T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

TÜRKİYE'DE YETİŞEN ENDEMİK *SCALIGERIA LAZICA* BOISS. VE *S. CAPILLIFOLIA* POST TÜRLERİ ÜZERİNDE TAKSONOMİK VE KİMYASAL ARAŞTIRMALAR

Proje No:4557
Öncelikli Alan Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü
Yrd. Doç. Dr. Ayşe BALDEMİR
Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü

Araştırmacılar
Prof. Dr. Salih KAFKAS
Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü
Arş. Gör. Selen İLGÜN
Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü
Yrd. Doç. Dr. Mehmet YAVUZ PAKSOY
Tunceli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü
Prof. Dr. Maksut COŞKUN
Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü
Prof. Dr. Betül DEMİRCİ
Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü

Mart 2017
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Araştırma Fonu (Proje No: TOA-2014-4557) tarafından mali olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	5
2. GENEL BİLGİLER	7
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	12
3.1. Bitki materyallerinin toplanması / Arazi Çalışmaları	12
3.2. Moleküler Çalışmalar	14
3.3. Morfolojik Çalışmalar	18
3.4. Anatomik Çalışmalar	19
3.5. Uçucu Yağ analizleri	19
3.6. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	20
4. BULGULAR	20
4.1. Moleküler çalışma sonuçları	20
4.2. Morfolojik çalışma sonuçları	26
4.3. Anatomik çalışma sonuçları	36
4.4. Uçucu Yağ analiz sonuçları	38
4.5. Antimikrobiyal aktivite sonuçları	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR	49

Türkiye'de Yetişen Endemik *Scaligeria lazica* Boiss. ve *S. capillifolia* Post Türleri Üzerinde Taksonomik ve Kimyasal Araştırmalar

ÖZET

Scaligeria lazica Boiss. ve *S. capillifolia* Post türleri Apiaceae familyasında yer alan tıbbi, aromatik ve endemik bitkilerdendir. *Scaligeria*'nın ülkemizde 7 türü doğal olarak yetişmektedir. *Scaligeria* cinsi taksonomik olarak problemlidir ve hem dünyada hem de ülkemizde hemen hemen hiç araştırılmamış bir cinstir. Oysa ki bu cins hem halk arasında hem de modern tıpta kullanımı olan Apiaceae familyasına dahildir. Bu nedenle cinsin çalışılmamış olması bilimsel bir eksiklik olarak görülmüştür. Ayrıca *Scaligeria* türleri taksonomik olarak problemli türlerdir ve daha önce yapılan çalışmalarda özellikle *S. lazica*'nın bazı fitokimyasal markörler bakımından *Pimpinella* L. cinsine yakın olduğu tespit edilmiştir. Buradan yola çıkılarak bu projede çalışmasında *Scaligeria* cinsinde ilk kez SSR primerleri geliştirilmiş ve ayrıca SSR primer geliştirmede ilk defa yeni nesil sekanslama teknolojisini kullanılmıştır. Böylece bundan sonra *Scaligeria*'nın diğer taksonları ile yapılacak moleküler çalışmalar ile ilgili genetik bilgi alt yapısı oluşturulmuştur. Çalışmamızın diğer hedefleri arasında yer alan türlerin uçucu yağlarının Gaz kromatografisi (GC) ve Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GC/MS) ile kimyasal analizleri yapılmış ve kemotaksonomik açıdan ilginç bulgular elde edilmiştir. Ayrıca uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri bazı patojenik Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*), Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*) ve mayalara (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*) karşı mikrodilüsyon metodu ile test edilmiştir. Standart antimikrobiyal ajanlar ile kıyaslandığında orta derecede bir aktivite tespit edilmiştir.

SSR (Simple sequence repeat) markörleri DNA parmak izi çalışmalarında kullanılır ancak bu markörlerin kullanımında sekans bilgisine ihtiyaç duyulur. Bu çalışmanın amacı da, yeni nesil sekanslama kullanılarak yeni SSR markörleri geliştirmek ve geliştirilen markörler kullanılarak genetik çeşitliliği belirlemektir. Bu çalışmada, toplam 15.17G. Illumina datası elde edilmiş ve *S. lazica*'da di-nükleotit tekrarlar çok sayıda bulunmuştur. 150 adet primer çifti test edilmiş ve bunlardan 139 tanesi amplifiye olurken, 84 tanesi polimorfik bulunmuştur. 40 adet SSR lokusu, 4 farklı lokasyondan toplanan 40 adet *S. lazica* genotipinde genetik çeşitlilik analizinde kullanılmıştır. Toplam 264 adet allel elde edilmiştir. Her bir lokus için ortalama allel sayısı 6.6 olarak bulunmuştur. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) 0.60, gözlenen heterozigotluk (Ho) 0.47, beklenen heterozigotluk (He) 0.60 bulunmuştur. Elde edilen bilgiler

