

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

**TÜRKİYE *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE) TÜRLERİNİN
CPDNA RFLP İLE MOLEKÜLER ANALİZİ**

Proje No: FBA-08-581

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Cem VURAL

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Osman GÜLŞEN

Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN

KASIM 2010

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı FBA-08-581 nolu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine

Projenin labaratuvar aşamalarında yardımlarından dolayı Şeyda ERDOĞAN ve Leyla KIRIM'a teşekkür borçluyuz.

TÜRKİYE *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE) TÜRLERİNİN CPDNA RFLP İLE MOLEKÜLER ANALİZİ

Özet

Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Echinops* L. cinsinin, üç seksiyonuna (*Echinops*, *Ritrodes* ve *Oligolepis*) ait taksonlar arasındaki filogenetik ilişki, cpDNA dizi analizi ile araştırılmıştır. *Echinops* cinsine ait taksonların filogenetik ilişkileri belirlenirken; her bir taksonun kloroplast DNA’sı *rps16* geninin (800bç) bir bölümünün dizi analizi yapılmıştır. Taksonlar arasındaki genetik uzaklık değerleri 0,0358-0,0013 arasında bulunmuştur. Filogenetik ağaçlar Parsimoni ve Neighbor Joining (NJ) analizi ile üretilmiş ve NJ ağacında taksonlar beş farklı grup oluşturmuşlardır. Analizi yapılan gen bölgesine göre ortaya çıkan filogenetik sınıflandırma daha önce cinsin morfolojisine göre yapılmış olan seksiyon ayrımlarını tamamen desteklemese de özellikle *Oligolepis* ve *Ritrodes* seksiyonlarına ait taksonların beraberce gruplandıkları görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda kullanılan gen bölgesinin *Echinops* taksonları arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için kullanışlı bir moleküler karakter olduğu görülmüştür.

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

MOLECULAR ANALYSIS OF TURKISH *ECHINOPS* L. (ASTERACEAE) SPECIES USING cpDNA RFLP, RFLP

Abstract

In this study, the phylogentic relationships among taxa belonging to three sections (*Echinops*, *Ritrodes*, *Oligolepis*) of the genus *Echinops*, distributed in Turkey, were investigated by using cpDNA sequence analysis. While phylogenetic relationships of the taxa of *Echinops* were being determined, a partial sequence of cpDNA's *rps16* gene (800 bp) was analyzed for each taxa. Genetic distance value among the taxa ranged from 0.0358 to 0.0013. Parsimoni and Neighbor Joining (NJ) methods were used to constructed the phylogenetic trees. Taxa generated five different groups at NJ tree. Although, there was no exact match between the phylogenetic classification and genus morphology, taxa of *Oligolepis* and *Ritrodes* sections were grouped together. Regarding to our results, the studied gene region was found to be an applicable tool to determine phylogenetic relationships among *Echinops* taxa.

Key Words: Kloroplast DNA (cpDNA); *rps16*; *Ritrodes*.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
KISALTMA VE SİMGELER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Echinops</i> Cinsinin Taksonomisi.....	3
2.2. Takım: Asterales	3
2.3. Asteraceae Familyasının Özellikleri	3
2.4. <i>Echinops</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	4
2.5. <i>Echinops</i> Cinsinin Seksiyon Teşhis Anahtarı	5
2.5.1. Seksiyon 1; <i>Echinops</i> L.....	5
2.5.2. Seksiyon 2; <i>Oligolepis</i> Bunge.	8
2.5.3. Seksiyon 3; <i>Ritrodes</i> Bunge.	9
2.6. Sistematikte Kullanılan Markırlar.....	10
2.6.1 Moleküler Markırların Kullanım Alanları	11
2.6.2. Moleküler Markırlarda Bulunması İstenen Özellikler	11
2.7. Markır Tipleri.....	12
2.7.1. Morfolojik Markırlar	12

2.7.2.	Biyokimyasal Markırlar	12
2.7.3.	DNA Markırları.....	13
2.7.3.1.	RFLP	14
2.7.3.2.	RAPD	14
2.7.3.3.	AFLP	15
2.7.3.4.	ISSR	15
2.7.3.5.	SSR.....	15
2.7.3.6.	SCAR	16
2.8.	CPDNA VE PCR-RFLP	16

3. BÖLÜM

MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. Bitkilerin Temin Edilmesi.....	17
3.2. Moleküler Çalışmalar.....	22
3.2.1. Bitkilerden Total DNA İzolasyonu.....	22
3.2.2. Sekans Analizi	23
3.2.3. PCR- RFLP Analizi	24
3.2.4. Restriksiyon Enzimleriyle DNA’ ların Kesimi	26
3.2.5. Agaroz jel Elektroforezi.....	26
3.3. İstatistiksel Analiz.....	26

4. BÖLÜM

SONUÇLAR	27
4.1. Araştırma Bulguları.....	27
4.2. cpDNA 30S Ribosomal Protein S16- <i>rps16</i> Genin Dizi Analiz Sonuçları	27
4.2.1. cpDNA 30S ribosomal protein S16- <i>rps16</i> genin	

PCR ile Amplifikasyonu	27
4.2.2. cpDNA 30S Ribosomal Protein S16- <i>rps16</i> Geninden Elde Edilen Dizinin Yapısı ve Varyasyonu	28
4.2.3. Uzaklık (Distance) Analizi.....	30
4.3. PCR- RFLP Sonuçları	31
4.3.1. Cp 3F-Cp 3R RFLP Sonuçları	32
4.3.2. Cp 4F-Cp 4R RFLP Sonuçları	42
5. BÖLÜM	
TARTIŞMA- SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)
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
ISSR	: Internal Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları Arası)
M	: Molar
mM	: Milimolar
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
nDNA	: Nükleer DNA
NJ	: Neighbor Joining
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Pmol	: pikomol
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfizm DNA)

RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilen Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Region (Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölge)
SSR	: Simple Sequences Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
T	: Timin
TAE	: Tris, Glisial Asetik Asit, EDTA
V	: Volt
U	: Urasil
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
UPGMA	: Unweighted pair group method using arithmetic averages (=aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu)
µl	: Mikrolitre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Sekans çalışması kapsamında kullanılan bitkiler.....	17
Tablo 3.2.	PCR-RFLP çalışması kapsamında kullanılan bitkiler	19
Tablo 3.3.	Sekans analizi için kullanılan primerler.....	23
Tablo 3.4.	PCR-RFLP analizi için kullanılan primerler	24
Tablo 3.5.	PCR-RFLP çalışmasında kullanılan enzimler	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	<i>Echinops</i> L. Seksiyonuna ait kullanılan örneklerin Türkiye’deki lokaliteleri	6
Şekil 2.2.	<i>Echinops</i> L. Seksiyonunun tipi olan <i>E.ritro</i> ait fotoğraf	7
Şekil 2.3.	<i>Oligolepis</i> Seksiyonuna ait kullanılan örneklerin Türkiye’deki lokaliteleri	8
Şekil 2.4.	<i>Oligolepis</i> Seksiyonunun tipi olan <i>E. melitenensis</i> ait fotoğraf	8
Şekil 2.5.	<i>Ritropsis</i> Seksiyonuna ait kullanılan örneklerin Türkiye’deki lokaliteleri	9
Şekil 2.6.	<i>Ritropsis</i> Seksiyonunun tipi olan <i>E.orientalis</i> ait fotoğraf	10
Şekil 4.1.	Bitkilerden elde edilen total DNA’nın Agaroz Jel’de Görünümü	27
Şekil 4.2.	30S ribosomal protein <i>S16-rps16</i> gen bölgesinin PCR sonuçları M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	28
Şekil 4.3.	<i>Echinops</i> seksiyonları arasındaki evrimsel ilişikiyi gösteren NJ	31
Şekil 4.4.	Cp 3F-Cp 3R ve Mbo I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	32
Şekil 4.5.	Cp 3F-Cp 3R ve Alu I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	33
Şekil 4.6.	Cp 3F-Cp 3R ve Mn II enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	34
Şekil 4.7.	Cp 3F-Cp 3R ve Rsa I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	35

Şekil 4.8.	Cp 3F-Cp 3R ve BsuRI enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci.....	36
Şekil 4.9.	Cp 3F-Cp 3R ve Hin 1II (Nla1 II) enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	37
Şekil 4.10.	cp3 UPGMA ağacı.....	38
Şekil 4.17.	cp3 UPGMA matriks	39
Şekil 4.12.	cp3 NJ AĞACI.....	40
Şekil 4.13.	cp3 NJ MATRİKS	41
Şekil 4.14.	Cp 4F-Cp 4R ve Mbo 1 enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci.....	42
Şekil 4.15.	Cp 4F-Cp 4R ve Alu I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci.....	43
Şekil 4.16.	Cp 4F-Cp 4R ve Hin 1II (Nla1 II) enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci.....	45
Şekil 4.17.	Cp 4F-Cp 4R ve BsuR I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	46
Şekil 4.18.	Cp 4F-Cp 4R ve Rsa I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci	47
Şekil 4.19.	CP 4 UPGMA AĞACI	48
Şekil 4.20.	CP 4 UPGMA MATRİKSİ.....	49
Şekil 4.21.	CP 4 NJ AĞACI	50
Şekil 4.22.	CP 4 NJ MATRİKS	51

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Echinops L. cinsi Asterales takımı içerisinde yer alan Asteraceae familyasının bir cinsidir. Asterales takımının tek familyası bulunmaktadır. Asteraceae familyası yaklaşık 1100 cins ve 2500 kadar tür içerir. Ülkemizde 133 cins ve 1156 kadar türü bulunur. Bazıları süt içeren otsular, çalılar veya nadiren ağaç veya tırmanıcılarıdır.

Echinops cinsi dünyada yaklaşık 130 türle temsil edilmektedir. Birincil gen kaynağı kuzey yarıküredir. Yoğun olarak da, tropik Afrikanın yarı nemli alanları, Kuzey Afrika'nın yarı kurak alanları, Akdeniz havzası ve Orta Asya'ya kadar Avrasyanın ılıman kuşağında yayılış göstermektedir. Genel olarak, birkaç tek yıllık ve iki yıllık tür içeren çok yıllık bir cinstir [1, 2]. *Echinops* cinsi *Echinops*, *Ritropsis* Greuter & Rechf. ve *Oligolepis* Bunge olmak üzere üç seksiyona ayrılmıştır. Ülkemizde *Echinops* cinsinin üç seksiyonuna ait taksonlar bulunmaktadır. Bu seksiyonlardan *Echinops* ve *Ritropsis* Greuter & Rechf. seksiyonlarına ait taksonlar ülkemizin hemen hemen her tarafında yayılış göstermektedir, ancak *Oligolepis* Bunge seksiyonuna ait taksonlar Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde bulunmaktadır [3].

Echinops cinsi tek yada çok yıllık, dikenli yapraklara sahip olan bir bitkidir. *Echinops* cinsinin Türkiye de 22 taksonu bulunmaktadır. Bunlardan 9'u endemiktir ve cinsin endemizm oranı %40.9'dur [1, 4]. *Echinops* cinsi üyeleri 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 *Echinops* 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 [3, 5]. 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. 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. Bu problemlili cinslerin arasında *Asteraceae* familyasından *Echinops* L. cinsi de bulunmaktadır.

Echinops cinsinin taksonları arasında yaprak morfolojisi, tüy örtüsü ve tüy örtüsünün gövde üzerinde dağılımına göre morfolojik olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Fakat moleküler yöntemlere dayalı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden, *Echinops* cinsinin içerisinde genetik  esitliliėin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Genetik varyasyonu moleküler düzeyde belirlemede ise farklı moleküler DNA işaret teknikleri kullanılmaktadır. Birçok bitki türü arasındaki ve içindeki genetik varyasyonun ortaya çıkartılmasında en uygun moleküler DNA tekniğini belirlemek amacıyla Kesim Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP), DNA hibridizasyonu, PCR-RFLP (Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length polymorphism)  oğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP), Rastgele  oğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polimorphic DNAs; RAPD), Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats; SSR) Metodu ve Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgenin Amplifikasyonu Basit Dizi Tekrarları Arası (Inter Simple Sequence Repeats; ISSR) gibi DNA isaret teknikleri karşılaştırılmıştır. Polimorfizm bakımından SSR ve AFLP teknikleri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP gibi moleküler tekniklerinin avantajlı oldukları belirtilmiştir [6].

Filogenetik problemleri çözmede baz dizilim temelli moleküler markırlardan ziyade, ekonomik ve hızlı yöntemler oldukları için allozim bilgilerini veya RFLP ve RAPD'i kullanmayı tercih etmektedirler. Buna karşılık DNA baz dizi bilgilerinin elde edilmesi daha zor olup, zaman ve yüksek maliyet gerektirmektedir. Bununla birlikte taksonomistler için genlerin genetik varyasyonunu doğru tahmin etmenin en iyi yolu DNA baz dizi analizi olarak görülmektedir.

Echinops cinsinin genetik varyasyon düzeyinin belirlenmesi; cins içerisindeki bitkilerin genetik yapısını anlamada, tüm evrimsel tarihinin tespitinde önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın amacı; türler arasındaki akrabalık ilişkileri kloroplast DNA restriksiyon fragment length polymorphism (cpDNA PCR- RFLP) ve dizi analiz yöntemi ile açıklamaktır.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

2.1. *Echinops* cinsinin Taksonomisi

Alem	: Plantae
Şube	: Magnoliophyta (çiçekli bitkiler)
Sınıf	: Magnoliopsida (iki çenekliler)
Takım	: Asterales (papatyagiller)
Familya	: Asteraceae
Tribus	: Cardueae
Subtribus	: Echinopinae
Cins	: <i>Echinops</i> L. [3].

2.2. Takım: Asterales

Asterales takımının tek familyası bulunmaktadır. Otsular nadiren de ağaçlardır. Yapraklar alternat, karşılıklı veya hepsi kaidede, stipülsüzdür. Çiçekler erdişi veya tek eşeylidir. Kaliks değişik yapılarda ve tüy şeklinde, petaller 3-5, birleşik bazen yok. Stamenler 4-5, petallere bağlı, ovaryum 1 lokusludur [7].

2.3. Familya: Asteraceae (Compositae) (Papatyagiller) Özellikleri

Asteraceae familyası yaklaşık 1100 cins ve 2500 kadar tür içerir. Ülkemizde 133 cins ve 1156 kadar türü bulunur. Bazıları süt içeren otsular, çalılar veya nadiren ağaç veya tırmanıcılarıdır. 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 simetridir. 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, anatrop, plasentasyon bazaldır. Meyve aken ve ucunda genellikle bir papus veya kaliks kalıntısı taşır [7].

2.4. Cins: *Echinops* Genel Özellikleri

Gövde dik, çoğunlukla sadece en uç kısımlarda seyrek dallı, keçemsi tüylü, tomentoz, bazen salgı tüylü, çok nadiren tüysüz, yapraklar alternat, pinnat parçalı şekilde bölünmüş (1-2-pinnat), çoğunlukla dikenli dişli loblar, gövdenin tabanından yukarı doğru boyutları küçülür, alt yapraklar petiollu, üsttekiler sesil. Yapraklar çoğunlukla üzeri yumuşak tüylü, hatta bazen salgı tüylü, nadiren neredeyse tüysüz, her zaman çok yoğunlukta, altta çoğunlukla tomentoz-yumuşak tüylü [3].

Kapitulumlar tek çiçekli. Dal uçlarında yalancı başçıklarda (pseudocephala) toplanmış. Kapitulumların bağlandığı merkez küre veya ters-ovat şekilde, tüysüz. Yalancı başçıklar involukrum ile çevrilmiş [3].

Kapitulumun etrafını çok sayıda fırça şeklinde beyaz sert tüyler kaplar. Involukral brakteler 3-5 sırada dizili, pul ya da yaprak benzeri, dıştakiler kısa, linear, üst taraf genişlemiş, orta sıradaki brakteler lanseolat, karinat, kılçık şeklinde daralan şekilde. İçtekiler bazen ortadakilerden daha uzun, serbest, alt kısımlar kısmen birleşik ya da birleşerek tüp oluşturmuş üst taraf serbest, keskin sivri uçlu ya da siliat [3].

Korolla, beyaz ya da açık maviden maviye kadar renklerde. Derince bölünmüş beş loplu. Stamen 5, singenesis durumunda. anterler tabanda tüy demetleri görünümünde ek yapılar taşır. Stigma 2 parçalı, stillusun üst kısımlarında tüysü yapılar taşıyan bir şişkinlik bulunur [3].

Akenler iğ şekilli, zayıf boyuna, yüzey üzerine paralel olarak yatık yoğun uzun tüylerle çevrili, papus kısa fırça şeklinde serrat tüylerden oluşmuş bir halkasal yapıda. Papusdaki dişli sert tüyler alt kısımda az ya da çok birleşmiş; gövdenin uçlarında çok sayıda.

Çok yıllık, çok nadiren iki yıllık ve çok ender olarak da tek yıllık otsular, step ve yarı-çöl bölgelerde dağılmış ve özellikle de dağların yarı-çöl ve step bölgelerinde 125-130 civarında türe sahip [3].

2.5 *Echinops* Cinsinin Seksiyon Teşhis Anahtarı [3]

1a. En içteki involukrum brakteleri uzunluklarının yarısı kadar yada daha fazla birleşmişler

..... **Sect. *Echinops***

b. En içteki involukrum brakteleri serbest yada en fazla 1\5 kadarlık kısmı birleşmiş

..... **2**

2a. Involukrum brakteleri 16-25 adet, en içtekiler birleşerek zarsı silindirik tüp oluşturmuş

..... **Sect. *Ritropsis* Grauter&Rech. f.**

b. Involukrum brakteleri 12-15 adet, En içtekiler birleşerek sağlam derimsi yapıda (genellikle pentagonal) tüp oluşturmuş **Sect. *Oligolepis* Bunge**

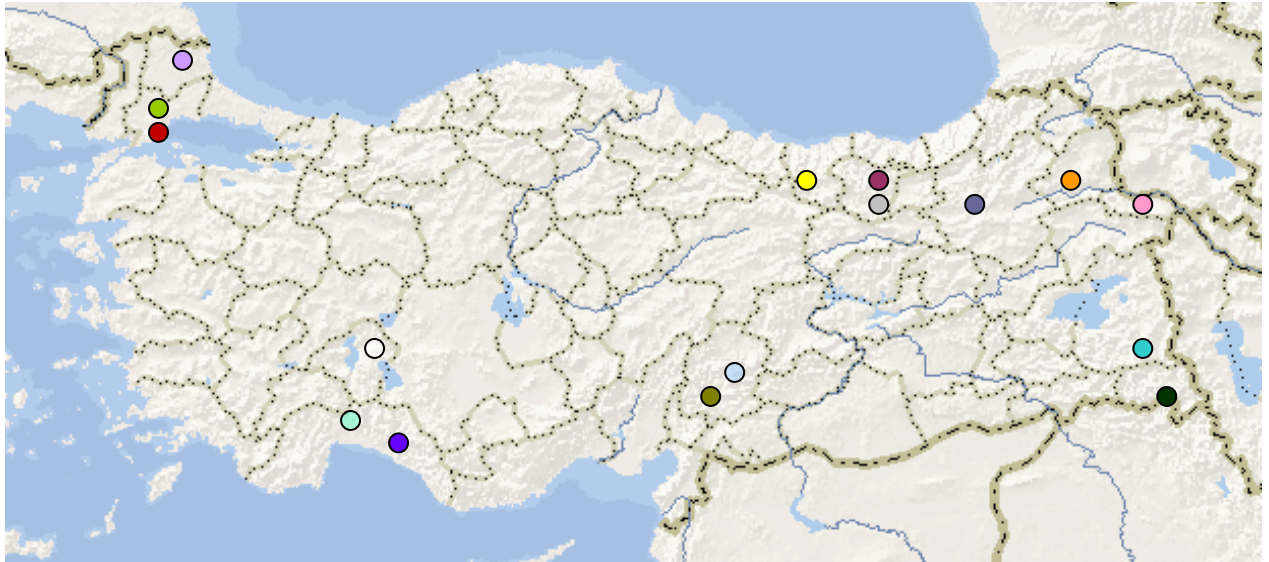
2.5.1. Seksiyon 1; *Echinops* L.

