağaçlar Maksimum Parsimoni ve Maksimum Likelihood analizleri kullanılarak elde etmişler. ITS bölgesi analizine göre oluşturulan filogenetik ağaçla karşılaştırmışlardır. Genel olarak her iki bölgenin analiz verilerine göre benzer sonuçlar elde etmişler.

Echinops cinsinin evrimsel ilişkisi sınırlı ölçüde çalışılmış ve filogenetik çalışmalar değişik tipteki verilere, örnek tiplerine ve metotlara dayanmaktadır.

Garnetje ve ark. [28], *Echinops* ve *Acantholepis* cinsinin filogenetiğinin belirlenmesinde 30 *Echinops* ve bir *Acantholepis orientalis* türünü ITS bölgesini sekans analizi ile incelemişlerdir. Bu analiz sonucunu morfolojik ve sitogenetik karakterler ışığında tartışmışlardır. *Acantholepis* türünü *Echinops nanus* ve diğer *Echinops* örnekleri ile aynı kladda yer aldığını ve iyi bir bootstrap değeri ile desteklendiğini belirtmişlerdir. Çalışmada *E.emiliae* 96 % bootstrap değeri diğer örneklerden farklılık göstermiştir. *Echinops emiliae* yüksek dağlarda yetişen bir bitki olması, bu çalışma sonucunda 96%, bootstrap değeri diğer örneklerden farklı çıkmasını açıklamaktadır. *E. bithynicus*, *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus* and *E. viscosus* 90%, bootstrap değeri ile *Ritropsis* seksiyonu altında toplanmışlardır. Bu türler arasında *E. bithynicus* and *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus* hiçbir farklılığın olmadığı vermişlerdir. Yapılan analiz sonucunda hem ITS bölgesinin sekans analizine dayalı moleküler filogenisini hemde kromozom sayısı ve nükleer DNA miktarını şu anki seksiyonel sınıflandırmayı desteklemediğini bulmuşlardır. Bu cinsin evriminin daha iyi anlaşılmasında daha fazla tür, moleküler, sitogenetik ve morfolojik çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Sanchez ve ark. [29], *Echinops* cinsinin moleküler sistematigi seksiyonel sınırlandırma üzerine olan çalışmalarını cpDNA'nın ITS ve trnL-trnF bölgelerini dizi analizi ile incelemişlerdir. Bu dizi analizini *Cenchrolepis* ve *Pterolepis* seksiyonları hariç bütün *Echinops* seksiyonlarından temsili türler alınarak toplamda 89 örneğe uygulamışlardır. Elde edilen dizi verilerini Maximum parsimony ve Bayesian analizi ile değerlendirmişlerdir. Oluşan filogenetik ağacı incelediklerinde *Echinops* cinsinin 8 gruptan oluştuğunu, % 100 bootstrap değeri ile 2 ana soy hattı şeklinde gruplandığını görmüşlerdir. Birinci soy hattını % 85 bootstrap değeri ile *Chamaechinops*,

Nanechinops seksiyonundan temsili türler ve *E. acantholepis* (= *Acantholepis orientalis*) türünün oluşturduğunu, ikinci soy hattını ise % 72 bootstrap değeri ile diğer *Echinops* türlerinin oluşturduğunu belirtmişlerdir. Önceki çalışmalarda tanımlanmış *Echinops* cinsi seksiyonlarının (*Acantholepis*, *Chamaechinops*, *Echinops*, *Hamolepis*, *Hololeuce*, *Oligolepis*, *Phaeochaete*, *Psectra* and *Ritropsis*) sınıflandırılmasını, kendi çalışma sonuçları ile desteklediklerini belirtmişlerdir.

Türkiye *Echinops* cinsi ile ilgili daha önceki zamanlarda yapılmış moleküler temelli çalışmaların tespit edilememiş olması ve var olan çalışmaların da sayısının çok az olması ve sadece morfolojiye dayalı olması bu çalışmanın önemini arttırmaktadır.

Çalışmamızda Tablo 3.1’de verilen 11 örneğin cpDNA’ sının *rps16* genin 800 dizi analizi yapıldı. Örneklerin bir araya getirilmesiyle elde edilen DNA veri setinde *rps16* geninin Kimura 2-Parametre baz değişim modeline göre değerlendirilmesiyle elde edilen örnekler arası genetik uzaklık değerleri 0,0131-0,0013 arasında tespit edildi (Tablo 4.3). Bu sonuca göre örneklerin arasında önemli derecede farklılık olmadığını göstermektedir.

Neighbor Joining ağacı (Şekil 4.2) incelendiğinde oluşan soy hatları nispeten örnekler seksiyonlarına göre ayrılmaktadır. Farklı cinse ait *Senecio vulgaris* değerlendirme dışı bırakılırsa 4 ana soy hattı görülmektedir. *E. emilia*’nın diğer örnekler ayrı gruplandığı görülmektedir. *E. emilia*’nın yaşam süresinin 2 yıl olması, diğer taksonların çok yıllık olması ile, başların 12-15 cm çapta ve korollanın yeşil olmasıyla da farklılık göstermektedir. Vural ve Dadandı [1], yaptıkları morfolojik bulgulara göre de bu türün ayrı bir seksiyonda değerlendirilmesi gerektiğini belirtilmektedir ve elde ettiğimiz moleküler bulgular bu iddaları desteklemektedir.