kullanılarak kümeleme ve yapı analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada geliştirilen SSR markörleri diğer *Scaligeria* türlerinde de test edilebilir ve genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılabilir. Bu çalışmaların yanısıra iki *Scaligeria* türünün anatomik (yaprak ve gövde anatomisi) ve morfolojik (detaylı stereromikroskop görüntüleri ve çizimleri) özellikleri ayrıntılı olarak araştırılarak Türkiye Florası'nda bu türler ile ilgili belirtilen morfolojik bilgilerle kıyaslanarak detaylandırılmıştır. Ayrıca proje çalışma paketlerinde yer almayan polen analizleri de morfolojik çalışmalara dahil edilmiştir.

Sonuç olarak, bu proje çalışması ile *Scaligeria* türleri için ilk kez moleküler bir çalışma temeli atılarak Apiaceae ailesinin filogenisine katkıda bulunulmuştur. Ayrıca bu türler kemotaksonomik açıdan da değerlendirilmiş olup literatür ile kıyaslandığında özellikle *S. lazica* türü için bu cinsten ayrılabileceği sonucuna varılmıştır. Anatomik ve morfolojik çalışmalarda bulguları destekler niteliktedir.

Anahtar kelimeler: *Scaligeria*, Morfoloji, Anatomi, Moleküler filogeni, Taksonomi, Uçucu yağ, Antimikrobiyal aktivite, Türkiye.

Taxonomic and Chemical Investigations on Endemic *Scaligeria lazica* Boiss. ve *S. capillifolia* Post Growing in Turkey

ABSTRACT

Scaligeria lazica Boiss. and *S. capillifolia* Post species are medical, aromatic and endemic plants in the Apiaceae family. 7 species of *Scaligeria* are naturally grown in our country. The *Scaligeria* DC.genus has a taxonomic problem that has been seldom researched both in the world and in our country. However, this genus belongs to the family of Apiaceae, which is both popular and modern envy. For this reason, the lack of study of the sex has been seen as a scientific deficiency. In addition, *Scaligeria* species are taxonomically problematic species and in previous studies it was found that *S. lazica* is close to *Pimpinella* L. in terms of some phytochemical markers. In this project, SSR primers were developed for the first time in *Scaligeria* and new generation sequencing technology was used for the first time to develop SSR primer. Thus, the genetic information infrastructure related to the molecular studies to be carried out with other taxa of *Scaligeria* has been established. Chemical analyzes of volatile oils of species which are among the other targets of our study were carried out by Gas Chromatography (GC) and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC / MS), and interesting findings in chemotaxonomical terms were obtained. In addition, antimicrobial activities of essential oils were tested by microdilution method against some pathogenic Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*), Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa*) and yeast (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*). Intermediate activity was detected when compared with standard antibiotic agents. The Apiaceae family includes a few agronomic and medicinal species, which *Scaligeria lazica* Boiss. is one of them.

Simple sequence repeat (SSR) markers are useful tools for DNA fingerprinting, however, they need sequence information prior to analysis. Therefore, we aimed to develop novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) and to use them for genetic diversity. A total of 15.17G clean Illumina data was obtained, and di-nucleotide repeats were the most abundant repeats in *S. lazica*. Of tested 150 SSR primer pairs, 139 had amplification and 84 were polymorphic. Forty polymorphic SSR loci were used in genetic diversity analysis of 40 *S. lazica* accessions from four locations. A total of 264 alleles were amplified with an average of 6.6 alleles per locus. Polymorphism information content (PIC) was 0.60, while observed (Ho) and expected heterozygosity (He) values were 0.47 and 0.66,

respectively. According to cluster and structure analysis, all accessions were grouped into four different clusters according to their collection sites. The SSR markers developed in this study can be tested for the other *Scaligeria* species due to its high transferability, and they can be used for genetic studies in the genus *Scaligeria.* In addition to these studies, the anatomical (leaf and trunk anatomy) and morphological (detailed stereromicroscope images and drawings) features of two *Scaligeria* species have been investigated in detail and in comparison with the Flora of Turkey in terms of the morphological information related to these species. Also, pollen analyzes not included in the project work packages were included in the morphological studies.