Fillariler (12-) 16-30 adet. En içtekiler birleşik değil yada dipte hafifçe birleşik, birleşiktir [3].

Bu seksiyondaki türler;

- 1) *Echinops ritro* L.
- 2) *Echinops ritrodes* Bunge Bull.
- 3) *Echinops microcephalus* Sibth. & Sm.
- 4) *Echinops sphaerocephalus* L.
- 5) *Echinops albidus* Boiss. & Spruner.
- 6) *Echinops ossicus* K. Koch.
- 7) *Echinops pungens* Trautv.
- 8) *Echinops polyacanthus* Iljin.

- 9) *E. adenocladus* (Hedge)
- 10) *Echinops transcaucasicus* Iljin.
- 11) *Echinops tournefortii* Ledeb. ex Trautv.
- 12) *Echinops heterophyllus* P. H. Davis
- 13) *Echinops vaginatus* Boiss. & Hausskn.
- 14) *Echinops onopordum* P. H. Davis
- 15) *Echinops mersinensis* Gemici & Leblebici
- 16) *Echinops emiliae* Schwarz ex P. H. Davis



- | | | |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| ● <i>E.ritro</i> | ● <i>E.emiliae</i> | ● <i>E.tournefortii</i> |
| ● <i>E.polyacanthus</i> | ● <i>E.albidus</i> | ○ <i>E.onopordum</i> |
| ● <i>E.microcephalus</i> | ● <i>E.ossicus</i> | ● <i>E.vaginatus</i> |
| ● <i>E.adenocladus</i> | ● <i>E.heterophyllus</i> | ● <i>E.pungens</i> |
| ● <i>E.sphaerocephalus</i> | ● <i>E.transcaucasicus</i> | ● <i>E.mersinensis</i> |
| ○ <i>E.ritrodes</i> | | |

Şekil 2.1. *Echinops* L. Seksiyonuna ait kullanılan örneklerin Türkiye'deki lokaliteleri

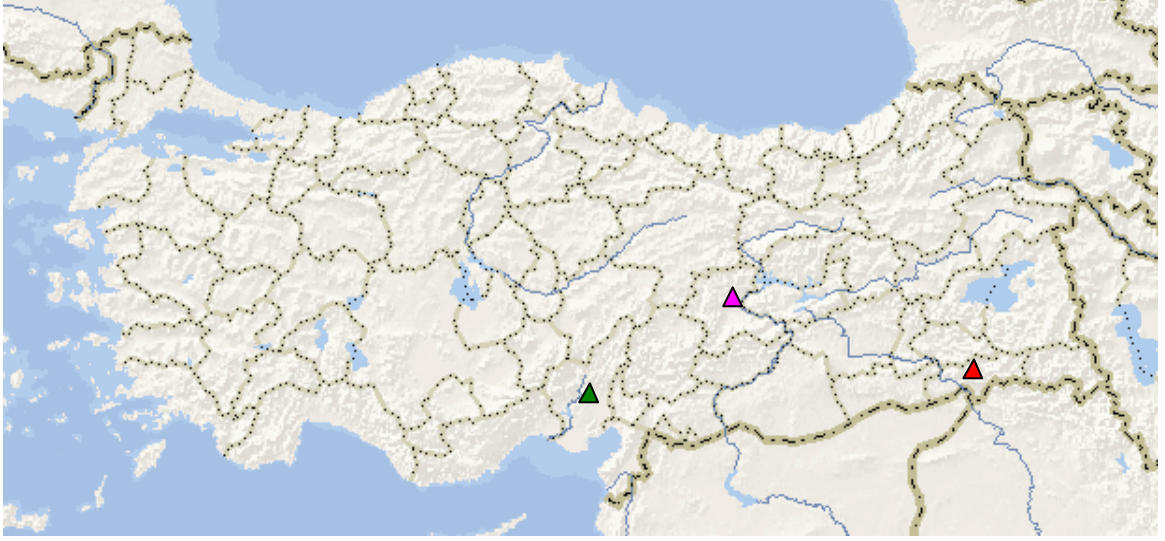


Şekil 2.2. *Echinops* L. Seksiyonunun tipi olan *E.ritro* ait fotoğraf

2.5.2. Seksiyon 2; *Oligolepis* Bunge.

Fillariler 12-20 adet, içtekiler dipte yarıya kadar birleşerek 5 köşeli derimsi bir tüp oluştururlar [3]. Bu seksiyondaki türler;

- 1) *Echinops phaeocephalus* Hand.-Mazz.
- 2) *Echinops dumanii* C. Vural
- 3) *Echinops melitenensis* Hedge & Hub.-Mor.



▲ *E. phaeocephalus*

▲ *E. dumanii*

▲ *E. melitenensis*

Şekil 2.3. *Oligolepis* Seksiyonuna ait kullanılan örneklerin Türkiye’deki lokaliteleri



Şekil 2.4. *Oligolepis* Seksiyonunun tipi olan *E. melitenensis* ait fotoğraf

2.5.3. Seksiyon 2; *Ritropsis* Greuter & Rech. f.

Fillariler 20-30 adet, içtekiler alt kısımda yarıya kadar hafifçe birleşmiş [3]. Bu seksiyondaki türler;

1) *Echinops spinosissimus* Turra

a) *Echinops spinosissimus* subsp. *viscosus* (Boiss.) Greuter

b) *Echinops spinosissimus* subsp. *bithynicus* (Boiss.) Greuter

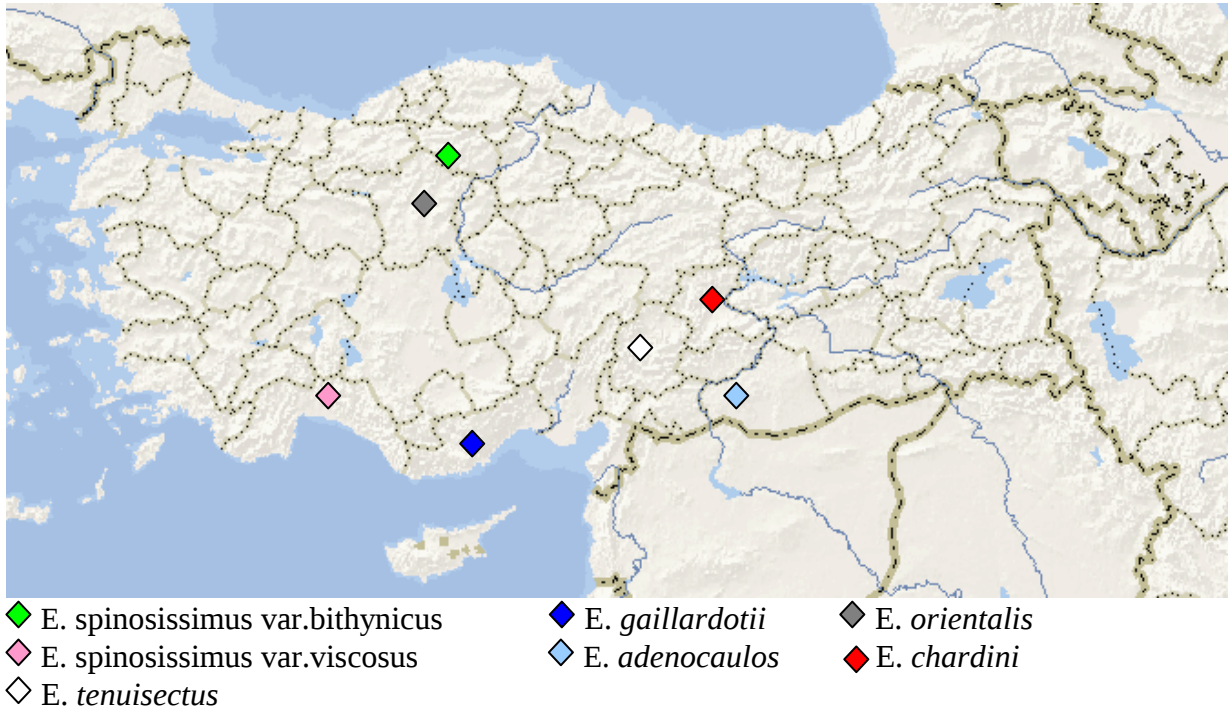
2) *Echinops gaillardotii* Boiss.

3) *Echinops adenocaulos* Boiss.

4) *Echinops orientalis* Trautv.

5) *Echinops chardinii* Boiss & Buhse

6) *Echinops tenuisectus* Rech. f.



Şekil 2.5. *Ritropsis* Seksiyonuna ait kullanılan örneklerin Türkiye'deki lokaliteleri



Şekil 2.6. *Ritropsis* Seksiyonunun tipi olan *E.orientalis* ait fotoğraf

2.6. Sistematikte Kullanılan Markırlar

Kalıtım şekilleri, morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde (moleküler markırlar) izlenebilen karakterlere genetik markırlar denir. Bu karakterlerin genetik markır olarak isimlendirilmesinin nedeni, çalışılan organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetiği hakkında, dolaylı da olsa bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markırlar DNA ‘nın aktif bölgelerinden ya da genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler [4].

Genetik markır yeni bir kavram değildir. Genetik markırlar Mendel’in 19. Yüzyılın sonlarında kalıtım biliminin temellerini ortaya koymasından sonra, bazı karakterlerin nesilden nesile aktarıldıkları ve Mendel’in rastgele dağılım ilkesine uymadığı gözlenmiştir. 20. yüzyılın başlarında sirke sineği *Drosophila* üzerinde çalışan Morgan (1910) ve öğrencileri yapay olarak ortaya çıkardıkları çok sayıda mutant karakterin birbirleriyle birlikte hareket etmelerini incelemişler ve doğrusal harita kavramını geliştirmişlerdir [10]. Kalitatif dağılım gösteren karakterlerin kantitatif dağılım gösteren karakterlerle bağlantısı, yani gerçek anlamda markır anlayışı, Sax’ın (1923) fasulye tohum pigmentasyonu ile tohum iriliği arasındaki bağlantıyı gözlemesiyle şekillenmiştir [11]. Bu çalışmada tohum pigmentasyonu fasulye tanesinin ağırlığını belirleyen bir markır olarak kullanılmıştır.

Morfolojik markırların kullanım potansiyelleri uzun zamandır bilinmesine rağmen sınırlı sayıda olmaları nedeniyle pratikte uygulanabilirlikleri kısıtlı kalmıştır [4].

Son 20 yılda biyokimya alanındaki gelişmeler markır konusunda da yeni bir çağ aşmıştır. Öncelikle izoenzimlerin veya depo proteinlerinin markır olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Daha sonra DNA'nın kendisinin doğrudan markır olarak kullanılma fikri ortaya çıkmıştır. DNA markırları genomun her noktasını temsil etme yeteneğine sahiptirler ve sonsuz sayıdadırlar [4].

2.6.1. Moleküler Markırların Kullanım Alanları;

- Genotipik tanımlama,
- Çeşit tescili,
- İslah hatlarının tanımlanması ve tohum saflık testleri,
- Hibrit çeşit saflık testleri,
- Cinsiyet belirleme, genetik çeşitliliğin belirlenmesi,
- Gen kaynaklarının genetik kökeninin belirlenmesidir.

2.6.2. Moleküler Markırlarda Bulunması İstenen Özellikler

Polimorfizm (Farklılık Gösterme): Kullanılan bir markırın farklı genotipleri ayırt edebilme yeteneğidir. Markırların farklılık gösterme oranları markır tipine ve bitki türüne göre büyük ölçüde değişmektedir. Polimorfizm, 300 ile 500 nükleotitte bir oluşan varyasyonlardır. Ekzon bölgelerinde gözlenen varyasyonlar morfolojik düzeyde gözlenebilirken (Tohum rengi, bitki boyu vb.), intron bölgelerindeki varyasyonlar morfolojik düzeyde gözlenememektedir.

Güvenilirlik: Aynı genetik materyal üzerinde yapılan bir markır analizinin her zaman ve her koşulda aynı sonuçları vermesidir. Güvenilirlik, markır tipine göre değişmektedir.

Eşbaskınlık (ko-dominantlık): Markırların eşbaskın olması, yani her iki allelinde ayırt edilebilmesidir. Bu durum bize ebeveynler hakkında sağlıklı bilgiler vermektedir.

Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmemeli: Morfolojik markırlar üzerinde çevrenin ve bazen de diğer lokusların etkili olması onların genetik analizde etkili bir şekilde kullanılabilmelerini kısıtlamaktadır.

Otomasyona uygunluk: Gelecekte genetik analizin tarlada, doğrudan bitkilerden alınan küçük bir doku parçası üzerinde otomasyona dayalı cihazlar kullanılarak çok kısa bir sürede gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Bu tip analizlerde, gerekli işlemleri çok az olan ve el değmeden gerçekleştirilebilecek markır seçilmelidir.

Genomdaki dağılım: Değişik tiplere ait markırlar genom üzerinde farklı dağılışı göstermektedir. Bu farklılığın asıl sebebi, genomlarda ve diğer kopya sayısı az olan DNA dizilerini kromozomların belli bölgelerinde yoğunlaşmaları gerçeğidir. Genom boyunca markırların yoğun oluşu polimorfizm için avantajdır [4].

2.7. Markır Tipleri

2.7.1 Morfolojik Markırlar

Morfolojik markırlar çok uzun süredir bilinip, geçmişte ve günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat sayılarının az olması, çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmeleri gibi olumsuz özellikleri vardır. Ayrıca bu markırlar genellikle dominant özelliktedir. Yani bu markırlarla sadece dominant fenotipler (AA ve Aa) ve resesif fenotipler (aa) belirlenebilir. Heterozigotlar (Aa), homozigot dominantlardan ayırt edilemezler. Morfolojik markırların avantajı analizlerinin kolay olmasıdır. Haritalama, popülasyonda yapılacak bir gözlem ile kolayca belirlenebilir. Fenotipe bakılarak en kolay tanımlanabilen markırlar genellikle olgun bitki dönemlerinde alınmalıdır [8].

Sonuç olarak morfolojik markırların sayılarının az olması, çevre faktörlerden etkilenmesi, genellikle resesif olmaları ve birçoğunun mutasyonlar sonucu oluşması gibi olumsuz özellikleri nedeniyle bu markırların kullanımı kısıtlanabilmektedir [9].

2.7.2. Biyokimyasal Markırlar

Sistemik problemlerin çözülmesinde kullanılan ilk biyokimyasal markırlar proteinlerdir. Protein markırları genetik analizler için morfolojik markırlardan sonra geliştirilen ikinci genetik markır sistemini oluşturur [8].

Biyokimyasal markırlar; depo proteinleri ve enzim proteinleri olmak üzere iki gruba ayrılır. Depo proteinleri bir jel üzerinde hareket ettirilip boyandığında farklı genotiplerde ortaya çıkan bant farklılıkları genetik markır olarak kullanılır. En önemli avantajları analizlerin çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasıdır [8].

Enzim markırları kendi arasında iki ana grupta incelenebilir. Bu gruplar izoenzimler ve alloenzimlerdir. İzoenzim farklı bir lokus tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formları olarak tanımlanabilir. Alloenzimler ise aynı lokustaki farklı alleler tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formlardır [11].

İzoenzimlerin metabolizmadaki rolünün iyi bilinmesi, kullanılan yöntemlerin hızlı ve ucuz olması, izoenzim markırlarının temel avantajlarıdır. Fakat izoenzimin lokus sayısının az olması, bazı izoenzimlerin belirli dokularda ve belirli gelişme döneminde bulunması, translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaları bu markırların kullanımını kısıtlamaktadır [11].

Alloenzimler ve izoezimlerin birbirinden ayırt edilebilmesi için elektroforez tekniği kullanılır. Bir jel içine yüklenip elektrik ortamında tutulduklarında proteinler taşıdıkları yük ve kütlelerin oranlarına göre farklı hızlarda hareket ederler. Daha sonra ilgili proteinlere ait seçici boyama tekniklerinin kullanımıyla proteinlerin jel içinde bulunduğu pozisyon belirlenir. Bu pozisyona göre farklı aleller taşınır [11].

Bazı izoenzimler nötr olmadıklarından, elektroforez sisteminde sadece aminoasit dizilerinde bulunan gerçek farklılığın bir kısmı tespit edilebilir. Genetik varyasyon çalışmalarında aynı enzimatik aktiviteye ve aynı elektroforetik yürüme oranına sahip izoenzimlerin homolog oldukları varsayılmasına rağmen aminoasit analizi yapılmadan bu varsayım geçerli sayılmayabilir [11].

Biyokimyasal markırlar da gen ürünü oldukları için DNA markırlarına göre sayıca daha azdır. Dokulara ve gelişme dönemine göre değişiklik göstermelerinden ve çevre faktörlerinden etkilenmelerinden dolayı kullanımları sınırlıdır [11].

2.7.3. DNA Markırları

DNA markırları, farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markırlardır [4].

Filogenetik bağlantıların ortaya çıkarılmasında DNA temelli markırlar son yıllarda büyük ilerleme göstermiştir. DNA temelli markır sisteminde mitokondriyal DNA (mtDNA), kloroplast DNA'sı (cpDNA) ve çekirdek DNA (nDNA) genomları kullanılabilir.

DNA markırları 4 grupta sınıflandırılmaktadır. Birinci grupta fonksiyonu bilinen genlere veya genomun herhangi bir bölgesine özgü proplarla Southern Blott hibridizasyonuna ve kesim enzimlerine dayalı olan RFLP markırı bulunur. İkinci grupta RAPD metodu gibi PCR temelli metotlar yer almaktadır. Üçüncü grupta hem kesim enzimlerine hem de PCR metoduna dayalı olan metotlar yer alır. AFLP metodu bu gruba girmektedir. Dördüncü grupta yer alan metotlar ise DNA dizi analizi gerektirmekte olup ISSR, SSR ve SCAR gibi metotlar bu grupta yer almaktadır.

Son zamanlarda özellikle RAPD, ISSR ve AFLP gibi PCR temelli dominant markırlar populasyon içi ve populasyonlar arası genetik yapının ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır [12].

2.7.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism)

RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism markırları), dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve oluşan DNA parçalarının elektroforezde ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek DNA proplarıyla etiketlenmesi esasına dayanır. RFLP markırları ile türler arasındaki ve içindeki farklılık kolayca belirlenir. Güvenilir, eşbaskın (co-dominant) özellikte olup polimorfizm oranı orta düzeydedir[8]. En önemli dezavantajı ise analizlerinin pahalı olması, fazla zaman, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyulmasıdır.

2.7.3.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır. RAPD markırları RFLP'nin tersine düşük kalitede ve miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen dominant markır olmaları nedeni ile yorumlanmasının zorluğu, güvenilirliğinin çok sınırlı olması, tekrarlanamaması olumsuz

yönleridir. Tekniğin diğer dezavantajlarının arasında dominant özellikte markır verilmesi ve bu yolla elde edilen markırların diğer haritalara transfer edilememesi gelmektedir [14].