Birinci soy hattı *Ritrodes* seksiyonuna ait türleri içermektedir. Diğer 3 soy hattından son ikisi ise *Oligolepis*, *Echinops* seksiyonuna ait türlerden oluşmaktadır. Morfolojik olarakta involukrum braktelerinin sayısına göre de seksiyon ayrımı bu şekilde görülmektedir.

Birinci soy hattı incelendiğinde evrimsel olarak önce farklılaşmış taksonun *E. viscosus* subps. *viscosus* olduğu, *E. orientalis* ve *E. viscosus* subps. *bithnicus*’un daha yakın akraba oldukları bulunmuştur. Bu durumda *E. viscosus* alt türlerinden *E. viscosus* subps.

bithynicus'un *E. orientalis*'e *E. viscosus* subps. *viscosus* dan daha yakın olması bu taksonların aslında birer alttür değilde ayrı birer tür olarak değerlendirmeyi akla getirmektedir. Ayrıca *E. viscosus*'un alttürleri morfolojik olarak ta içteki fillarilerin gevşek bağlanması ile *E. orientalis* ile yakınlık göstermektedir. *E. viscosus*'un iki alttürü gövdenin lanat olup olmaması ve glandular tüyün seyrek ya da yoğun olması ile de birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu konuda benzer bulguları Vural ve Dadandı [1] tarafından yapılan çalışmada da ve bu iki alttür *E. viscosus* ve *E. bithynicus* olarak iki ayrı tür şeklinde değerlendirilmiştir.

İkinci soy hattında *E. melitenensis* ve *E. phaeocephalus*'un beraber gruplandığı gözlenmiştir. *E. ritro*'nun bu türlerle yakın akraba oldukları bulunmuştur Bu türler tüysü fillarilerin boyunun kapitulum boyu kadar uzun ya da yarısı kadar olup olamaması ile morfolojik olarak ta farklılık göstermektedirler. *E. ritro* korollanın koyu mavi olması ile *E. phaeocephalus*'e, papusun tabanda uzunluklarının 1/2'si kadarı birleşik olmasıyla da *E. melitenensis*'e morfolojik olarak benzerlik göstermektedir.

Üçüncü soy hattı incelendiğinde *E. pungens* var. *pungens*'in evrimsel olarak farklılaşmış olduğu, *E. pungens* var. *polyacanthus* ve *E. pungens* var. *transcaucasicus* daha yakın akraba oldukları bulunmuştur. Bu taksonların aslında birer alttür değilde ayrı birer tür olarak değerlendirmeyi akla getirmektedir. *E. pungens* var. *polyacanthus*' un gövde altının tamamen tüysüz olması ile diğer iki varyetenden morfolojik olarak farklılık göstermektedir. *E. pungens* var. *pungens* ve *E. pungens* var. *transcaucasicus*' un gövde yapraklarının pinnatifid, pinnatisek ya da pinnat olması ile morfolojik olarak farklılık göstermektedir. Ayrıca Vural ve Dadandı [1] tarafından yapılan çalışmada da bu üç alttür' ün *E. polyacanthus*, *E. pungens* ve *E. transcaucasicus* olarak üç ayrı tür şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen filogenetik ağaçta oluşan ana kollar daha önce cinsin morfolojisine göre yapılmış olan seksiyon ayrımlarını nerdeyse tamamen desteklemektedir. Yalnızca; morfolojik çalışmalara göre *Echinops* seksiyonunda değerlendirilen *E. ritro* bizim çalışmamızda *Oligolepis* seksiyonuna ait türlerle daha yakın akraba olduğu görülmektedir.