As a result, this project study contributed to the phylogeny of the Apiaceae family, with a molecular basis for the first time for *Scaligeria* species. In addition, these species were also evaluated chemotaxonomically and compared to the literature, it was concluded that *S. lazica* could be separated from this genus. It supports in anatomical and morphological findings.

Keywords: *Scaligeria*, Morphology, Anatomy, Molecular phylogeny, Taxonomy, Essential oil, Antimicrobial activity, Turkey.

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Çiçekli bitkilerin en iyi bilinen ailesinden Apiaceae Lindl. (Umbelliferae) 300-455 cins içerisinde 3,000-3,750 tür bulunur. Bu ailenin üyeleri gıda sektörü (sebzeler, çeşniler) ve tıpta kullanılmalarından dolayı çok fazla ekonomik öneme sahiptirler (Downie et al., 2000a; Downie et al., 2000b). Apiaceae ailesine ait *Scaligeria* DC. cinsi Türkiye'de 2'si endemik olmak üzere 7 tür ile temsil edilir (Stevens, 1972; Güner, 2012). Türkiye'de doğal olarak yetişen *Scaligeria* türleri; *S. napiformis* Willd. Grande; *S. tripartita* (Kalen.) Schischkin, *S. lazica* Boiss. (endemic), *S. meifolia* (Fenzl) Boiss., *S. glaucescens* (DC.) Boiss., *S. hermonis* Post, *S. capillifolia* Post. (endemik). *S. lazica.* Bu türlerden *S. lazica trans*-anethol (1-metoksil-4-(1-propenil) benzen) sahip olmasından dolayı karakteristiktir ve Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nde "Laz anason"; *S. capillifolia* ise "kıl anason" olarak bilinir (Güner, 2012, Başer et al., 1995). *Trans*-anetol ekonomik öneme sahip bir bileşiktir ve yiyecek ve likör endüstrisinde büyük oranda kullanılır (Castro et al. 2010). Ayrıca anetol östrojenik etki gösterir ve romatizma ve bel ağrılarında kullanılır (Tabanca et al., 2004; Peng et al., 2016).

Scaligeria türlerinin genel botanik özellikleri; rizom, yumru veya fusiform yapıda kökleri ile yıllık, iki yıllık veya çok yıllık yetişebilen bitkilerdir. Bazal yapraklar ayrılmamış veya 1-4-ternat-pinnat veya 2-4 pinnat şeklindedir. Çiçekleri hermafrodittir. Sepaller körelmiş, petaller beyaz renktedir. Şizokarp meyve şekli küresel ve pürüzsüzdür. Bazal ve alt sap yaprakları şemsiye şeklindeki izlerin sayısı *Scaligeria* türleri arasında sistematik farklılıkları belirlemede önemli morfolojik özelliklerdir. Türkiye Florası'nın *S. lazica* tanımlamasına göre Karadeniz Bölgesi'nde Rize ilinden toplanan örneklerde bazal yapraklar genellikle üçlü şekilde nadiren ayrılmamış, şemsiye şeklindeki izlerin sayısı 9-15 olduğu gözlenmiştir (Stevens, 1972; Güner, 2012).

SSR markörleri, yüksek polimorfizm göstermesi ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması açısından çok kullanışlı bir markör sistemidir. Apiaceae familyasının SSR moleküler markörlerin potansiyel kullanımı yapılan farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Apiaceae familyasında yeni SSR markörleri geliştirilmiştir ve bu markörler genetik çeşitlilik, filogenetik ilişkiler ve karakterizasyonda kullanılmıştır. (Cavagnaro et al. 2011; Rakotondralambo et al., 2012; Sahu et al., 2015; Fu et al. 2014; Rijal et al., 2015).

Yeni nesil sekanslama teknolojisi ile daha düşük maliyetle daha çok sekans elde edilmektedir. Bitkilerde düşük maliyetle daha fazla tekrara sahip mikrosatellit lokuslara sahip olmak mümkündür (Shendure and Ji, 2008; Ekblom and Galindo, 2011). Bitkilerde yaygin

olarak kullanilan SSR markörleri, yüksek oranda tekrarlanabilir ve yakin akraba türler arasinda transfer edilebilir ve bitki türleri arasinda genomik kaynak olarak göze çarparlar. (Jewel et al., 2010; Jones et al., 2010; Moe and Weiblen, 2011; Zalapa et al., 2012). SSR markörlerinin önemli bir özelliğide bir lokusta birden fazla allel elde edilebilmesidir. Bu çeşitlilik SSR markörlerinin yüksek polimorfizmine sahip olduğunu ve genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılabilirliğini göstermektedir. (Zalapa et al., 2012; Hamblin et al., 2007).