2.7.3.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte ilk olarak genomik DNA önce birisi 6, diğeri 4 taban tanıyan 2 kesim enzimi tarafından kesildikten sonra (EcoRI/MseI), bunlara ait adaptörler eklenmekte ve bu adaptörlere uygun primerler kullanılarak seçici bir şekilde çoğaltılmaktadır. Seçici şekilde çoğaltılan parçalar arasındaki polimorfizm PAGE ile belirlenir . Polimorfizm oranı çok yüksektir. Uygulanabilirliği, RAPD tekniğine göre kolay olmasa da RFLP tekniğine göre çok kolaydır. Kuruluş aşamasında maliyet gerektirir. Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer alır. [8].

2.7.3.4. ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats)

RAPD ile maliyeti hemen aynı olan ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) tekniği RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markır bulma çalışmaları, evrim ve genom haritası oluşturma çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır . [8].

2.7.3.5. SSR (Simple Sequence Repeat)

SSR (Simple Sequence Repeat) markırları ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler nedeni ile oldukça polimorfiktir. Mikrosatellitler kodominant kalıtım özelliği göstermeleri, lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları ve PCR ile kolayca tespit edilebilmeleri gibi birçok özellikleri ile tercih edilen bir moleküler belirleyici grubudur. Mikrosatellitler ile ilgili en belirgin dezavantaj ise bir türe ait yeni mikrosatellitlerin elde edilmesidir. Bu işlem çoğunlukla zaman alıcı olup fazla miktarda emek gerektirir [8,15].

2.7.3.6. SCAR

SCAR yöntemi RAPD lokuslarına özgü primerler ile DNA amplifikasyonuna dayanan ve genetik açıdan tek bir lokus olarak tanımlanan genomik DNA fragmentlerini karakterize eder. SCAR markırları kodominant olarak kalıtılır. 1993 yılında RAPD markırı ilk olarak SCAR markırına dönüştürülmüş ve RAPD yönteminin etkinliği biraz daha artırılmıştır. SCAR işleminin yapılabilmesi için amplifikasyon ürünleri klonlanır ve DNA dizileri belirlenir. Dizi bilgisi dikkate alınarak RAPD lokuslarına özgü ve daha uzun primerler tasarlanır. SCAR primerinde bulunan 24 nükleotitin ilk on bazı orijinal RAPD primerinden, geri kalan bölgesi ise internal dizilerden oluşmuştur. Bu primerler SCAR markırlarının oluşturulmasında kullanılır. SCAR markırları kesim enzimleri ile kesilerek kodominat markırlara dönüştürülebilmektedir. SCAR markırının tekrarlanabilirliği, RAPD ve ISSR markırlarına göre çok daha yüksektir [16].

2.8. KLOROPLAST DNA PCR- RFLP

DNA temelli markır sisteminde mitokondriyal DNA (mtDNA), kloroplast DNA'sı (cpDNA) ve çekirdek DNA (nDNA) genomları kullanılabilir.

CpDNA' yı nüklear DNA ile kıyaslandığında daha düşük mutasyon oranlarına sahip olması ve kalıtım biçimi tek bir ebeveynden(anneden) gelmesinden dolayı genetik çeşitlilik ve evrim çalışmaları için uygundur. CpDNA sının gen düzeni ve genom boyutu iyi bir şekilde korunmuştur. Bu organelin korunmuş olmasıda pek çok bitkide kodlanmayan bölgeleri amplifiye etmek için kullanılan, evrensel primer çiftlerinin tasarlanmasına olanak kılmıştır[17]. CpDNA genlerinin korunumu özelliğinden dolayı türler arasında filogenetik ve populasyon genetiği çalışmalarında kullanımı artmaktadır[18].

Spesifik cpDNA sekanslarının amplifikasyonu için kullanılabilen evrensel primerler, cpDNA'nın PCR temelli RFLP analizinde de kullanılmaktadır[17]. Bitkilerdeki çoğu çalışmalarda PCR tabanlı RFLP analizlerinde CpDNA filogenetik markır olarak kullanılmaktadır[18].

3.BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Bitkilerin Temin Edilmesi

Çalışmada kullanılan bitkiler Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Cem VURAL tarafından temin edilmiştir. Örneklerin alındığı yerin adres bilgileri ve toplama tarihleri arazi defterine kaydedilmiştir. Çalışma kullanılan bitkilerin toplanma tarihleri ve adres bilgileri tablo 3.1 ve tablo 3.2 verilmiştir. Halen Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda aşağıdaki tabloda referans numaraları ile saklanmaktadır.

Tablo 3.1.Sekans çalışması kapsamında kullanılan bitkiler

Örnek Kodu	Örnek Adı	Referans No	Lokalite	Toplama Tarihi
1	Echinops ritro	CV-4523	Tekirdağ, Malkara-Keşan yolu 110 m	09.07.2008
2	Echinops microcephalus	CV-4543	Kırklareli, Kırklareli-Babaeski 22.km, tarla kenarı	09.07.2008
3	Echinops sphaerocephalus	CV-4418	Gümüşhane, Şiran-Kelkit arası,Çilhoroz geçidi yakını, Kılıçtaşı Köyü, 1416 m	22.08.2007
4	Echinops albidus	CV-4545	Kırklareli, Kırklareli-Pınarhisar Kızılcıkdere köyü kırsalı 2. km	09.07.2008
5	Echinops galaticus	CV-4202		
6	Echinops ossicus	CV-4422	Gümüşhane, İkisu-Şiran 34.	22.08.2007

			km, Artabil aşağısı	
7	<i>Echinops pungens</i>	CV-4414	Giresun, Alvera Şebinkarahisar 5-6 km. Aktepe çevresi	22.08.2007
8	<i>Echinops polyacanthus</i>	CV-4757	Erzurum, Horasan-Eleşkirt yolu	24.08.2007
9	<i>Echinops adenocladus</i>	CV-4267	Van, Hakkari- Van Başkale Gelenler köyü yakını, İran sınırı 315-317 numaralı sınır taşları arasındaki bölge, 2650 m.	10.08.2007
10	<i>Echinops transcaucasicus</i>	CV-4763	Kars, Kars-Ardahan il sınırı	26.08.2007
11	<i>Echinops tournefortii</i>	CV-4449	Iğdır, Iğdır-Doğubayazıt 26. km, Kavaktepe Köyünün Kuzeyi, 1583 m, step	25.08.2007
12	<i>Echinops heterophyllus</i>	CV-4789	Hakkari, Yüksekova, Esentepe yolu, 1970 m	03.09.2009
13	<i>Echinops vaginatus</i>	CV-4360	Kahramanmaraş: Ahır Dağı, Devlet Hastanesi Çıkışı, 1542 m, taşlık alan	04.08.2007
14	<i>Echinops onopordum</i>	CV-4342	Isparta, Gebiz (Antalya)- Sütçüler kasabası yolu, Haskızılören köyü, Karataş Mahallesi, Kızıllı-Pınargözü yolu arasında, m, Kalker kayalar üzerinde	20.07.2007
15	<i>Echinops mersinensis</i>	CV-4328	Antalya, Antalya- Kemer, Kesme Boğazı üzeri, Teke Ovacık Dağı, Porsuk Yaylası yolu	
16	<i>Echinops emiliae</i>	CV-4603	Antalya, Antalya-Kemer, Tahtalı Dağı, Karapınar yaylası-Büyük Zirve, hareketli iri taşlıklar, dağ stepi, 2200 m	21.08.2008

17	Echinops gaillardotii	CV-4496	Mersin, Mersin-Çamlıyayla, 896 m	01.07.2008
18	Echinops borae	CV-4752	Mersin, Mersin- Paşasuyu kenarı	
19	Echinops spinosissimus var.bithynicus	CV-4771	Çankırı, Çankırı-Kastamonu 20.km Yol kenarı	
20	Echinops spinosissimus var.viscosus	CV-4333	Antalya, Antalya Kaş-Finike arası 33-34.km	
21	Echinops melitenensis	CV-4370	Malatya, Malatya-Gölbaşı 23. km, 1096 m	05.08.2007
22	Echinops phaeocephalus	CV-4583	Şırnak, Şırnak- Cizre Kasrik Boğazı	
23	Echinops antalyense	CV-4599	Antalya, Antalya- Kemer yolu	
24	Echinops dumanii	CV-4738	Adana,Adana-Yumurtalık, deniz kenarı tuzlu kumullar,1-3 m	09.11.2008
25	Seneci Vulgaris			

Tablo 3.2.PCR-RFLP çalışması kapsamında kullanılan bitkiler

Örnek Kodu	Örnek Adı	Referans No	Lokalite	Toplama Tarihi
1	Echinops ritro	CV-4523	Tekirdağ, Malkara-Keşan yolu 110 m	09.07.2008
2	Echinops microcephalus	CV-4543	Kırklareli, Kırklareli-Babaeski 22.km, tarla kenarı	09.07.2008
3	Echinops sphaerocephalus	CV-4418	Gümüşhane, Şiran-Kelkit arası, Çilhoroz geçidi yakını, Kılıçtaşı Köyü, 1416 m	22.08.2007
4	Echinops albidus	CV-4545	Kırklareli, Kırklareli-Pınarhisar	09.07.2008

			Kızılıkdere köyü kırsalı 2. km	
6	<i>Echinops ossicus</i>	CV-4422	Gümüşhane, İkisu-Şiran 34. km, Artabil aşağısı	22.08.2007
7	<i>Echinops pungens</i>	CV-4414	Giresun, Alvera Şebinkarahisar 5-6 km. Aktepe çevresi	22.08.2007
8	<i>Echinops polyacanthus</i>	CV-4757	Erzurum, Horasan-Eleşkirt yolu	24.08.2007
9	<i>Echinops adenocladus</i>	CV-4267	Van, Hakkari- Van Başkale Gelenler köyü yakını, İran sınırı 315-317 numaralı sınır taşları arasındaki bölge, 2650 m.	10.08.2007
10	<i>Echinops transcaucasicus</i>	CV-4763	Kars, Kars-Ardahan il sınırı	26.08.2007
11	<i>Echinops tournefortii</i>	CV-4449	Iğdır, Iğdır-Doğubayazıt 26. km, Kavaktepe Köyünün Kuzeyi, 1583 m, step	25.08.2007
12	<i>Echinops heterophyllus</i>	CV-4789	Hakkari, Yüksekova, Esentepe yolu, 1970 m	03.09.2009
13	<i>Echinops vaginatus</i>	CV-4360	Kahramanmaraş: Ahır Dağı, Devlet Hastanesi Çıkışı, 1542 m, taşlık alan	04.08.2007
14	<i>Echinops onopordum</i>	CV-4342	Isparta, Gebiz (Antalya)- Sütçüler kasabası yolu, Haskızılören köyü, Karataş Mahallesi, Kızıllı-Pınargözü yolu arasında, m, Kalker kayalar üzerinde	20.07.2007
15	<i>Echinops mersinensis</i>	CV-4328	Antalya, Antalya- Kemer, Kesme Boğazı üzeri, Teke Ovacık Dağı, Porsuk Yaylası yolu	
16	<i>Echinops emiliae</i>	CV-4603	Antalya, Antalya-Kemer, Tahtalı Dağı, Karapınar yaylası-Büyük Zirve, hareketli iri taşlıklar, dağ stepi, 2200 m	21.08.2008

17	<i>Echinops gaillardotii</i>	CV-4496	Mersin, Mersin-Çamlıyayla, 896 m	01.07.2008
18	<i>Echinops borae</i>	CV-4752	Mersin, Mersin- Paşasuyu kenarı	
19	<i>Echinops spinosissimus</i> var.bithynicus	CV-4771	Çankırı, Çankırı- Kastamonu 20.km Yol kenarı	
20	<i>Echinops spinosissimus</i> var.viscosus	CV-4333	Antalya, Antalya Kaş-Finike arası 33-34.km	
21	<i>Echinops melitenensis</i>	CV-4370	Malatya, Malatya-Gölbaşı 23. km, 1096 m	05.08.2007
22	<i>Echinops phaeocephalus</i>	CV-4583	Şırnak, Şırnak- Cizre Kasrik Boğazı	
23	<i>Echinops antalyense</i>	CV-4599	Antalya, Antalya- Kemer yolu	
24	<i>Echinops dumanii</i>	CV-4738	Adana,Adana-Yumurtalık, deniz kenarı tuzlu kumullar,1-3 m	09.11.2008
25	<i>Echinops ritrodes</i>	CV-4359	Maraş: Ahır Dağı, Devlet Hastanesi Çıkışı, 1552 m	04.08.2007
26	<i>Echinops orientalis</i>	CV-3740	Ankara, Ankara Çevre yolu Eskişehir çıkışı	
27	<i>Echinops chardinii</i>	CV-4371	Malatya,Malatya-Gölbaşı 23. Km, 1096 m	05.08.2007
28	<i>Echinops tenuisectus</i>	CV-4355	Maraş: Göksun, Göksun- Doğankonak K 20. km, 1621 m,	04.08.2007
29	<i>Echinops adenocaulos</i>	CV-4574	Şanlıurfa, Birecik – Suruk, 757 m	06.08.2008
30	<i>Senecio vulgaris</i>			

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1 Bitkilerden Total 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. Sekans Analizi

Sekans analizi çalışmasında Kloroplast DNA'nın 30S ribosomal protein S16-*rps16* gen bölgesini çoğaltmak için 950 baz uzunluğunda ürün verecek olan Cp2F ve Cp2R primer çiftleri kullanılmaktadır.

Tablo 3.3. Sekans analizi için kullanılan primerler

Primer İsmi	Baz Uzunluğu (bp)	%GC	Baz Dizilimi
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'

PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları [19, 20];

ddH ₂ O	: 37.6 µl
PCR tamponu (stok 10X)	: 8 µl
MgCl ₂ (stok 25mM)	: 8 µl
10µM Cp2F Primer	: 2.67 µl
10µM Cp2R Primer	: 2.67 µl
dNTPs (stok 10mM)	: 2.67 µl
BSA (stok 10mg/ml)	: 6.4 µl
Taq DNA Polimeraz	: 1.33 µl
Genomik DNA	: 10.68 µl
Toplam Hacim	: 80 µl

PCR Döngü Programı;

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94 °C	2.30 dk	1
Denatürasyon	94 °C	1.00 dk	35
Bağlan	57 °C	1.00 dk	35
Uzama	72 °C	2.30 dk	35
Sonlandırma	72 °C	10.00 dk	1

3.2.3 PCR- RFLP Analizi

RFLP çalışmalarında 2 primer çifti kullanılmıştır. RFLP çalışmalarında kullanılan primerlere ait bilgiler tablo 3.4 ve tablo 3.5 de verilmiştir.

Tablo 3.4. PCR-RFLP analizi için kullanılan primerler

Primer İsmi	Baz Uzunluğu (bp)	%GC	Baz Dizilimi
Cp 3F	20	60.0	5'-ACG GGA ATT GAA CCC GCG CA-3'
Cp 3R	20	60.0	5'-CCG ACT AGT TCC GGG TTC GA-3'
Cp 4F	20	70.0	5'-GGG TTG CCC GGG ACT CGA AC-3'
Cp 4R	24	45.8	5'-CAA CGG TAG AGT ACT CGG CTT TTA-3'

Tablo 3.5. PCR-RFLP çalışmasında kullanılan enzimler

Enzim İsimleri	Kesim bölgesi	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon süresi
Alu I	AG_CT TC_GA	37°C	16saat
Mbo I	_GATC CTAG_	37°C	16saat
Hin 1II (Nla1 II)	_CATG GTAC_	37°C	16saat
Rsa I	GT_AC CA_TG	37°C	16saat
Mn 1I	CCTC_ GGAG_	37°C	16saat
BsuRI	GG_CC CC_GG	37°C	16saat

PCR için kullanılan kimyasallar ve miktarları [21];

ddH₂O : : 16.45 µl

PCR tamponu (stok 10X) : : 3.5 µl

MgCl₂ (stok 25mM) : : 3.5 µl

Primer: : 2.334 µl

dNTPs (stok 10mM) : : 1.167 µl

BSA (stok 10mg/ml) : : 2.8 µl

Taq DNA Polimeraz : : 0.583µl

Genomik DNA : : 4.67 µl

Toplam Hacim : : 35 µl

3.2.4. Restriksiyon Enzimleriyle DNA'ların Kesimi

Amplifikasyonu gerçekleşen her bir örnekten 8 µl'lik kısım 0,2 ml'lik steril ependorf tüplere konuldu, üzerine 1 µl restriksiyon enzimi, 2 µl RE tamponu, 9 µl ddH₂O ilave edildi ve sonra üzeri mineral oil ile kapatıldı. Daha sonra etüve yerleştirilerek enzimler için 37°C 'de 16 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Bütün çalışmalar agaroz jel elektroforezi yapılarak değerlendirilmiştir. Total DNA eldesini görüntüleyebilmek için %0.8'lik, PCR reaksiyonu sonucu hedef dizinin çoğaltılıp çoğaltılmadığını görüntüleyebilmek için %2'lik, Restriction fragmentleri %2.5'lik agaroz jel kullanılmıştır. DNA'nın görüntülenebilmesi için jel 0.5 µg/ml oranında Ethidium Bromide eklenerek hazırlanmıştır. Her bir örneğe ait 15 µl PCR ürününe 6X stok yükleme boyasından 3 µl (%0.025 ksilen siyanol, %0.025 bromfenol blue ve %40 sukroz) ilave edilerek örneklerin tamamı 0.5X TAE tamponu ile 80 V sabit voltaj uygulanarak 1s.30dk. yürütülmüştür. PCR reaksiyonları Sensoquest labcyler marka gradiyent thermocycler kullanılarak yapılmıştır. Jeller Kodak Gel Logic 1500 marka görüntüleme sistemi ile dökümanite edilmiştir.

3.3 İstatistiksel Analiz

Elde edilen Restriksiyon Endonükleaz ürünlerinden elde edilen bantlara göre NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.11f) istatistik programından yararlanarak genotipler arasındaki genetik uzaklıkları (sm) ve yakınlıkları (dist) ifade eden dendrogramlar “UPGMA cluster analizi, ve NJ cluster analizi” ile oluşturulmuştur.

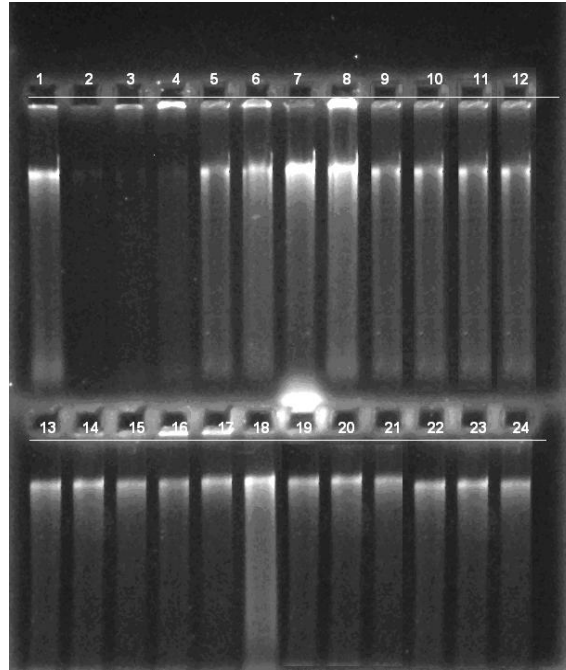
DNA dizilim sonuçlarının değerlendirilmesinde; BİOEDİT version 7.041 programı ile dizilim düzenlendi, ClustalX 1.83 paket programı ile dizilim align edildi ve uç kısımlarda kalan boşluklar atılarak analize hazır hale getirildi. Populasyonların genetik yapısı ile ilgili değerler ARLEQUİN 3.0 ve DNAsp 4.10 programları vasıtasıyla tahmin edildi, filogenetik analizi için MEGA 4.0 paket programı ile Kimura-2 Parametre Modeli'ne göre elde edilen değerlere NJ metodu kullanılarak dendrogramları çizildi.