Ama yine de örneklerin genetik yapısı ve evrimsel durumu hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edebilmek için örnek sayısı artırılmalı ve cpDNA'nın diğer gen bölgelerinin analizleri elde edilerek verilerin birlikte değerlendirilmesi örnekler arasında genetik çeşitliliğin ortaya konmasında çok daha fazla katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Vural, C., Dadandı, M.Y., Türkiye *Echinops* L. (Asteraceae) Türlerinin Taksonomik Revizyonu, Tübitak 1001 Araştırma Projesi Final Raporu, Proje No:106T526, Kayseri, 2010.
2. Hedge, I.C.. *Echinops* L. – In: Davis P.H. (ed.). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 5: 609-622. Edinburgh University Press, Edinburgh. 1975.
3. Mozaffarian, V., A taxonomic survey of *Echinops* L. tribe Echinopeae (Asteraceae) in Iran: 14 new species and diagnostic keys. *Iran J. Bot.* 11: 197-239, 2006.
4. Davis, P.H., Hedge I.C., The Flora of Turkey; Past, Present and Future, *Candollea*, 30:331- 351, 1975.
5. Yıldırım, A. ve Kandemir, N., Genetik Markerler ve Analiz Metodları, Bölüm 23, In: Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, s. 112-159, Konya, 2001.
6. Seçmen, Ö. ve ark., Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 2004.
7. Karcıcio, M., Analysis of Genetic Diversity in Landraces of Macoroni Wheat (*Triticum durum* Desf.) by RAPD Tecnique, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2006.
8. Moritz, C., Hillis, D.M., Molecular Systematics: Context and Controversies, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, 1990.
9. Gülsen, O., Mutlu, N. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. *Alatarım* 2005, 4 (2): 27-37, 2005.
10. Kephart, S.R., Starch Electrophoresis of Plant Isozymes, a Comparative Analysis of Thecniques, *American Journal of Botany*, 77, 693-712, 1990.
11. Sataub, J.E., Serquen, F.C., ve ark., Genetic Markers Map Construction and Their Application in Plant Breeding, *Hortscience*, 31(5), 729-741, 1996.
12. Wolf, A.N.D., Liston, A., Contributions of PCR Based Metods to Plant Systematics And Evolutionary Biology, *Molecular Systematics of Plants II*, Chopman and Hall, New York, 33-86, 1998.

13. Williams, J.G.K., ve ark., DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, *Nucleic Acids Res.*, 18:6531-6535, 1990.
14. Palmer, J.D., ve ark., Chloroplast DNA variation and plant phylogeny, *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 75:1180-1206, 1988.
15. Learn, G.H., ve ark., Constraints on the evolution of chloroplast introns: the intron in the gene encoding *trnA*-Val(UAC), *Molecular Biology and Evolution*, 9:856-871,1992.
16. Curtis, S.E., Clegg, M.T., Molecular Evolution of Chloroplast DNA Sequences, *Mol. Biol. Evol.*, 1:291-301, 1984.
17. Zurawski, G., ve Clegg, M. T., Evolution of higher plant chloroplast DNA encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 38:391-418, 1987.
18. Taberlet, P. ve ark., Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Mol. Biol.*, ENG., 17,1105-1109, 1991.
19. Neuhaus, H., Scholz, A., Link, G., Structure and expression of a split chloroplast gene from mustard (*Sinapis alba*): ribosomal protein *rps16* reveals unusual transcriptional features and complex RNA maturation, *Curr. Genet*, 15: 63-70, 1989.
20. Demesure, B., Sodji, N., Petit, R.J., A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants, *Mol. Ecol.*, 4, p. 129–131, 1995.
21. Oxelman, B., Liden, M., Berglund, D., Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae), *Plant Syst. Evol.*, 206: 393–410, 1997.
22. Hall, T., BioEdit v.7.0.9, Biological Sequence Alignment Editor for Win95 / 98 /NT / 2K / XP., Ibis Biosciences, 2007.
23. Rozas, J., Librado, P., DnaSP v5, A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data, *Bioinformatics*, 25, 1451-1452, 2009.
24. Tamura, K. ve ark., MEGA4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)software version 4.0., *Mol. Biol. Evol.*, 24, 1596-1599, 2007.
25. Kumar, S. ve ark., MEGA, A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences, *Briefings in Bioinformatics*, 9, 299-306, 2008.

26. Soltis, D.E., P.S. Soltis, ve B.G. Milligan. Intraspecific chloroplast DNA variation: Systematic and phylogenetic implications, p. 117–150, *In* P. S. Soltis et al. (ed.) Molecular systematic of plants, Chapman Hall, New York, 1992.
27. Wallender, E., Albert, A.A., Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL- F* sequence data, American Journal of Botany, 87(12): 1827-1841, 2000.
28. Garnatje, T., Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R. & Valles, J., A first approach to the molecular phylogeny of the genus *Echinops* (Asteraceae): sectional delimitation and relationships with the genus *Acantholepis*, Folia Geobotanica, 40: 407-419, 2005.
29. Sanchez-Jimenez, I., Lazkov, G.A., Hidalgo, O., Garnatje, T., Molecular systematics of *Echinops* L.(Asteraceae, Cynareae). A phylogeny based on ITS and *trnL-trnF* sequences with emphasis on sectional delimitation, International Association for Plant Taxonomy, 59(3), 698-708 (11), 2010.

ÖZGEÇMİŞ

Leyla Kırım 1984 tarihinde Kayseri’de doğdu. İlköğrenimini Kıranardı İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini Kayseri Aydınlıkevler (Y.D.A) Lisesi’nde tamamladı. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi Yozgat Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü lisans öğrenimine başladı ve 2008 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğretime başladı ve halen bu anabilim dalında öğretime devam etmektedir.

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres: :Gültepe mahallesi Mustafa Şimşek
Bulvarı Söğüt Sitesi B blok
Kat:5 no:16
Melikgazi/KAYSERİ

E- posta :leylakirim@gmail.com