Literatür taramaları sonuçlarına göre *S. lazica* ve *S. capillifolia* türlerinde daha önce bugüne kadar SSR geliştirme ve genetik çeşitlilik çalışmaları yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı; yeni nesil sekanslama teknolojisi kullanarak yeni SSR markörleri geliştirmek ve *S.lazica'*nın popülasyon yapısının çalışılması ve diğer *Scaligeria* türlerinin moleküler alt yapısının oluşturulması idi. Bu çalışmadan elde edilen SSR markörleri yüksek transfer edilebilirliğinden dolayı farklı genetik çalışmalarda diğer *Scaligeria* türlerinde de kullanılabilecektir. Özellikle bu iki endemik türden *S. lazica*'nın önceki çalışmalara göre *Pimpinella* cinsine yakın bulunması bu türün genetik alt yapısının ortaya konmasını gerekli hale getirmiştir. Zaten oluşan genetik alt yapı ile genel olarak *Scaligeria* cinsi içinde moleküler açıdan bir temel oluşturmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Apiaceae (Umbelliferae) familyası Lindl. dünyada 300-455 cins ve 3000-3750 tür ile Kuzey Yarımküre'de yayılmıştır. Türkiye'de ise 102 cins ve 434 türle temsil edilmektedir. Çiçek durumu ve meyvelerinin karakteristik olmasından dolayı çiçekli bitkilerin en iyi bilinen familyalarından biridir. Ayrıca günlük hayatta tüketilen birçok sebze ve baharatların (havuç, maydanoz, kereviz, kimyon, anason gibi) bu familyada olması ekonomik açıdan da familyayı önemli kılmaktadır. Apiaceae familyasına ait türler uçucu yağlar bakımından oldukça zengindir. Bitkinin hemen her organında (meyve, yaprak, kök) uçucu yağ bulunabilir. Türkiye'de bu familya 130'u endemik olmak üzere 430 türün dahil olduğu 100 cinsle temsil edilmektedir (Tutin ve ark., 1968; Tabanca ve ark., 2007; Doğan ve ark, 2010). Apiaceae familyasının bir üyesi olan *Scaligeria* cinsi ülkemizde 2'si endemik olmak üzere toplam 7 taksonla temsil edilmektedir. Bu türlerden *S. lazica* ve *S. capillifolia* endemik olup, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'nda belirtilen IUCN ölçütlerine göre düşük riskte ancak tehlike altına girebilir (LR-nt) kategorisindedirler (Ekim ve ark., 2000; Davis, 1972; Davis, 1988; Güner, 2012).

Apiaceae taksonları halk arasında değişik amaçlarla kullanılmakta olup asıl kullanımları karminatif, laktasyonu arttırıcı ve sindirime yardımcı olarak gruplandırılabilir. *Scaligeria* türleri de benzer amaçlarla yetiştiği yörelerde hem dünyada hem de ülkemizde kullanılan bitkilerdir. Jaric ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 15. ve 16. yüzyıllarda Sırbistan'da *S. cretica* (Mill.) Boiss. türünün toprak üstü kısmının dalak büyümesi ve sarılık tedavilerinde kullanıldığından bahsedilmiştir (Jaric ve ark., 2011). *Scaligeria* türleri üzerinde gerek dünyada gerekse ülkemizde çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar da sadece bazı türlerin uçucu yağlarına aittir. Çalışma konumuzun asıl kapsamını oluşturan anatomi, morfoloji ve filogenetik çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle literatür özetinde sadece yapılmış uçucu yağ çalışmaları ve genel olarak yapılması planlanan filogenetik çalışma literatürleri verilmiştir. Apiaceae bitkilerinin kullanımları ve biyolojik aktiviteleri taşıdıkları uçucu yağ nedeniyledir. Bu bitkiler özellikle karminatif özelliklerini bu uçucu yağdaki bileşim nedeniyle göstermektedirler. *Scaligeria* türleri de yetiştiği bölgelerde kokusu ve tadı dolayısıyla anasona benzetilmektedir. Bu cins özellikle meyvelerinde anetolce zengin uçucu yağ taşımaktadır. Dünyada bu cinsin uçucu yağları ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkemizde ise *Scaligeria* cinsinin sadece iki türü üzerinde yapılmış az sayıda uçucu yağ çalışması mevcuttur. *S. tripartita* türünün meyve, yaprak, kök ve gövde örneklerinden elde edilen uçucu yağ analizi %89-94 oranında aydınlatılmış, toplam 38