4. BÖLÜM

SONUÇLAR

4.1. Araştırma Bulguları

Bitkilerden elde edilen total DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantlarının görüntülenmesi sağlandı.

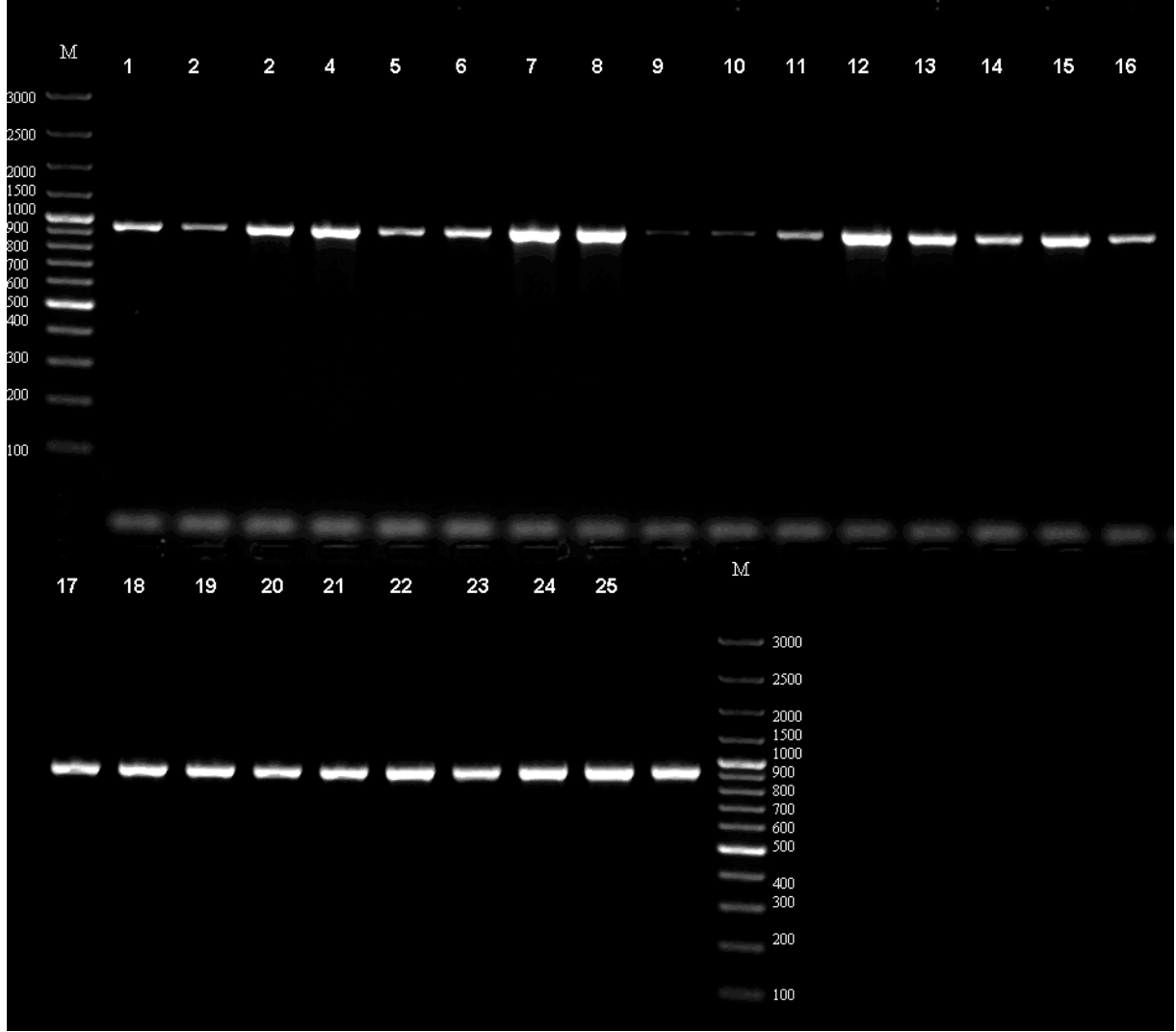


Şekil 4.1. Bitkilerden elde edilen total DNA'nın Agaroz Jel'de Görünümü

4.2. cpDNA 30S Ribosomal Protein S16-*rps16* Genin Dizi Analiz Sonuçları

4.2.1. cpDNA 30S ribosomal protein S16-*rps16* genin PCR ile Amplifikasyonu

Her bir bitkilerden elde edilen total DNA kullanılarak, cpDNA'nın incelenen bölgeleri ayrı ayrı PCR işlemiyle amplifiye edildi ve sonuçlar %2 ' lik agaroz jelde gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. 30S ribosomal protein S16-*rps16* gen bölgesinin PCR sonuçları M: 100-3000bç
DNA moleküler ağırlık belirteci

4.2.2. cpDNA 30S Ribosomal Protein S16-*rps16* Geninden Elde Edilen Dizinin Yapısı ve Varyasyonu

Echinops cinsine ait 3 seksiyondan 24 tür için cpDNA' nın 30S ribosomal protein S16-*rps16* geni sekans analizi sonuçlarına göre Tablo 3.1 'de 2-3 , 9-10-11, 18-23 örnek kod numaraları ile belirtilen örnekler haplotiptir. Haplotip çeşitliliği (haplotype diversity, Hd) 0.9833 olarak tespit edildi. Haplotip çeşitliliğinin 1'e yakın olması dizi analizi yapılan bireylerin her birinin farklı bir haplotipe sahip olduğu ve çalışılan grubun genetik çeşitliliğinin fazla olduğu anlamına gelir. Nükleotid çeşitliliği (nucleotide diversity, P_i , π) 0,01409 olarak tespit

edilmiştir.

30S Ribosomal Protein S16-*rps16* Genin dizi analizi yapılan 831 baz çiftlik kısmında oluşturulan matriksteki bazların oranı A: % 35.1, C: % 17.6, G: % 15.6, T(U): 31.7 şeklinde tespit edildi. Örneklere ilişkin DNA dizileri A – T’ce nispeten zengin olup (%66.8), G – C oranı daha azdır (%33.2).

	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
1	32.0	15.7	34.9	17.4	788	31.7	14.1	38.9	15.3	262	27.0	18.3	36.1	18.6	263	37.3	14.8	29.7	18.3	263
2	31.8	15.7	35.2	17.2	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	26.6	18.3	36.5	18.6	263	37.3	14.8	30.0	17.9	263
4	32.2	15.3	34.7	17.8	790	31.7	14.1	38.9	15.3	262	26.9	17.8	35.6	19.7	264	37.9	14.0	29.5	18.6	264
5	32.0	15.9	34.7	17.3	803	31.8	14.2	38.6	15.4	267	26.5	19.0	36.2	18.3	268	37.7	14.6	29.5	18.3	268
6	31.9	15.6	35.1	17.4	793	32.2	14.4	38.3	15.2	264	26.5	17.8	37.1	18.6	264	37.0	14.7	29.8	18.5	265
7	31.8	15.6	35.2	17.4	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	27.0	17.9	36.5	18.6	263	36.9	14.8	30.0	18.3	263
8	31.7	15.7	35.1	17.5	789	31.6	14.1	38.8	15.6	263	26.6	18.3	36.5	18.6	263	36.9	14.8	30.0	18.3	263
9	31.7	15.7	35.2	17.4	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	26.6	18.3	36.5	18.6	263	36.9	14.8	30.0	18.3	263
12	31.3	15.8	35.2	17.7	790	31.6	14.1	39.2	15.2	263	25.8	18.6	35.6	20.1	264	36.5	14.8	30.8	17.9	263
13	31.7	15.6	35.1	17.6	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	26.6	17.9	36.5	19.0	263	36.9	14.8	29.7	18.6	263
14	31.0	15.9	34.9	18.1	790	31.2	14.1	38.8	16.0	263	25.8	18.6	35.6	20.1	264	36.1	15.2	30.4	18.3	263
15	31.7	15.6	34.9	17.9	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	26.6	17.9	35.7	19.8	263	36.9	14.8	29.7	18.6	263
16	31.5	15.9	35.0	17.7	775	31.7	14.3	38.6	15.4	259	26.7	18.2	36.0	19.0	258	36.0	15.1	30.2	18.6	258
17	31.4	15.6	35.4	17.6	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	26.1	17.8	37.1	18.9	264	36.6	14.9	29.8	18.7	262
18	31.7	15.6	35.2	17.5	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	26.5	17.8	36.7	18.9	264	37.0	14.9	29.8	18.3	262
19	31.8	15.6	35.1	17.6	790	31.8	14.0	38.6	15.5	264	26.5	17.8	36.7	18.9	264	37.0	14.9	29.8	18.3	262
20	31.6	15.4	35.2	17.7	790	31.4	14.0	39.0	15.5	264	26.5	17.4	36.7	19.3	264	37.0	14.9	29.8	18.3	262
21	31.6	15.3	35.0	18.1	789	31.1	14.0	39.0	15.9	264	26.6	17.1	36.5	19.8	263	37.0	14.9	29.4	18.7	262
22	31.6	15.4	35.1	17.8	790	31.4	14.0	39.0	15.5	264	26.5	17.4	36.7	19.3	264	37.0	14.9	29.4	18.7	262
24	31.7	15.7	35.2	17.4	789	31.6	14.1	39.2	15.2	263	26.5	17.8	36.7	18.9	264	37.0	15.3	29.8	17.9	262
Avg.	31.7	15.6	35.1	17.6	789.5	31.6	14.1	39.0	15.4	263.1	26.5	18.0	36.4	19.1	263.5	36.9	14.8	29.9	18.4	262.8

Tablo 4.1. Örneklerin Baz içeriği

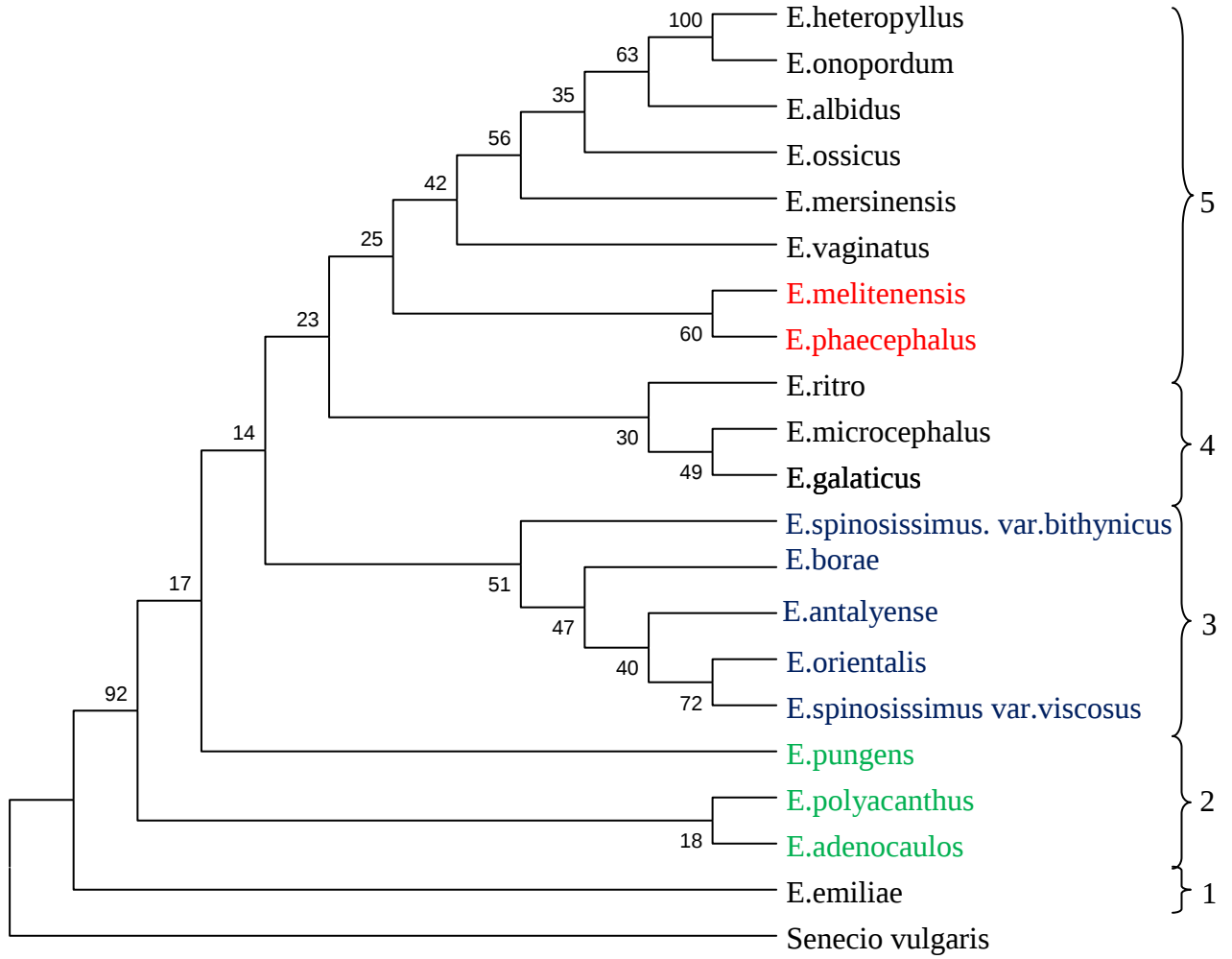
4.2.4. Uzaklık (Distance) Analizi

Örnekler arasındaki genetik uzaklığın belirlenmesi için MEGA programı ve Kimura 2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak elde edilen örnekler arası uzaklık matrisi tablo 4.2’de verildi. Uzaklık matrisi incelendiğinde en küçük genetik uzaklık değeri (0.0013); örnekler 2 ve 9, örnekler 7 ve 9, örnekler 8 ve 9, örnekler 9 ve 18, örnekler 18 ve 19, örnekler 18 ve 20, örnekler 18 ve 24 arasında gözlenirken en büyük genetik uzaklık değeri (0.0358) ise haplotip 6 ve 14 arasında gözlemlendi. Bu değerler, takson içerisinde genetik olarak önemli derecede farklılıklar olmadığını göstermektedir.

	1	2	4	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	24
[1]																				
[2]	0.0026																			
[4]	0.0104	0.0104																		
[5]	0.0039	0.0013	0.0091																	
[6]	0.0210	0.0210	0.0237	0.0224																
[7]	0.0052	0.0026	0.0118	0.0039	0.0224															
[8]	0.0052	0.0026	0.0131	0.0039	0.0237	0.0026														
[9]	0.0039	0.0013	0.0118	0.0026	0.0224	0.0013	0.0013													
[12]	0.0237	0.0237	0.0184	0.0251	0.0345	0.0224	0.0238	0.0224												
[13]	0.0039	0.0039	0.0091	0.0052	0.0197	0.0026	0.0039	0.0026	0.0197											
[14]	0.0278	0.0278	0.0224	0.0291	0.0358	0.0264	0.0278	0.0264	0.0065	0.0238										
[15]	0.0078	0.0078	0.0091	0.0091	0.0210	0.0065	0.0078	0.0065	0.0171	0.0039	0.0211									
[16]	0.0091	0.0065	0.0170	0.0078	0.0277	0.0065	0.0065	0.0052	0.0278	0.0078	0.0318	0.0117								
[17]	0.0104	0.0078	0.0184	0.0091	0.0291	0.0078	0.0078	0.0065	0.0291	0.0091	0.0332	0.0131	0.0117							
[18]	0.0052	0.0026	0.0131	0.0039	0.0237	0.0026	0.0026	0.0013	0.0237	0.0039	0.0278	0.0078	0.0065	0.0052						
[19]	0.0065	0.0039	0.0144	0.0052	0.0224	0.0039	0.0039	0.0026	0.0251	0.0052	0.0291	0.0091	0.0078	0.0065	0.0013					
[20]	0.0065	0.0039	0.0144	0.0052	0.0250	0.0039	0.0039	0.0026	0.0251	0.0052	0.0291	0.0091	0.0078	0.0052	0.0013	0.0026				
[21]	0.0091	0.0091	0.0131	0.0104	0.0250	0.0078	0.0091	0.0078	0.0238	0.0065	0.0264	0.0078	0.0131	0.0118	0.0065	0.0078	0.0078			
[22]	0.0052	0.0052	0.0104	0.0065	0.0237	0.0052	0.0052	0.0039	0.0211	0.0039	0.0251	0.0052	0.0091	0.0078	0.0026	0.0039	0.0039	0.0039		
[24]	0.0065	0.0039	0.0144	0.0052	0.0250	0.0039	0.0039	0.0026	0.0251	0.0052	0.0291	0.0091	0.0078	0.0065	0.0013	0.0026	0.0026	0.0078	0.0039	

Tablo 4.2. Örnekler arasındaki genetik uzaklık

Bu çalışmada tespit edilen örneklerin 30S ribosomal protein S16-*rps16* genin 831 bazlık kısmının dizi analizine göre örnekler arasındaki ilişkiler şekil 4.3’e 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 4.3) örneklerin 5 ana soy hattı şeklinde gruplandığı görülmektedir. Birinci ana soy hattı *E. emiliae*’den ibaret olup ikinci ana soy hattı *E. pungens* ve varyetelerinden oluşmaktadır. Birinci ana soy hattı % 92’lik bootstrap değeri ile desteklenmektedir.



Şekil 4.3. Echinops seksiyonları arasındaki evrimsel ilişkiyi gösteren NJ ağacı. (Oligolepis seksiyonuna ait taksonlar kırmızı, Echinops seksiyonuna ait taksonlar siyah ve Ritrodes seksiyonuna ait taksonlar ise mavi renkte yazılmıştır.