bileşik tayin edilerek, kemotaksonomik olarak önemli bileşikler tespit edilmiştir. Çalışmada şimdiye kadar sadece Apiaceae familyasından *Pimpinella* türlerinde tespit edilmiş olan madde gruplarının (trinorsesqiterpene, pseudoisoeugenol) bu türde de bulunduğu belirlenmiştir (Tabanca ve ark, 2007; Bakkali ve ark., 2008). Tabanca ve ark. (2005) yapmış olduğu bir başka çalışmada Türkiye'deki *Pimpinella* türlerinin kök, meyvesiz toprak üstü ve meyvelerinden elde edilen uçucu yağların analizleri yapılmış, izole edilen bileşiklerin yapıları aydınlatılmış, nükleer ve kloroplast sekansları kullanılarak filogenetik ilişkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır. *Pimpinella* ve *Scaligeria* cinsleri bazı türlerinde birbirlerinin sinonimleri olarak kayıtlıdır. Bu nedenle kimyasal literatürün özetlenmesinde *Pimpinella* cinsi uçucu yağ karakterizasyonuna da değinilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda elde edilecek verilerin yorumlanması için gereklidir. Baser ve arkadaşları *S. lazica* türünün uçucu yağları üzerinde iki çalışma yapmışlardır. Bunlardan birinde türün çiçekli ve meyveli toprak üstü kısmının uçucu yağ analizi yapılmış ve %92'sini temsil eden 36 bileşik (ana bileşik (E)-anetol) tespit edilmiştir (Baser ve ark, 1993). Aynı çalışma grubunun yaptığı diğer çalışmada ise, *S. lazica* türünün sadece meyvesinin uçucu yağ bileşenlerini analiz etmiş (yağın %93.2'si) ve ana bileşik olarak yine (E)-anetol) tespit etmişlerdir (Başer ve ark., 1995). Bir başka çalışmada Apiaceae familyasının Scandiceae tribusu üyelerinin evrimsel ilişkileri araştırılmış ve *S. moreana* Engstrand türünün *Elaeosticta allioides* (Regel& Schmalh.) Kjuykov, Pimenov & V.N. ve *Bunium elegans* (Fenzl) Freyn türleriyle bir akrabalık ilişkisi olabileceği sonucuna varılmıştır (Downie ve ark., 2000a; 2000b). 2013 yılında yayınlanmış olan bir başka çalışmada ise jeofilik Orta Asya Umbelliferae cinsleri arasındaki ilişkiler psbA-trnH sekanslama ile tanımlanmıştır. Bu çalışmada, ilk başta *Elaeosticta*'nın birçok türüyle tanımlanmış olan *Scaligeria* cinsinin benzerlikleri olmasına rağmen buradaki cinslerle (*Bunium, Hyalolaena, Galangania, Oedibasis*) gruplandırılamadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu çalışmada psbA-trnH sekanslamanın evrimsel ayrımda bazı ilginç özellikleri ortaya koymasına rağmen çalışılan cinsler arasındaki ilişkileri açıklamada yeterli olmadığından bahsedilmiştir (Degtjareva ve ark., 2013). Klasik bitki sistematiği incelenirken anatomik ve morfolojik özellikler incelenir ve taksonların birbirine göre benzerlik ve farklılıkları ortaya konarak ayırım anahtarları oluşturulur. Eğer elde taksonlara ait kimyasal veriler varsa kemotaksonomik olarak bu özelikler de takson ayırımlarında önemlidir. Genetik ve genomik çağın başlaması ile bitki genetiği üzerine yapılan çalışmalar da hızla artmıştır. Bu genetik veriler kapsamında bitkilerin hem takson içi hem de taksonlar arası akrabalıkları kolaylıkla belirlenmekte ve gruplandırmalar daha doğru olarak yapılabilmektedir. Bu nedenle yapılacak