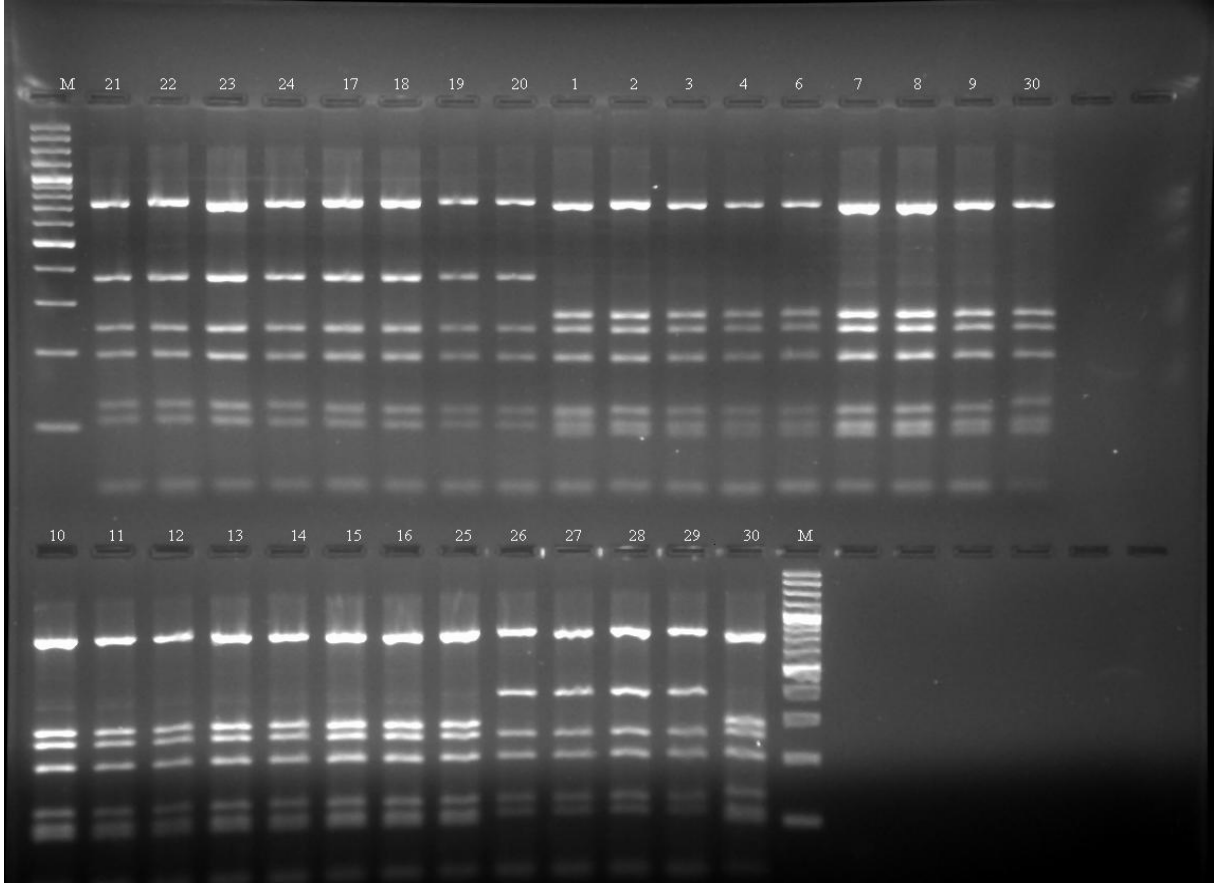
4.3. PCR- RFLP Sonuçları

Bu çalışma tablo 3.5 verilen Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve tablo 3.4. verilen primerler kullanılarak amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir. PCR sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri bantların varlığı (1) ve yokluğu (0) olarak değerlendirilmiştir ve Polimorfizm Oranı (%) = $\frac{\text{Polimorfik Bant Sayısı}}{\text{Toplam Bant Sayısı}} \times 100$ ile hesaplanmıştır. Bu değerlendirme sonucunda Cp 3F-Cp 3R primerleri ile elde edilen toplam bant sayısı 46, polimorfik bant sayısı 30, polimorfizm oranı %65.2 ‘dur. Cp 4F-Cp 4R primerleri ile elde edilen bant sayısı 64, polimorfik bant sayısı 53, polimorfizm oranı % 82.8 ‘dur.

4.3.1. Cp 3F-Cp 3R RFLP Sonuçları

Mbo I Enzim Sonuçları

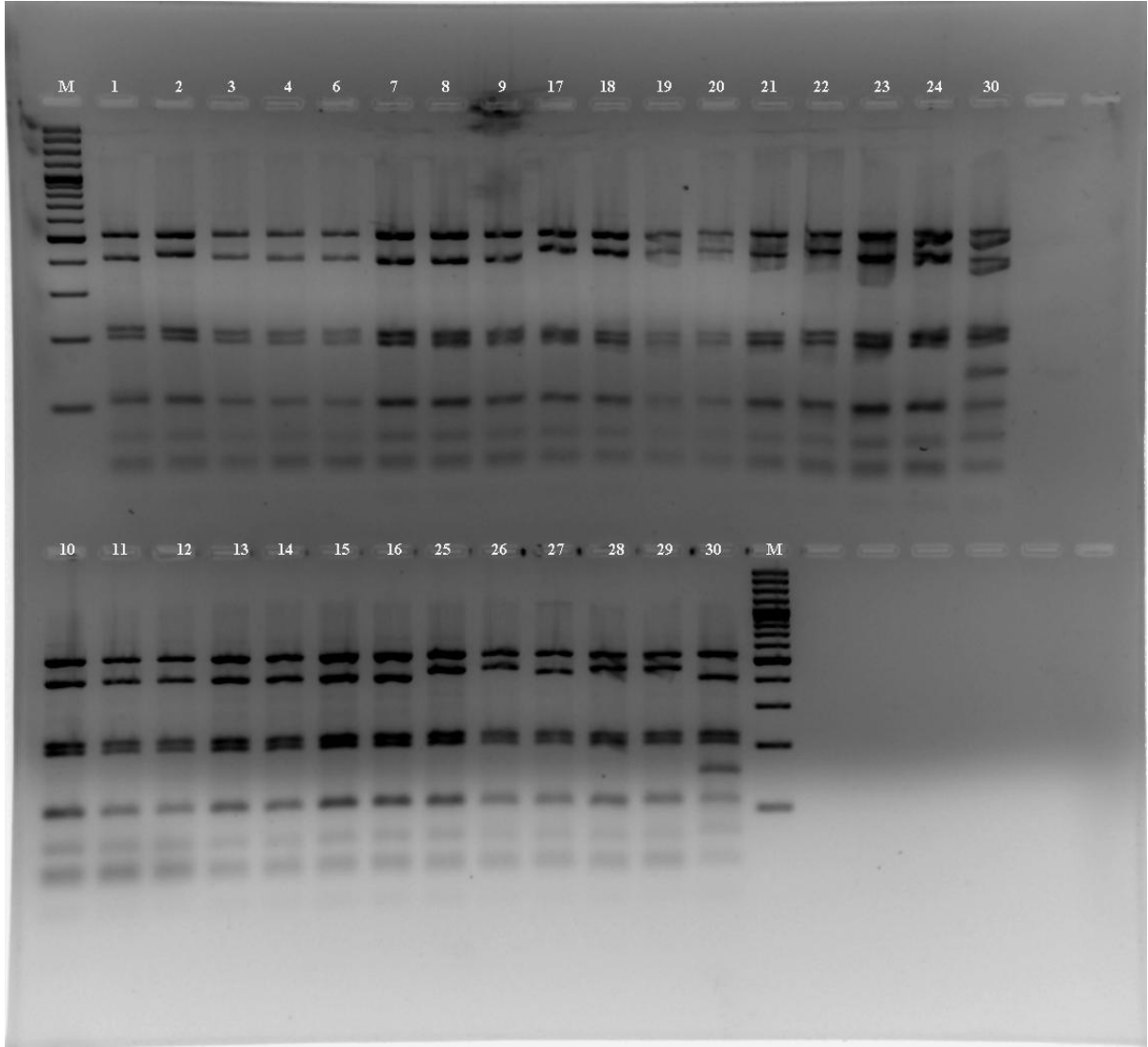
Cp 3F-Cp 3R ile Mbo I enzimi ile yapılan çalışmada 100-800 bç 8 bant elde edilmiştir. 3 adet polimorfik bant, 5 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 37.5 'dir.



Şekil 4.4. Cp 3F-Cp 3R ve Mbo I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci

Alu I Enzim Sonuçları

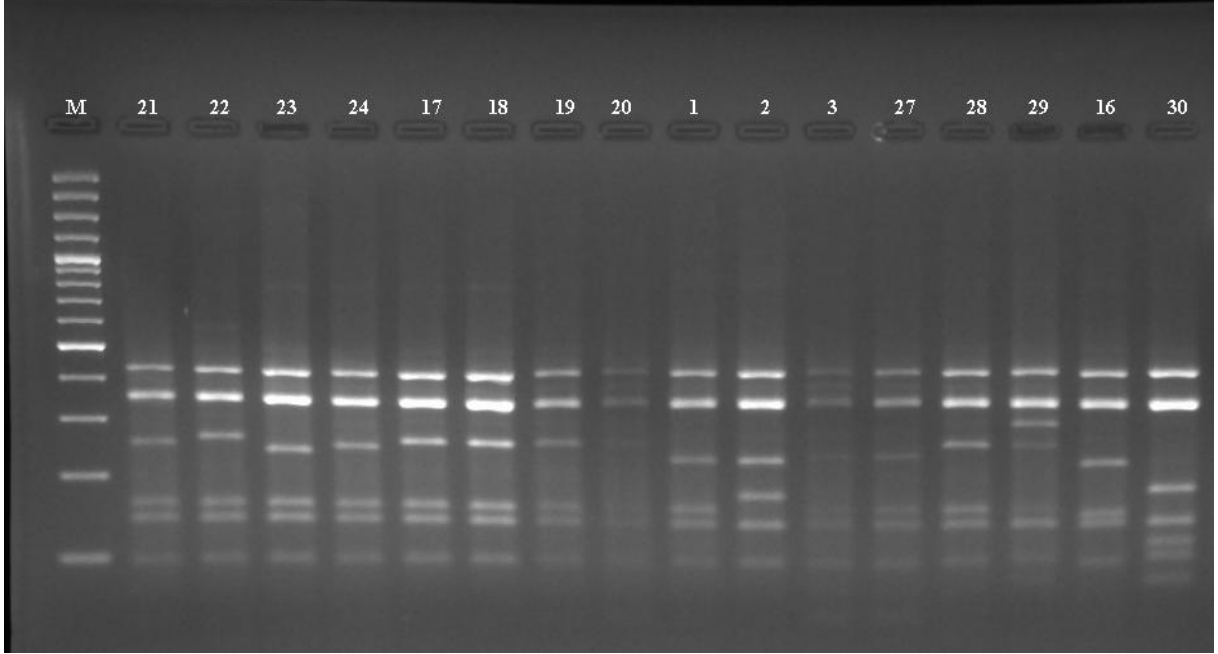
Cp 3F-Cp 3R ile Alu I enzimi ile yapılan çalışmada 50-550 bç 9 bant elde edilmiştir. 4 adet polimorfik bant, 5 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 44.4 'dir.



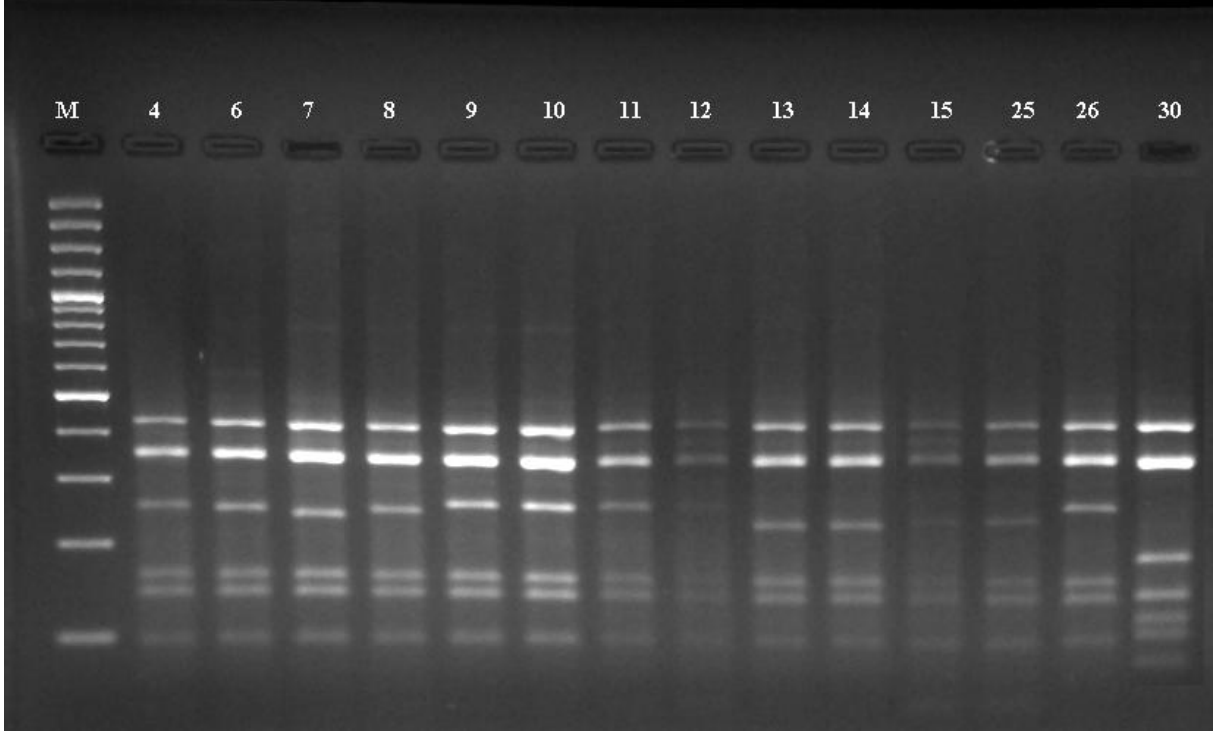
Şekil 4.5. Cp 3F-Cp 3R ve Alu I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M: 100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci

Mn 1I Enzim Sonuçları

Cp 3F-Cp 3R ile Mn 1I enzimi ile yapılan çalışmada 100-450 bç 13 bant elde edilmiştir. 10 adet polimorfik bant, 3 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 76.9 'dır.



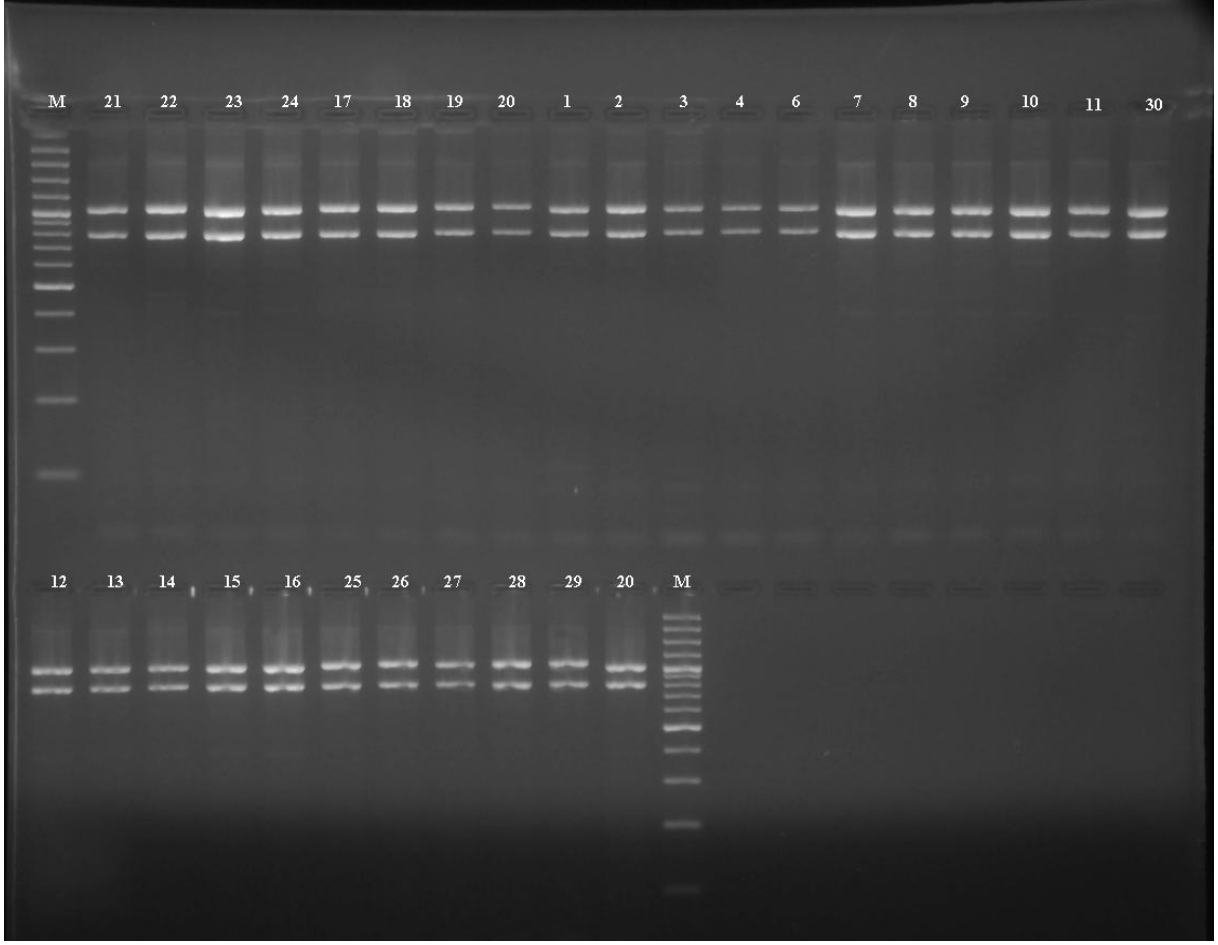
Şekil 4.6. Cp 3F-Cp 3R ve Mn 1I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:
100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci



Şekil 4.6' nın devamı

Rsa I Enzim Sonuçları

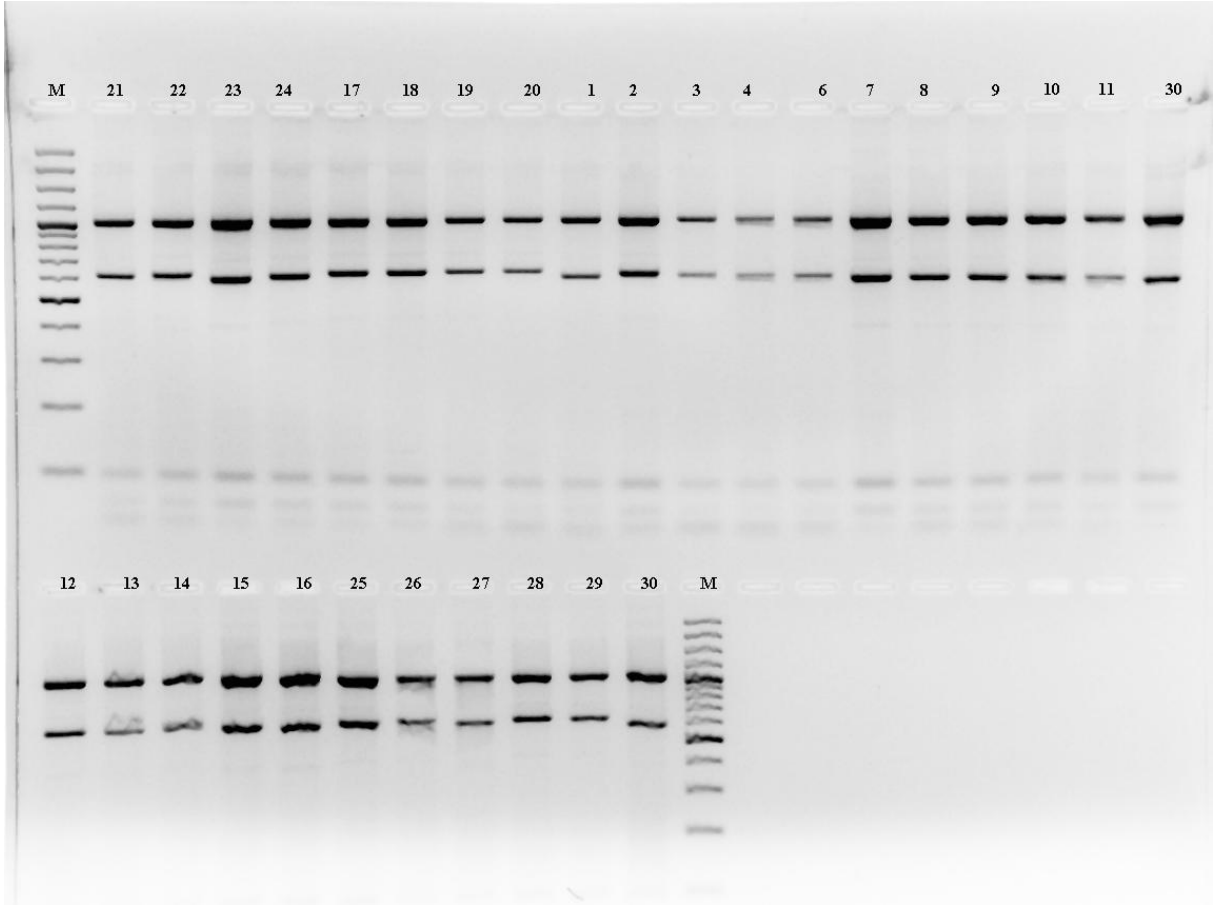
Cp 3F-Cp 3R ile Rsa I enzimi ile yapılan çalışmada 800-1100 bç 4 bant elde edilmiştir. 2 adet polimorfik bant, 2 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 75 'dir.