bitki sistematik araştırmalarında genetik özelliklerin belirlenmesi önem arzetmektedir. Bundan dolayı çalışmamızda yeni nesil sekanslama teknolojisi kullanılacaktır. Bu yeni teknolojinin bitkilerde spesifik uygulamalarından birisi de hızlı ve daha ucuz yolla çok sayıda mikrosatellit lokusların geliştirilmesine olanak sağlamasıdır (Zalapa ve ark., 2012). Mikrosatellitlerin kaynağı Mikrosatellitler 1-6 tekrardan oluşan prokaryotik ve ökaryotik genomlarda sıklıkla görülen tekrar dizileridir. SSR motifleri herbir generasyonda her lokusta 10-7'den 10-3'e kadar yüksek oranda mutasyona uğrarlar. Bu nedenle, genotipler arasındaki tekrar sayıları farklı olabilir ve bu durum da genetik analizler için uygun olan yüksek oranda polimorfik SSR markörlerin elde edilmesini sağlar (Buschiazzo and Gemmell, 2006). Genel olarak, fazla sayıdaki tekrar sayısı yüksek oranda genetik varyasyon ile doğrudan ilişkilidir ve kısa motifler (dinükleotit gibi) genellikle uzun motiflere göre daha fazla tekrara sahiptir. Motiflerin saf ve kompleks olma durumuna göre, SSR'lar mükemmel (perfect; kesiksiz tek motife sahip olma) veya bileşik (compound; kesikli veya kesiksiz iki veya daha fazla motifin olması) olabilir. Uzun tekrara sahip mükemmel SSR'lar daha yüksek oranda allelik varyasyona sahip olduğu bilinmektedir (Kelkar ve ark., 2008; Zalapa ve ark., 2012). SSR'ları değerli genetik markörler yapan özellikleri Herbir lokusta çok sayıda allelin belirlenebilmesi mikrosatellitlerin en önemli özelliklerin biridir. Bu özellik SSR markörlerini daha fazla bilgi içermesi nedeniyle SNP markörlerinden (genelde biallelik) daha üstün yapmaktadır. Örneğin toplam 89 SSR allel ve lokus başına ortalama 20 SSR allelden elde edilen bilgi içeriği ancak 1691 biallelik SNP marköre eşdeğerdir (Hamblin ve ark., 2007). Tekbir lokusdan fazla sayıda allel elde edilmesine ve kodominant olmasına ek olarak mikrosatellitler diğer markörlere göre birçok üstün özelliklere sahiptir. SSR yönteminde genetik varyasyon daha kolay belirlenir ve sonuçların tekrarlanabilirliğinde sorun yoktur. Ayrıca geliştirilen SSR'ların yakın türlere transfer edilebilirliği yüksektir (Moe and Weiblen, 2011; Zalapa ve ark., 2012). SSR protokolleri standarttır ve reaksiyon başına 1 ng gibi az DNA gerekir, çoklu PCR analizlerine uygun olup kısa sürede birçok lokusun analizi yapılabilir (Lepais and Bacles, 2011). Sonuç olarak, mikrosatellit lokusları genomda fazla sayıda ve iyi bir şekilde dağılmış olarak bulunurlar (Kelkar ve ark., 2008). Mikrosatellitlerin tüm bu olumlu özelliklerine rağmen, çok fazla sayıda SSR primerlerin geliştirilmesi yavaş ve pahalı olması bugüne kadar yüksek sayıda ve genomu kaplayan SSR'ların elde edilmesini sınırlamıştır (Zalapa ve ark., 2012). SSR geliştirmede Sanger ile YNS karşılaştırılması Zalapa ve ark'nın (2012) yapmış olduğu bir çalışmada, American Journal of Botany dergisinde yayınlanan SSR geliştirme ile ilgili makaleler incelenmiştir. Yapılan araştırma sonunda yapılan 22 adet yeni nesil sekanslaması

sonucunda 368.303 SSR geliştirilirken, Sanger yöntemiyle yapılan 71 çalışma sonucunda sadece 8332 SSR geliştirilmiştir. Bunun ötesinde Sanger sekanslamayı kullanan makalelerde ortalama 1892 baz sekanslanmış, 245 SSR geliştirilmiş, 50 primer çifti test edilmiş ve 15 tanesi polimorfik bulunmuştur. Yeni nesil 454 ve illumina sekanslamanın kullanıldığı makalelerde ise sırasıyla ortalama 47632 ve 88107 baz dizilenmiG, 4648 ve 18437 SSR primer geliştirilmiş, 52 ve 180 primer test edilmiş, ve 40 ve 53 polimorfik lokus geliştirilmiştir. Yeni nesil sekanslamada zenginleştirme SSR geliştirmede gerekli değildir Bugüne kadar Sanger sekanslama ile yapılan birçok SSR geliştirme çalışmasında başta dinükleotitler olmak üzere ortalama 3 adet motif ile zenginleştirme yaygın olarak yapılmıştır. Ancak yeni nesil sekanslamada kütüphane oluşturma ve zenginleştirme işlemlerine gerek yoktur. Çünkü milyon veya milyarlarca bazın sekansı elde edilir. Zenginleştirme yapılması durumda daha az sayıda SSR markörün geliştirildiği belirlenmiştir. Belli motiflerle zenginleştirme bulanacak SSR sayısını sınırlamaktadır ve bu nedenle zenginleştirme işlemi avantajlı olmamaktadır. Örneğin Arias ve ark. (2010) 10 farklı tropik türde 18 farklı motif ile zenginleştirme yaptılar ve SSR'ların dağılım frekansı motiflere göre farklılık göstermiş ve bu durum seçilen motife göre geliştirilen SSR lokuslarını sınırlamıştır. Moleküler markörler kaynağını bitkilerin hücrelerinde bulunan ve moleküler markörlerin de üretildiği, DNA‟lardan alırlar. Moleküler markörler bitki populasyonundaki çeşitlilik veya o populasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde %100‟e yakın güvenilirlikle kullanılabilirler. Moleküler markörler günümüzde bitki sistematiğinde, bitki ıslahında ve gen kaynaklarının karakterizasyonunda etkin olarak kullanılmaktadır. Kullanılacak markör sistemini belirleyen bazı faktörler vardır: polimorfizm seviyesi veya populasyon tipi, lokus sayısı, uygulamada kolaylık, kurulum ve analiz maliyeti bu kriterlerden sadece birkaçıdır. Her moleküler markör yönteminin avantaj ve dezavantajları olup markör seçiminde bütün kriterler göz önünde bulundurulmalıdır (Gülşen ve ark., 2005). Günümüzde bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için değişik markör teknikleri kullanılmaktadır. Moleküler markör tekniklerinden, ilk olarak RFLP tekniği geliştirilerek (Tanksley ve ark., 1989) çeşitlerin tanımlanmasında ve genetik haritaların çıkartılmasında kullanılmıştır. RFLP kodominant moleküler markör tekniği olmasına rağmen, birçok dezavantaja sahiptir. Tekniğin uygulanması pahalı, uzun zaman gerektiren ve çok işçilik istemesinin yanında radyoaktif madde kullanımını da gerektirmektedir. Bu teknikten sonra PCR'a (Polymerase Chain Reaction) dayalı teknikler geliştirilmiştir. PCR'a dayalı ilk olarak RAPD moleküler markör tekniği geliştirilmiştir. PCR esaslı DNA moleküler markörleri, dominant ve kodominant

olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Dominant markörlerden bazıları; RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) ve AP- PCR (Arbitrarily Primed PCR)'dır. Kodominant markörlerden bazıları ise SSR (Simple Sequence Repeat) STS (Sequence-Tagged-Site), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) ve SCAR (Sequence Characterised Amplified Regions)"dır. Son yıllarda genetik ilişkiler arasındaki incelemeleri içeren uygulamalarda faydalı genlerin haritalanması, bağlantı haritaların oluşturulması, marköre dayalı seleksiyonlar ve geri melezlemeler, populasyon genetiği ve filogenetik sınıflandırmalarda çeşitli moleküler markörler kullanılmaktadır. Mevcut moleküler markörler arasında en fazla kullanılanlardan bir tanesi 1-6 nükleotit uzunluğunda DNA motiflerinin peşpeşe tekrarlarını içeren mikrosatellit veya basit dizi tekrarlarıdır. Mikrosatellitler genomik DNA kütüphanelerinden veya daha spesifik kütüphanelerden geliştirilebilirler. Günümüzde, EST (Exspressed Sequence Tag) veri tabanları genlerin önemli kaynaklarından biridir (Kalia ve ark., 2011). Mikrosatellit DNA dizileri ökaryotik genomlar için mükemmel bir polimorfizm kaynağıdır. SSR polimorfizm seviyesi düşük olan türlerde çeşit tayininde ve genetik haritaların oluşturulmasında son derece etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Straub ve ark., 1996). SSR tekniğinde polimorfizm oranı yüksek olmasına karşın, primerlerin geliştirilmesi için ön çalıÇma gerektiğinden maliyetli bir yöntemdir (Goulao ve ark., 2001). Ancak diğer PCR'a dayalı tekniklere göre daha fazla bilgi içermesi, kodominant ve kararlı markör sistem olması, tekrarlanabilir ve otomasyona uygun olması, az DNA gerektirmesi, yüksek polimorfizm göstermesi ve bazen çoklu allel vermesinden dolayı çok kullanışlı bir yöntemdir (Powell ve ark., 1996). Bu teknikte ortaya çıkacak bantlar arasındaki mesafe çok yakın olacağından analizde ya radyoaktif madde kullanmak ya da Li-Cor veya ABI gibi genetik analizör cihazlarını kullanmak gerekebilir.