Şekil 4.7. Cp 3F-Cp 3R ve Rsa I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:
100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci

BsuRI Enzim Sonuçları

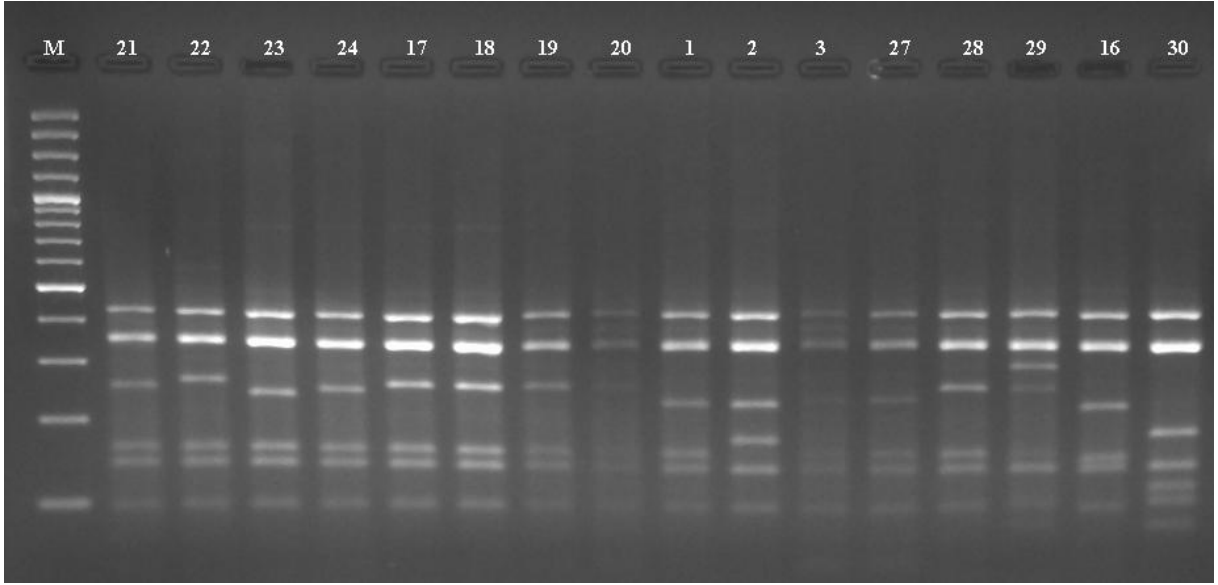
Cp 3F-Cp 3R ile BsuRI enzimi ile yapılan çalışmada 680-1000 bç 5 bant elde edilmiştir. 4 adet polimorfik bant, 1 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 80 'dir.



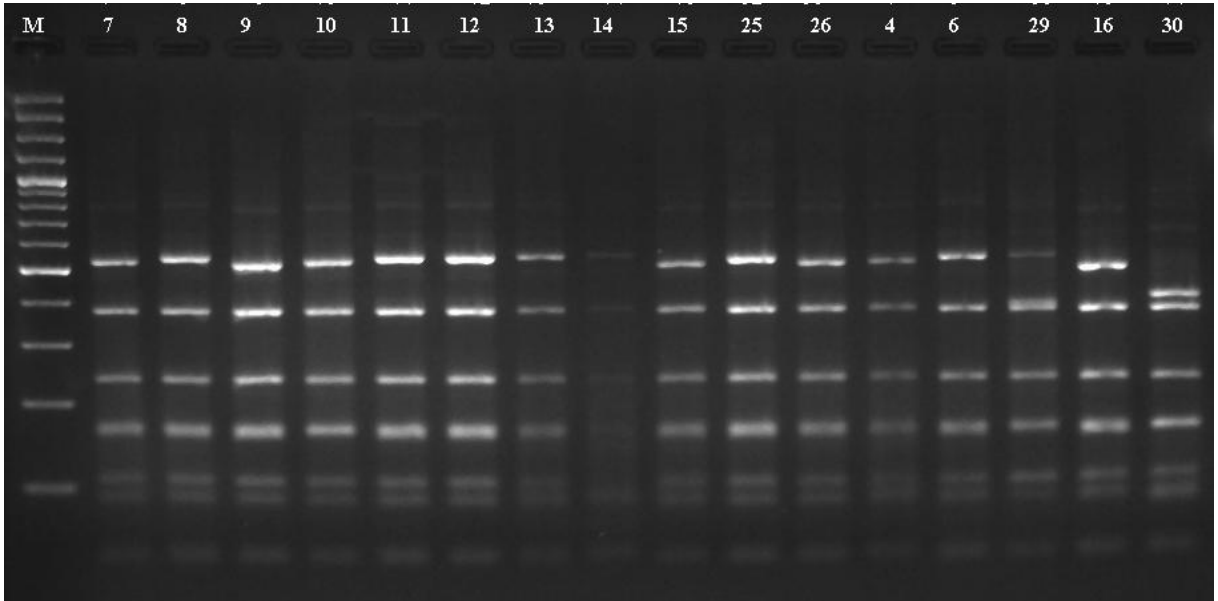
Şekil 4.8. Cp 3F-Cp 3R ve BsuRI enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:
100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci

Hin 1II (Nla1 II) Enzim Sonuçları

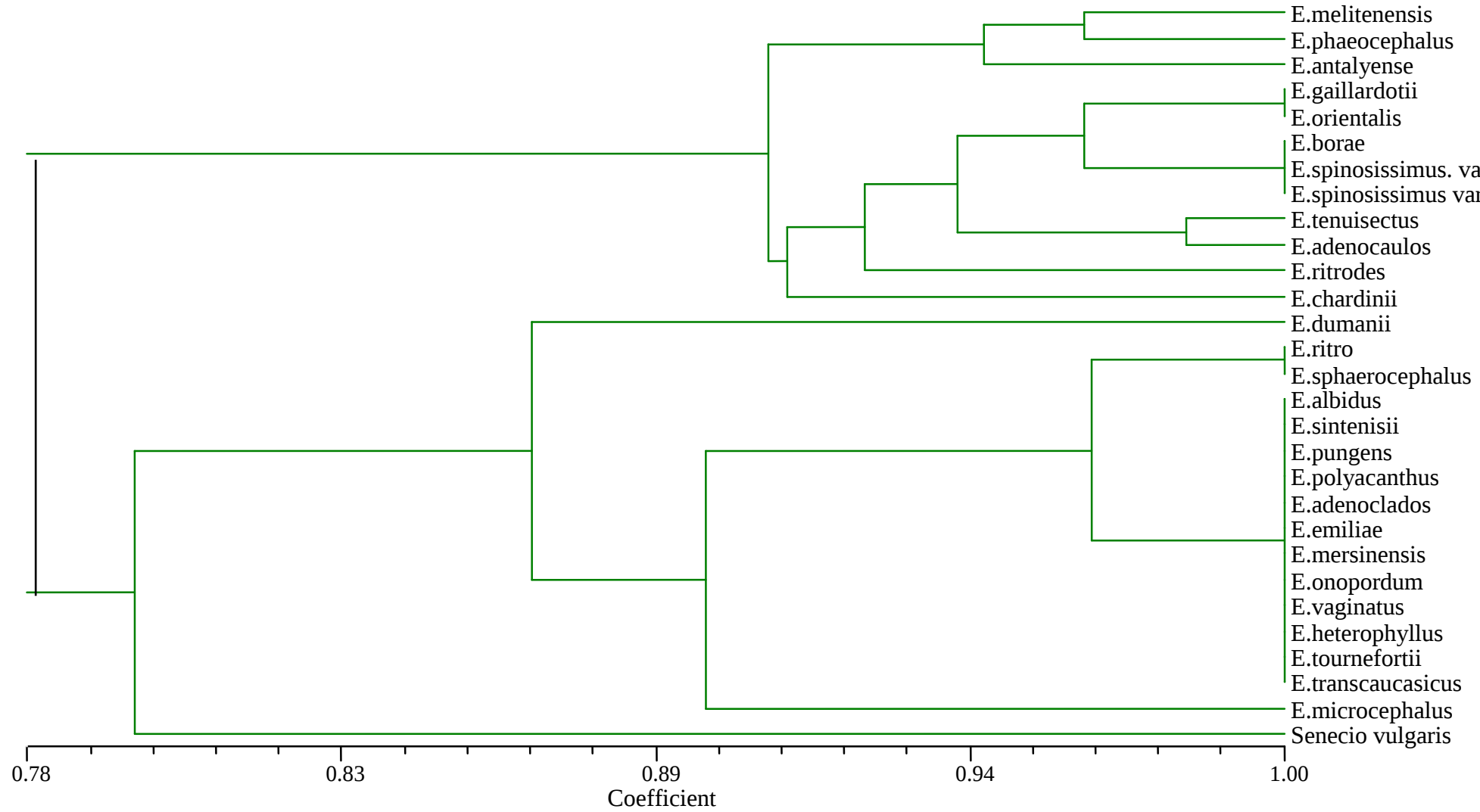
Cp 3F-Cp 3R ile Hin 1II (Nla1 II) enzimi ile yapılan çalışmada 100-550 bç 9 bant elde edilmiştir. 4 adet polimorfik bant, 5 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 44.4 'dir.



Şekil 4.9. Cp 3F-Cp 3R ve Hin 1II (Nla1 II) enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci



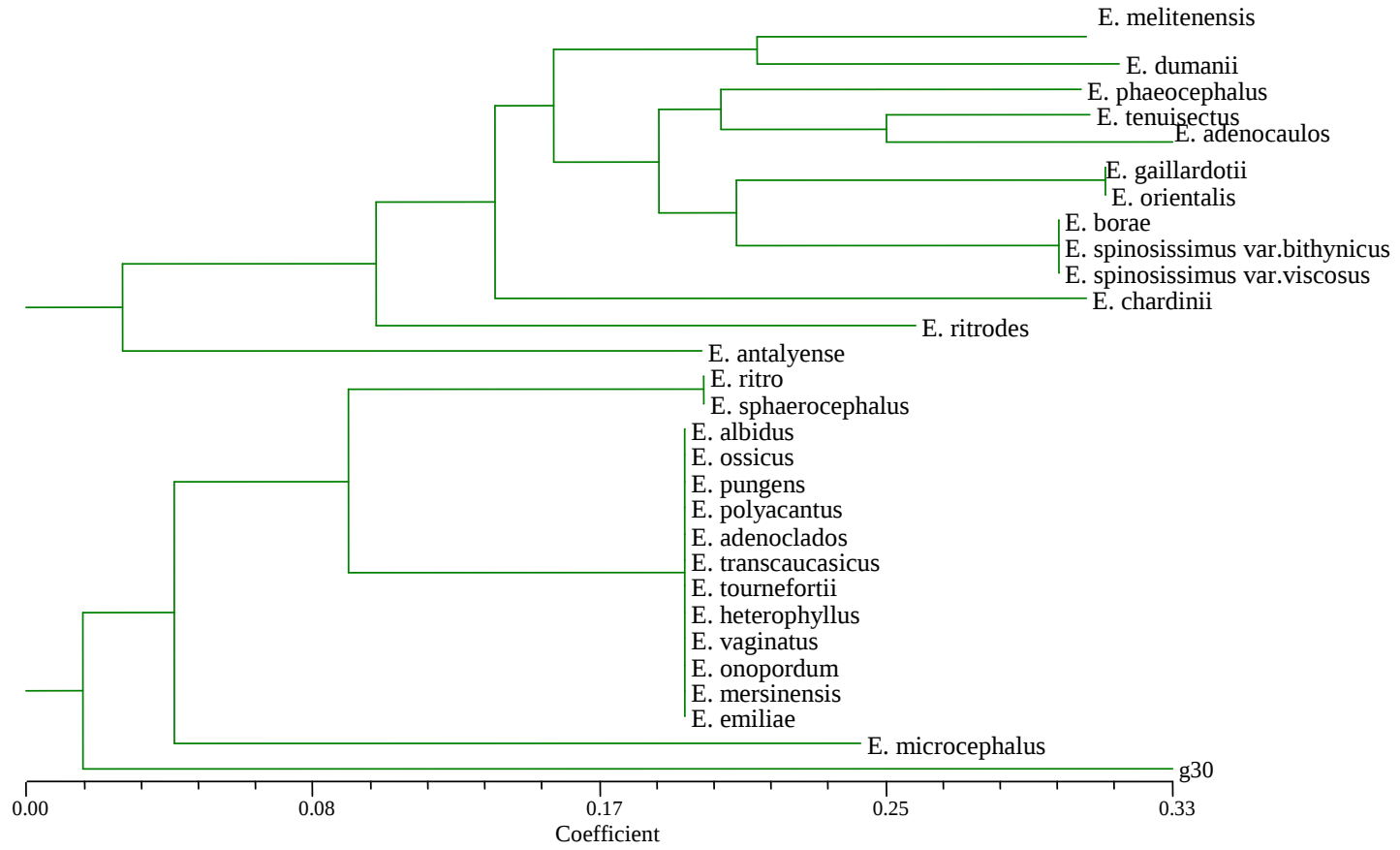
Şekil 4.9' nun devam



Şekil 4.10. cp3 UPGMA ağacı

	21	22	23	24	17	18	19	20	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	25	26	27	28	29	30		
21	1.00																														
22	0.96	1.00																													
23	0.86	0.86	1.00																												
24	0.96	0.93	0.86	1.00																											
17	0.89	0.93	0.86	0.86	1.00																										
18	0.93	0.96	0.86	0.89	0.96	1.00																									
19	0.93	0.96	0.86	0.89	0.96	1.00	1.00																								
20	0.93	0.96	0.86	0.89	0.96	1.00	1.00	1.00																							
1	0.81	0.77	0.84	0.81	0.77	0.77	0.77	0.77	1.00																						
2	0.74	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.90	1.00																					
3	0.81	0.77	0.84	0.81	0.77	0.77	0.77	0.77	1.00	0.90	1.00																				
4	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00																			
6	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00																		
7	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00																	
8	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00																
9	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00															
10	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00														
11	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00												
12	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00										
13	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00									
14	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00								
15	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00							
16	0.77	0.77	0.88	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.97	0.90	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00						
25	0.88	0.91	0.81	0.84	0.91	0.95	0.95	0.95	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	1.00		
26	0.89	0.93	0.86	0.86	1.00	0.96	0.96	0.96	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.91	1.00				
27	0.86	0.89	0.89	0.89	0.93	0.93	0.93	0.93	0.77	0.81	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.88	0.93	1.00		
28	0.93	0.96	0.86	0.89	0.93	0.96	0.96	0.96	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.91	0.93	0.89	1.00		
29	0.91	0.95	0.84	0.88	0.91	0.95	0.95	0.95	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.90	0.91	0.88	0.98	1.00	
30	0.68	0.68	0.75	0.68	0.68	0.68	0.68	0.68	0.80	0.77	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.73	0.68	0.68	0.68	0.67	1.00

Şekil 4.11. cp3 UPGMA matrisi



Şekil 4.12. cp3 NJ AĞACI

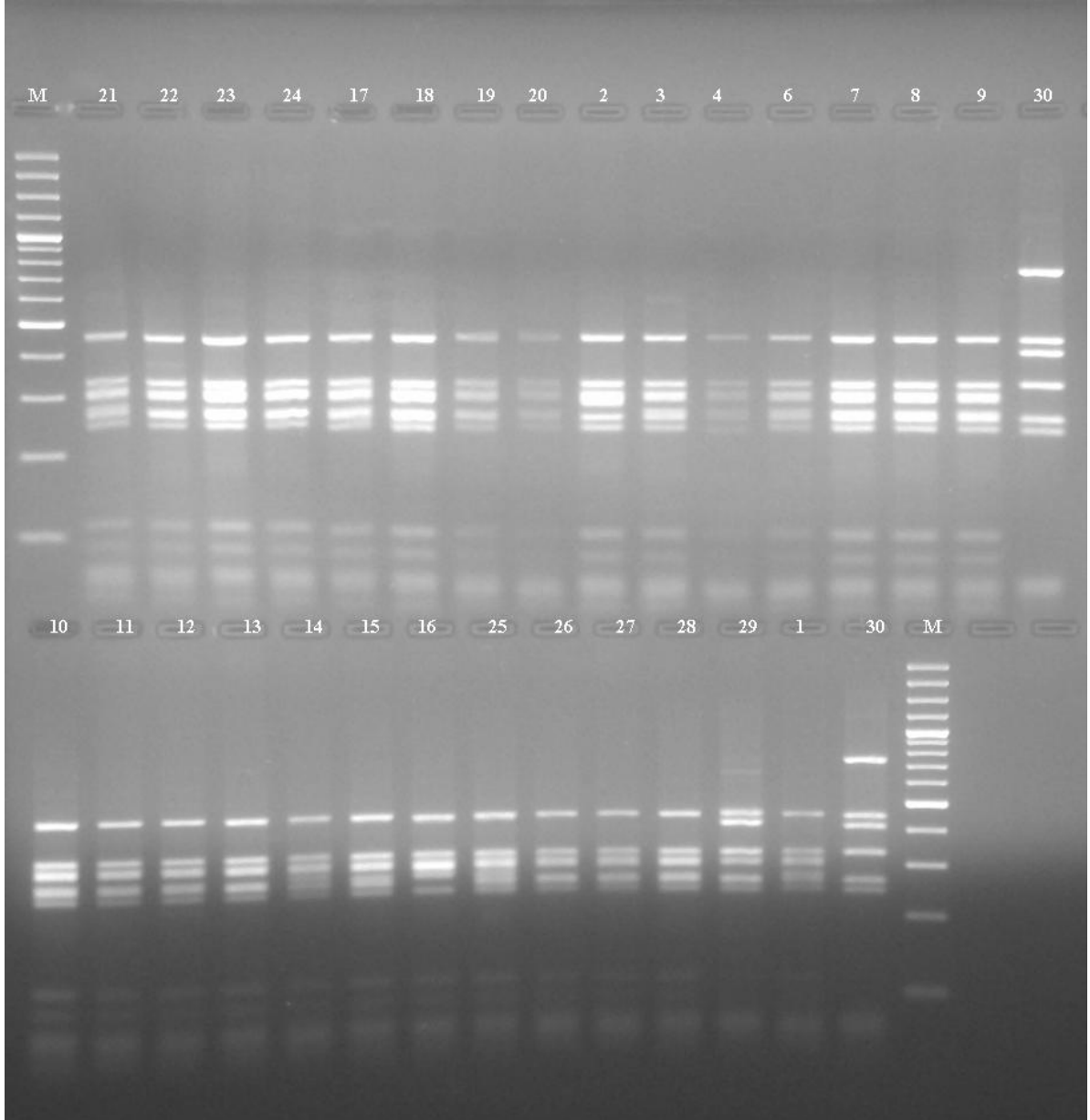
	21	22	23	24	17	18	19	20	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	25	26	27	28	29	30	
21																														
22	0.00																													
23	0.20	0.00																												
24	0.40	0.40	0.00																											
24	0.20	0.28	0.40	0.00																										
17	0.35	0.28	0.40	0.40	0.00																									
18	0.28	0.20	0.40	0.35	0.20	0.00																								
19	0.28	0.20	0.40	0.35	0.20	0.00	0.00																							
20	0.28	0.20	0.40	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00																						
1	0.47	0.51	0.42	0.47	0.51	0.51	0.51	0.51	0.00																					
2	0.55	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.35	0.00																				
3	0.47	0.51	0.42	0.47	0.51	0.51	0.51	0.51	0.00	0.35	0.00																			
4	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00																		
6	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00																	
7	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00																
8	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00															
9	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00														
10	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
11	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
12	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
13	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
14	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00									
15	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00								
16	0.51	0.51	0.37	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.20	0.35	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00							
25	0.37	0.32	0.47	0.42	0.32	0.24	0.24	0.24	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.00				
26	0.35	0.28	0.40	0.40	0.00	0.20	0.20	0.20	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.32	0.00			
27	0.40	0.35	0.35	0.35	0.28	0.28	0.28	0.28	0.51	0.47	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.37	0.28	0.00		
28	0.28	0.20	0.40	0.35	0.28	0.20	0.20	0.20	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.32	0.28	0.35	0.00	
29	0.32	0.24	0.42	0.37	0.32	0.24	0.24	0.24	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.35	0.32	0.37	0.14	0.00
30	0.62	0.62	0.55	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.49	0.53	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.57	0.62	0.62	0.62	0.63	0.00

Şekil 4.13. cp3 NJ MATRİKS

4.3.2. Cp 4F-Cp 4R RFLP Sonuçları

Mbo I Enzim Sonuçları

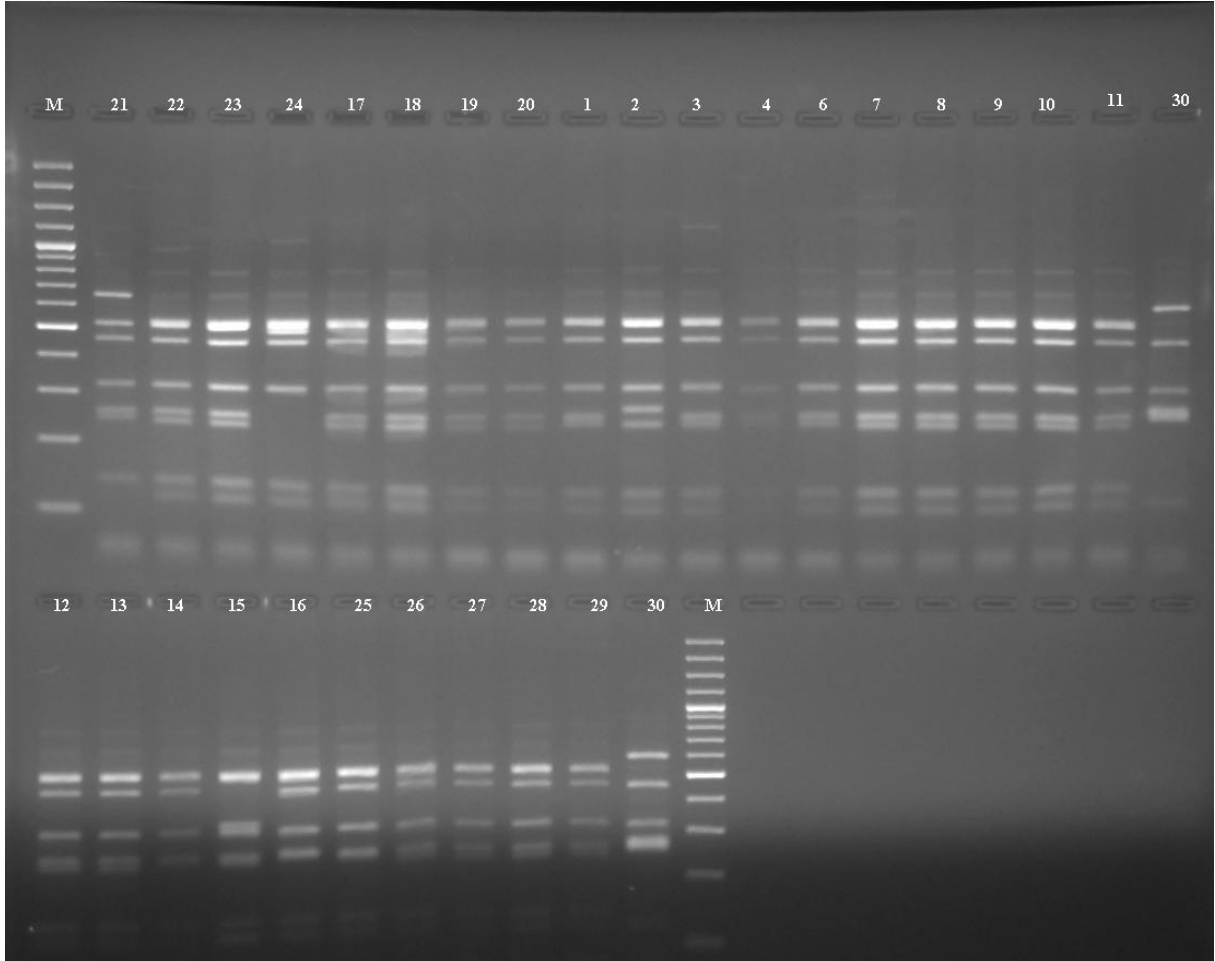
Cp 4F-Cp 4R ile Mbo I enzimi ile yapılan çalışmada 100-750 bç 10 bant elde edilmiştir. 7 adet polimorfik bant, 3 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 70 'dir.



Şekil 4.14. Cp 4F-Cp 4R ve Mbo I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili
M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci

ALU I Enzim Sonuçları

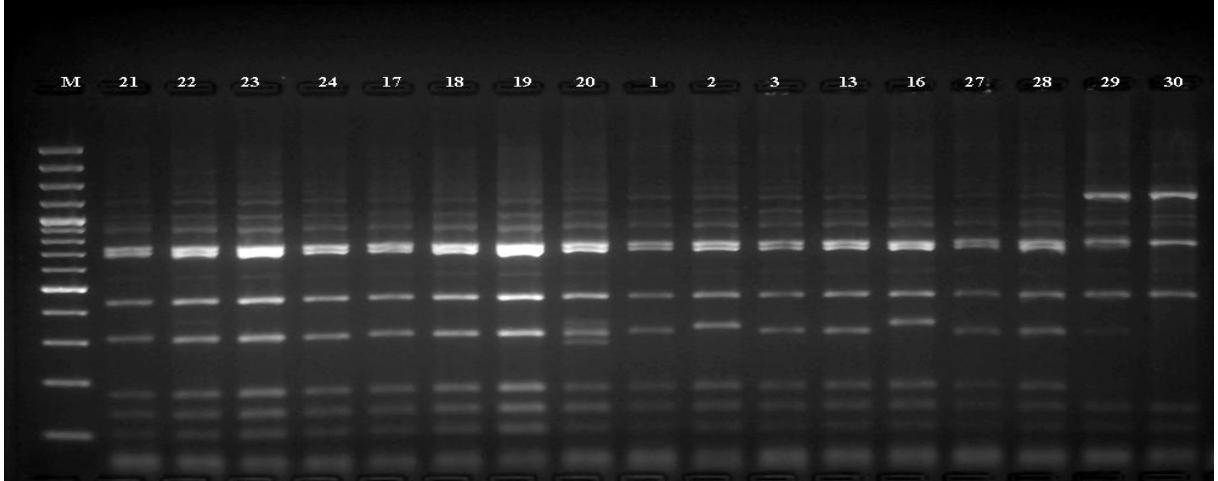
Cp 4F-Cp 4R ile Alu I enzimi ile yapılan çalışmada 120-680 bç 13 bant elde edilmiştir. 12 adet polimorfik bant, 1 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 92.3 ‘dir.



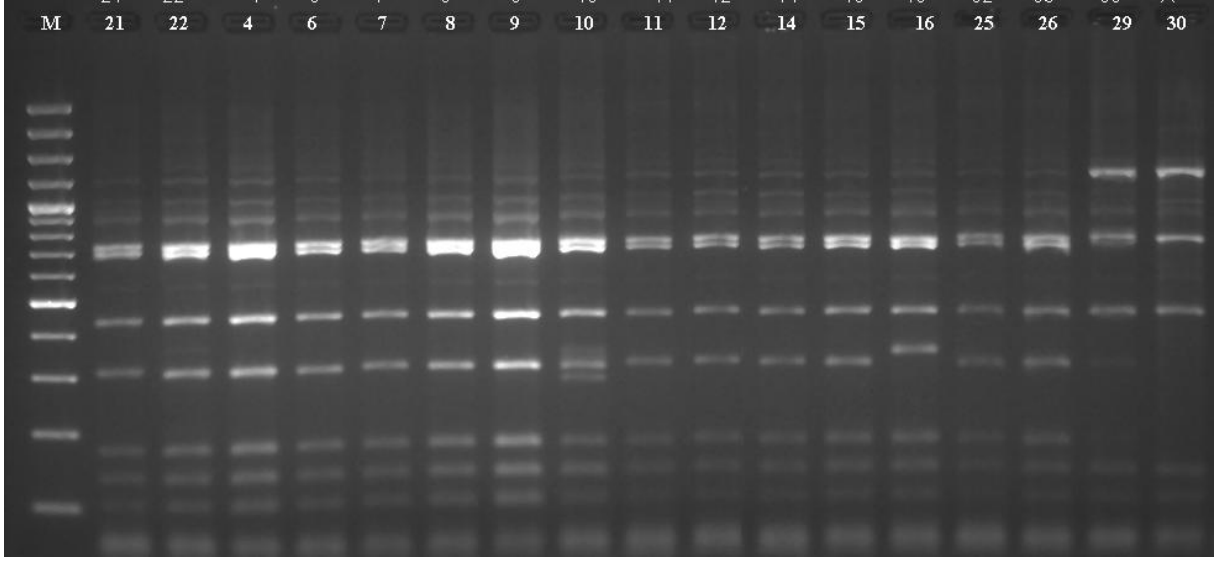
Şekil 4.15. Cp 4F-Cp 4R ve Alu I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili
M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci

Hin 1II (Nla1 II) Enzim Sonuçları

Cp 4F-Cp 4R ile Hin 1II (Nla1 II) enzimi ile yapılan çalışmada 100-770 bç 13 bant elde edilmiştir. 9 adet polimorfik bant, 4 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 69.2 'dir.



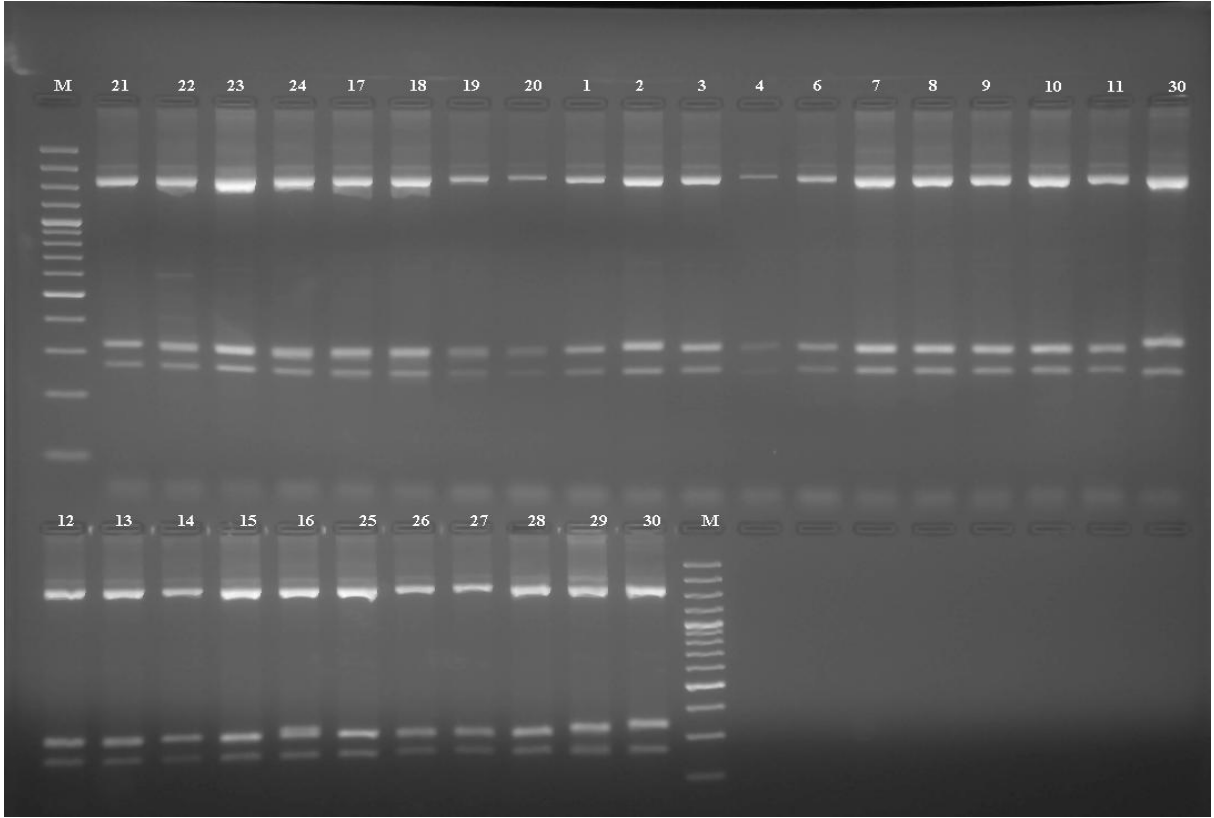
Şekil 4.16. Cp 4F-Cp 4R ve Hin 1II (Nla1 II) enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci



Şekil 4.16 devamı

BsuR I Enzim Sonuçları

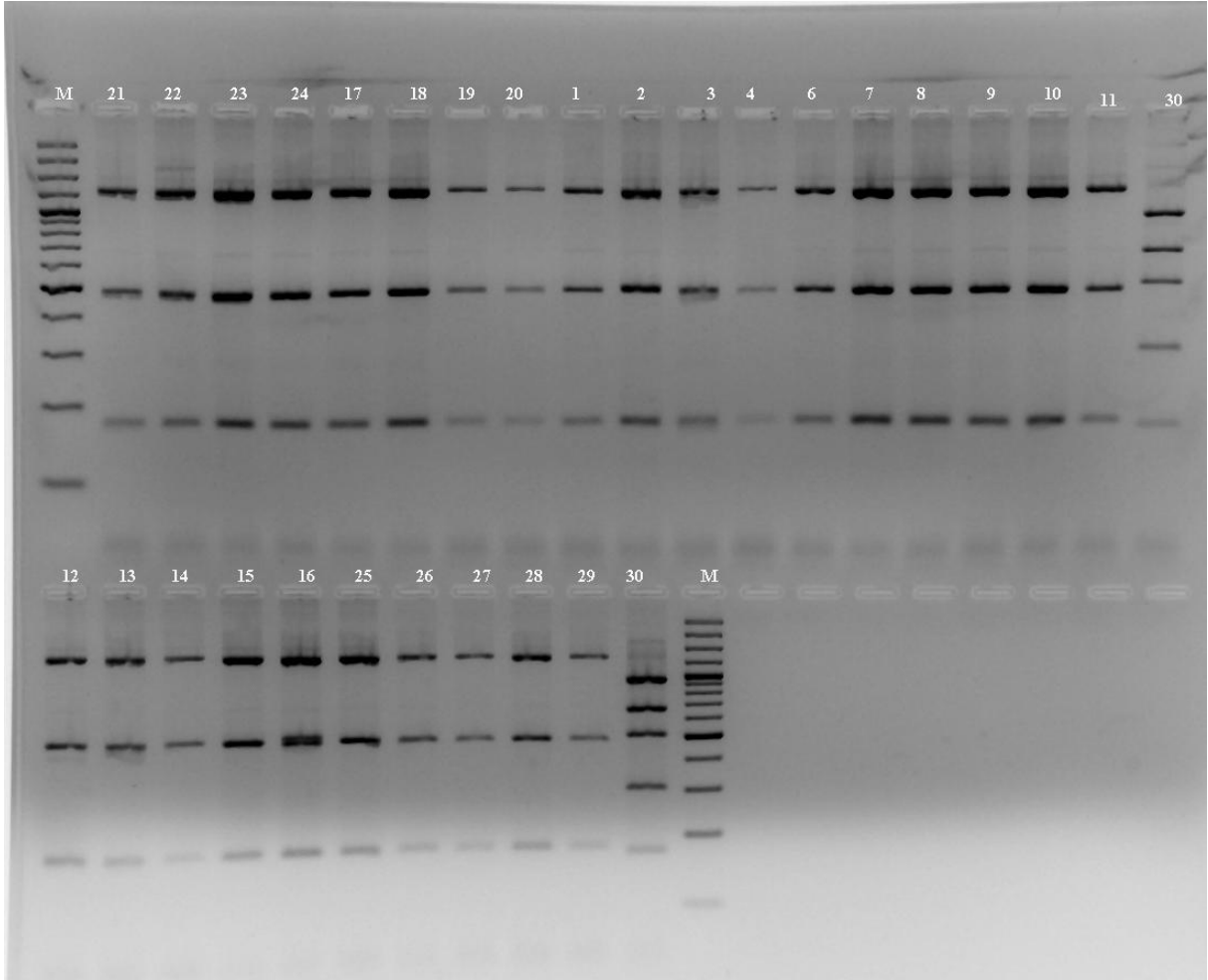
Cp 4F-Cp 4R ile BsuR I enzimi ile yapılan çalışmada 270-2100 bç 6 bant elde edilmiştir. 2 adet polimorfik bant, 4 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 33.3 'dir.



Şekil 4.17. Cp 4F-Cp 4R ve BsuR I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili
M:100-3000bp DNA moleküler ağırlık belirteci

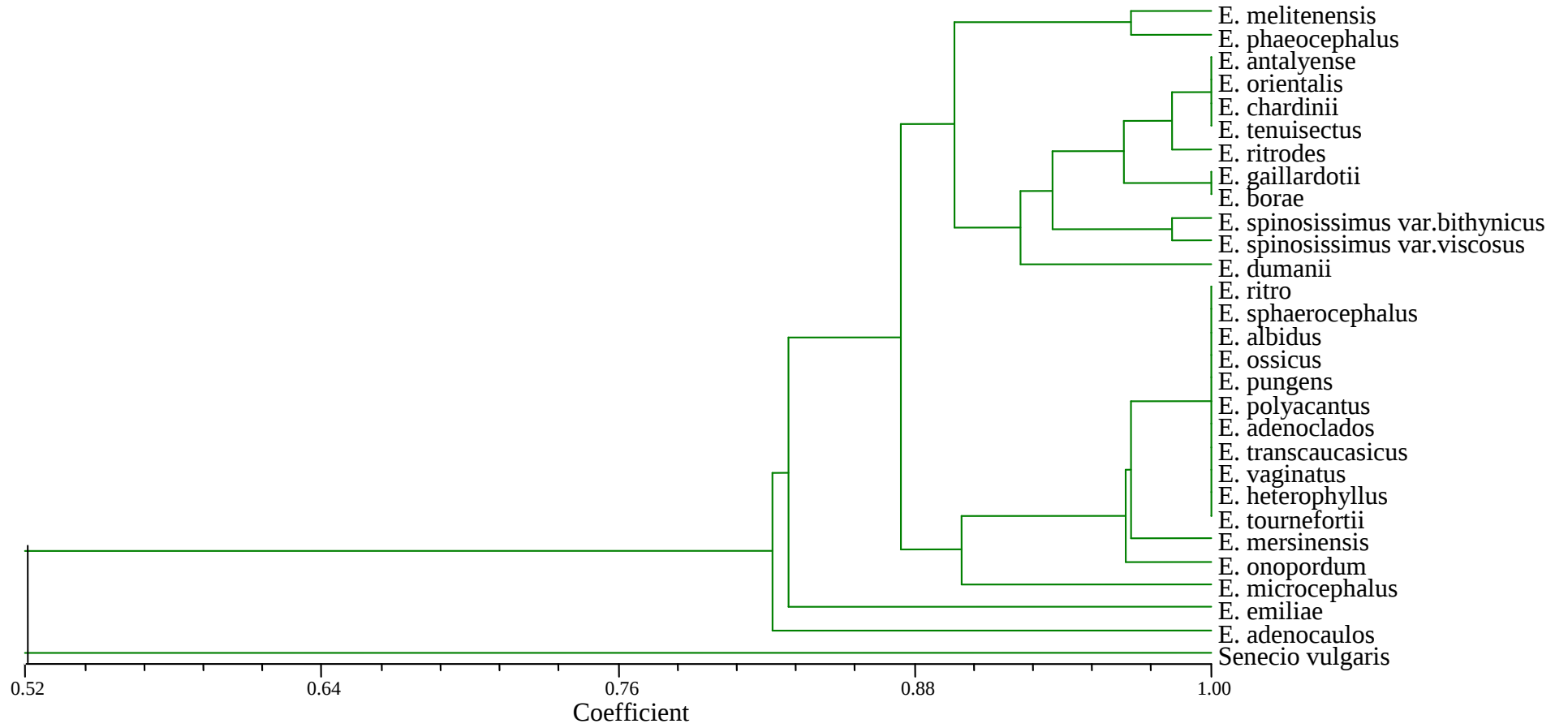
Rsa I enzimi Sonuçları

Cp 4F-Cp 4R ile Rsa I enzimi ile yapılan çalışmada 180-1700 bp 9 bant elde edilmiştir. 9 adet polimorfik bant, 0 adet monomorfik bant elde edilmiştir ve polimorizm oranı 100 'dir.



Şekil 4.18. Cp 4F-Cp 4R ve Rsa I enzimi yapılan çalışma sonucu elde edilen bant profili

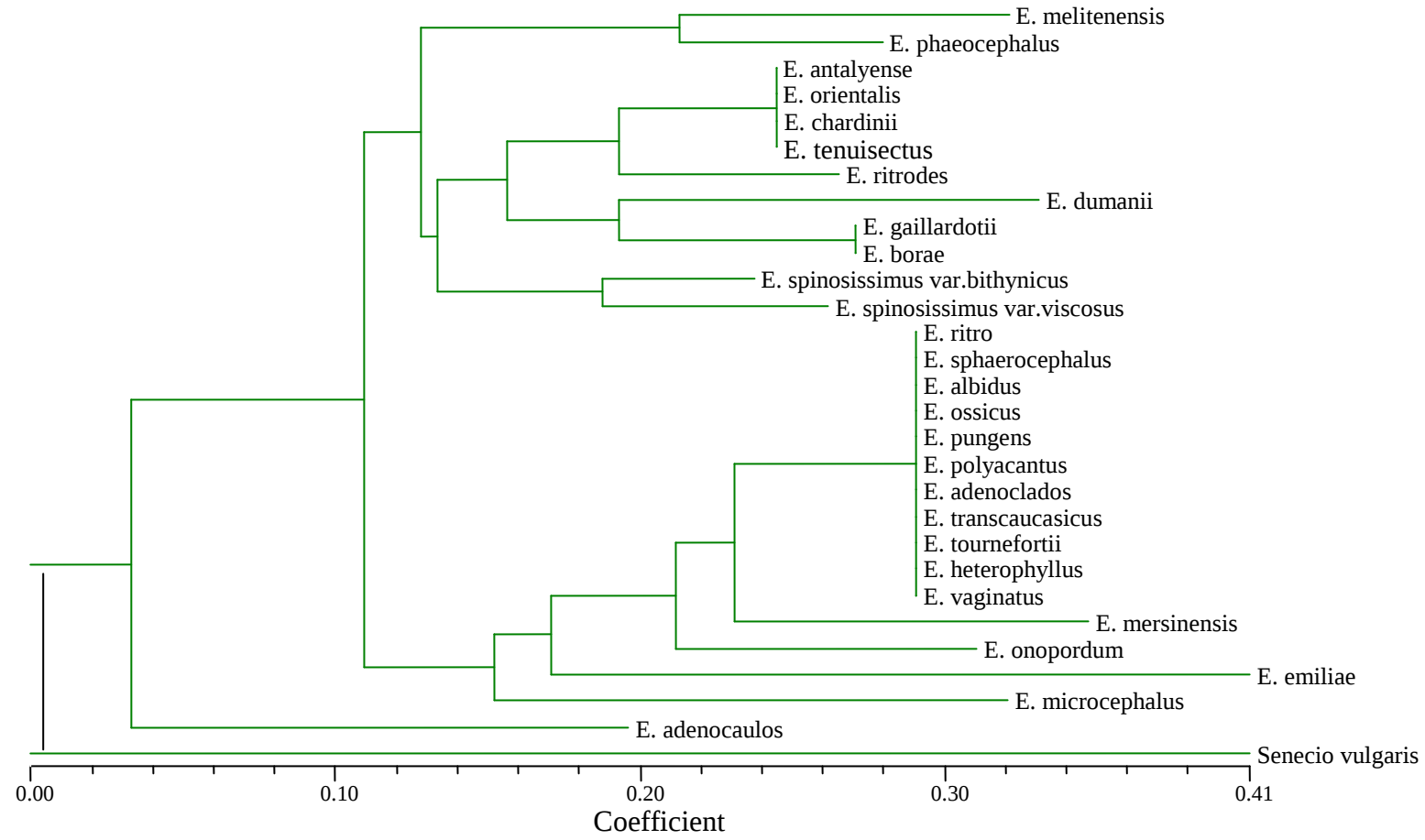
M:100-3000bç DNA moleküler ağırlık belirteci



Şekil 4.19.CP 4 UPGMA AĞACI

	21	22	23	24	17	18	19	20	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	25	26	27	28	29	30	
21	1.00																													
22	0.97	1.00																												
23	0.87	0.90	1.00																											
24	0.85	0.89	0.92	1.00																										
17	0.90	0.94	0.97	0.95	1.00																									
18	0.90	0.94	0.97	0.95	1.00	1.00																								
19	0.90	0.94	0.94	0.92	0.97	0.97	1.00																							
20	0.89	0.92	0.92	0.90	0.95	0.95	0.98	1.00																						
1	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00																					
2	0.81	0.84	0.84	0.82	0.84	0.84	0.87	0.86	0.90	1.00																				
3	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00																			
4	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00																		
6	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00																	
7	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00															
8	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00														
9	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00													
10	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00											
11	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00										
12	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00									
13	0.84	0.87	0.90	0.82	0.87	0.87	0.90	0.89	1.00	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00								
14	0.81	0.84	0.87	0.82	0.84	0.84	0.87	0.86	0.97	0.87	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	1.00						
15	0.81	0.84	0.87	0.79	0.84	0.84	0.87	0.86	0.97	0.87	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.94	1.00						
16	0.75	0.78	0.78	0.73	0.78	0.78	0.81	0.80	0.88	0.81	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.84	1.00						
25	0.86	0.89	0.98	0.90	0.95	0.95	0.92	0.91	0.89	0.83	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.86	0.80	1.00					
26	0.87	0.90	1.00	0.92	0.97	0.97	0.94	0.92	0.90	0.84	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.87	0.87	0.78	0.98	1.00				
27	0.87	0.90	1.00	0.92	0.97	0.97	0.94	0.92	0.90	0.84	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.87	0.87	0.78	0.98	1.00	1.00			
28	0.87	0.90	1.00	0.92	0.97	0.97	0.94	0.92	0.90	0.84	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.87	0.87	0.78	0.98	1.00	1.00	1.00		
29	0.81	0.84	0.87	0.82	0.87	0.87	0.84	0.83	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.77	0.77	0.72	0.86	0.87	0.87	0.87	1.00	
30	0.48	0.51	0.54	0.52	0.54	0.54	0.51	0.50	0.51	0.48	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.48	0.46	0.53	0.54	0.54	0.54	0.63	1.00

Şekil 4.20.CP 4 UPGMA MATRİKSİ



Şekil 4.21.CP 4 NJ AĞACI

	21	22	23	24	17	18	19	20	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	25	26	27	28	29	30		
21																															
22	0.18	0.00																													
23	0.36	0.31	0.00																												
24	0.38	0.33	0.28	0.00																											
17	0.31	0.25	0.18	0.22	0.00																										
18	0.31	0.25	0.18	0.22	0.00	0.00																									
19	0.31	0.25	0.25	0.28	0.18	0.18	0.00																								
20	0.33	0.28	0.28	0.31	0.22	0.22	0.13	0.00																							
1	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00																						
2	0.44	0.40	0.40	0.42	0.40	0.40	0.36	0.38	0.31	0.00																					
3	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00																				
4	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00																			
6	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00																		
7	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00																	
8	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00																
9	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00															
10	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00														
11	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
12	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
13	0.40	0.36	0.31	0.42	0.36	0.36	0.31	0.33	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
14	0.44	0.40	0.36	0.42	0.40	0.40	0.36	0.38	0.18	0.36	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.00									
15	0.44	0.40	0.36	0.45	0.40	0.40	0.36	0.38	0.18	0.36	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.25	0.00								
16	0.50	0.47	0.47	0.52	0.47	0.47	0.44	0.45	0.36	0.44	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.40	0.00							
25	0.38	0.33	0.13	0.31	0.22	0.22	0.28	0.31	0.33	0.42	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.38	0.45	0.00						
26	0.36	0.31	0.00	0.28	0.18	0.18	0.25	0.28	0.31	0.40	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.36	0.36	0.47	0.13	0.00					
27	0.36	0.31	0.00	0.28	0.18	0.18	0.25	0.28	0.31	0.40	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.36	0.36	0.47	0.13	0.00	0.00				
28	0.36	0.31	0.00	0.28	0.18	0.18	0.25	0.28	0.31	0.40	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.36	0.36	0.47	0.13	0.00	0.00	0.00			
29	0.44	0.40	0.36	0.42	0.36	0.36	0.40	0.42	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.47	0.47	0.53	0.38	0.36	0.36	0.36	0.00		
30	0.72	0.70	0.68	0.69	0.68	0.68	0.70	0.71	0.70	0.72	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.72	0.75	0.69	0.68	0.68	0.68	0.60	0.00		

Şekil 4.22.CP 4 NJ MATRİKS

5.BÖLÜM

SONUÇ VE TARTIŞMA

Türkiye Florasından *Echinops* L. cinsi üyelerine ait sınıflandırma 1975 yılında Hedge tarafından morfolojik özelliklere dayandırılarak düzenlenmiştir [3]. 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 [3]. Bahsedilen problemlerin aydınlatılabilmesi için *Echinops* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren üç seksiyonuna ait taksonların filogenetik ilişkilerinin moleküler tekniklerle belirlenmiştir.

Bitkilerin evrimi ve sınıflandırılması çalışmalarında moleküler yöntemler, son yıllarda önemli bir araç olarak kullanılmaya başlanmıştır [21]. Kloroplast DNA (cpDNA), populasyonlar ve türler arasındaki evrimsel ilişkilerin anlaşılmasında etkili bir metod olarak kullanılmaktadır[22].

Wallender ve Albert [23], 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. [24], 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. [25], *Echinops* ve *Acantholepis* cinsinin filogenetiğinin belirlenmesinde 30 *Echinops* ve *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.

Türkiye *Echinops* cinsi ile ilgili daha önce yapılmış moleküler temelli bir çalışma tespit edilememiş olması ve ülkemizde yayılış gösteren türlerin dışındaki *Echinops* cinsi

taksonlarını konu eden çalışmaların da sayısının çok az olması bu çalışmanın önemini arttırmaktadır. Çalışmamızda kullanılan örneklerin cpDNA' sının *rps16* genin 800 dizi analizi yapıldı. Verilerin bir araya getirilmesiyle elde edilen DNA veri setinde *rps16* geninin Kimura 2-Parametre baz değişim modeline göre de değerlendirilmesiyle elde edilen örnekler arası genetik uzaklık değerleri 0,0358-0,0013 arasında tespit edildi (Tablo 4.2).

Çalışmamızda Dizi analizi sonuçlarına göre oluşturulan Neighbor Joining (NJ) ağacı (Şekil 4.3) incelendiğinde oluşan soy hatlarının mevcut seksiyon ayrımını tam olarak desteklemediği görülmektedir. Farklı cinse ait *Senecio vulgaris* değerlendirme dışı bırakılırsa 5 ana grup oluştuğu 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.

Garnetje ve ark. tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çalışmalarda *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 [25],.

Yine aynı çalışmada Garnetje ve ark. [25],*E. bithynicus*, *E. spinosissimus* subsp. *spinosissimus* ve *E. viscosus* 90%, bootstrap değeri ile *Ritropsis* (*Ritrodes*) 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.

Çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda; İkinci soy hattı incelendiğinde *E. pungens* var. *pungens* 'in evrimsel olarak farklılaşmış olduğu, *E. pungens* var. *polyacanthus* ve *E. pungens* var. *transcausicus* 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. *transcausicus* '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. transcausicus* olarak üç ayrı tür şeklinde değerlendirilmiştir.

Üçüncü soy hattında evrimsel olarak önce farklılaşmış taksonun *E. spinosissimua* subps. *spinosissimus* olduğu, *E. orientalis* ve *E. spinosissimus* subps. *bithnicus* 'un daha yakın akraba oldukları bulunmuştur. Bu durumda *E. spinosissimus* 'un alt türlerinden *E. spinosissimus* subps. *bithynicus* 'un *E. orientalis* 'e *E. spinosissimus* subps. *spinosissimus* dan daha yakın olması bu taksonların aslında birer alttür değilde ayrı birer tür olarak değerlendirmeyi akla getirmektedir. Ayrıca *E. spinosissimus* 'un alttürleri morfolojik olarak ta içindeki fillarilerin gevşek bağlanması ile *E. orientalis* ile yakınlık göstermektedir. *E. spinosissimus* 'un iki alttürü

gövdenin lanat olup olmaması ve glandular tüyün seyrek ya da yoğun olması ile de birbirlerinden morfolojik farklılıklar göstermektedir. Bu konuda benzer bulgular Vural ve Dadandı [1] tarafından yapılan çalışmada da vurgulanmış ve bu iki alttür *E. viscosus* ve *E. bithynicus* olarak iki ayrı tür şeklinde değerlendirilmiştir. Moleküler tekniklere dayanan çalışmamızın bulguları bu konuda Vural ve dadandı'nın morfolojik verilerle ortaya koydukları sonuçlarla uyum göstermekte ve adı geçen iki alttürün Uluslar arası botanik adlandırma kuralları göz önüne alındığında, *E. viscosus* ve *E. bithynicus* adlarıyla tür seviyesinde değerlendirilmesi gerektiği fikrini desteklemektedir. Bu grupta yer alan ve çalışmaya yeni tür olabilecekleri şüphesi ile dahil edilen iki popülasyonun da *E. bora* ve *E. antalyense* adıyla yeni türler olarak değerlendirilebileceği görülmüştür.

Sanchez ve ark. [26], *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. Daha dar

kapsamlı olduğundan üç seksiyonun Ülkemizde yayılış gösteren taksonlarını konu alan çalışmamızda elde edilen filogenetik ağaçta birinci soy hattı *Ritrodes* seksiyonuna ait türleri içermektedir. Diğer 3 soy hattından son ikisi ise *Oligolepis*, *Echinops* seksiyonuna ait türlerden oluşmaktadır. Hedge'nin de kabul ettiği, Morfolojik olarak involukrum braktelerinin sayısına göre yapılan seksiyon ayrımı çalışmamızdaki filogenetik ağaç ile örtüşmektedir.

Dört ve beşinci soy hattında *Oligolepis* seksiyonunu oluşturan *E. melitenensis* ve *E. phaeocephalus*'un *Echinops* seksiyonundan taksonlarla 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 olamasıyla da *E. melitenensis*'e morfolojik olarak benzerlik göstermektedir. Özellikle *Echinops* seksiyonunun yeniden ele alınması yeni seksiyonlara bölünmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen filogenetik ağaçta oluşan ana kollar daha önce cinsin morfolojisine göre yapılmış olan seksiyon ayrımlarını tamamen desteklemese de özellikle *Oligolepis* ve *Ritrodes* seksiyonlarına ait taksonların beraberce gruplandıkları görülmüştür. *Echinops* cinsinin ülkemizde yayılış gösteren üç seksiyonuna ait taksonları içeren çalışmamızın sonuçları, cinsin ülkemiz için yukarıda değinilen bazı taksonomik problemlerine çözüm getirmiştir. Cinsin doğal sınıflandırmasını ve genetik çeşitliliğini tam olarak ortaya koyabilmek içinse, ülkemizdeki ve Dünya genelinde yayılış gösteren tüm taksonların populasyon içi varyasyonlarını da gösterecek şekilde çalışılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jager, 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. 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.
4. 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.
5. 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).
6. Pejic, I. et al., Comparative Analysis of Genetic Similarity Among Maize Inbred Lines Detected by RFLPs, RAPDs, AFLPs, Theor Appl. Genet., 97, 1248-1255, 1998
7. Seçmen, Ö., ve ark., Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 2004.
8. Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Bitki Biyoteknolojisi II: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, s.354, Selçuk Üniversitesi, Konya, 2004.
9. Breting, P.K., Widrlechner, M.P., Genetik Markers and Horticulatural Germplasm Management, Hortscience, 30(7), 1329-1356, 1995.
10. Sax, K., The Association of Size Differences With Seed-Coat Pattern And Pigmentation In *Phaseolus Vulgaris*, Genetics, 8: 552-560, 1923.

11. Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Wieland, M., DNA Fingerprinting in Plants and Fungi, CRC Press, s. 12-13, 1995.
12. Wolf, A.N.D., Liston, A., Contributions of PCR Based Methods to Plant Systematics Ann Evolutionary Biology. Soltis, P.S., Solitis D.E., Doyle, J.J., Molecular Systematics of Plants II. Chopman and Hall, New York, 33-86, 1998.
13. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W., 1980.
Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genet. 32:314-331.
14. Bardakci, F., Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers, Turk. J. Biol., 25: 185-196, 2001.
15. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification, Genomics, 20: 176-183, 1994.
16. Paran, I., Michelmore, R.W., Development of Reliable PCR-Based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettance, The Aretical and Applied Genetics, 85, 985-993, 1993.
17. Taberlet P, Gielly L, Pautou G and Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol Biol 17:1105-1109.
18. Wolfe KH, Li WH and Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. Proc Natl Acad Sci USA 84:9054-9058.

19. Or, Melis., Kloroplast Genomundaki Kodlanmayan “*trn*” Bölgelerinin Karşılaştırılması Yapılarak *Liquidambar orientalis* Mill. Varyetelerinin Filogenetik Aanalizi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2007.
20. Özdilek, Aslı., Kloroplast Genomundaki *matK* Gen Bölgesine Göre *Liquidambar orientalis* Mill. Varyetelerinin Genetik Farklılaşması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2007.
21. 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 systematics of plants, Chapman Hall, New York, 1992.
22. 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.
23. 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.
24. Oxelman, B., Liden, M., Berglund, D., Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae), *Plant Syst. Evol.*, 206: 393–410, 1997.
25. 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.
26. 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.