Mikrosatellitler, ökaryotik türlerin genomlarında ard arda tekrarlanan ikili, üçlü, dörtlü, beşli nükleotid kümesi halindeki tandem olarak tekrarlanan kısa DNA sekanslarıdır (Ellegren, 1993). Mikrosatellitlerin önemli özelliklerinden biri de polimorfik olmalarıdır. Mikrosatellitler temelde tüm populasyon içinde benzer özellikler göstermelerine rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar göstermektedir (Catherine, 1992). Belirleyici tekrar ünitelerinin, populasyonların bireyleri arasında oldukça polimorfik olmaları, tekrar ünitelerinin sayılarındaki değişimden kaynaklanmaktadır. Mikrosatellitlerin kullanılmasında

tek kısıtlayıcı etken, lokusa özgün primerlerin tasarımı için DNA dizilimlerinin bilinmesinin gerekiyor olmasıdır (Doğrar ve Akkaya, 2001).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Bitki materyallerinin toplanması / Arazi Çalışmaları

Aşağıdaki tablolarda belirttiğimiz arazi planı daha önce ziyaret ettiğimiz herbaryumlardan ve Türkiye Florası'ndan edinilen lokasyon kayıtları ile yapılmıştır. Güzergahlar bu lokasyonlara göre sıralanmıştır. İlk yıl mümkün olduğu kadar bütün adreslere gidilip bitkilerin yetiştiği yerler tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca bitkiler hem **meyveli** hem de **çiçekli dönemlerde** toplanacağından dolayı bitkilerin çiçekli ve meyveye geçiş dönemleri bu yıl tespit etmek amaçlanmıştır.

I. Arazi

11-15 Temmuz 2014 (5 gün)

Scaligeria lazica türü için yapılmıştır.

Tablo 1. Arazi çalışmalarından önce herbaryumlardan ve Türkiye Florası'ndan edinilen lokasyonlar

Rize; Çamlıhemşin, Hisarcık köyü- Sıra köy arası, alpinik step 1500-1800
Sinop; Ayancık, Çangal ormanı, İnaltı civarı 1200 m
Kastamonu, Azdavay-Pınarbaşı arası, Nalbantoğlu mezrası, 1000 m
Kastamonu; Kastamonu-Pınarbaşı, Kaval-Nalbantoğlu mahallesi, 900 m, 26.06.2002, orman açıklığı, yol kenarı
Trabzon, Şalpazarı, Kireçhane, Sisdağı, açıklık alan, 1480 m, 11.08.2005, Şalpazarı, Kovanlık mah., kızılağaç ormanı altı, sulak alan, 840 m, 23.08.2007
Trabzon; Köprübaşı, Düzmahalle yukarısı, 680 m, kayalık yamaçlar, 25.07.1991
Rize; Çayeli, Kaptanpaşa, Çataldere köyü üstü, nemli çayırlık ve granit ana kaya, ca. 900 m, 05.07.1979

Güzergah: Kayseri- Sivas- Gümüşhane- Trabzon- Rize- Giresun- Ordu- Samsun- SinopKastamonu-Çorum- Yozgat- Kayseri (yaklaşık 2500 km)

Tablo 2. *S. lazica* türünün toplandığı lokasyonlar

Rize, Çamlıhemşin İsina tepesi
Artvin, Borçka, Maral ormanları, yol kenarı
Trabzon, Altındere Sümela manastırı çevresi
Rize, Çamlıhemşin Çat civarı
Trabzon, Köprübaşı, Beşköy, Büyükdoğanlı köyü 800m.

Toplam 5 farklı lokasyondan *S. lazica* türü toplanmıştır. Kastamonu ve Sinop adreslerinde bitki bulunmamıştır. Ancak çalışmalarımız için yeterli sayıda lokaliteden *S. lazica* toplanmıştır.

II. Arazi

31Temmuz-04 Ağustos 2014 (5 gün)

Scaligeria capillifolia türü için yapılmıştır.

Güzergahımız: Kayseri, Niğde, Adana, Osmaniye, Konya, Isparta, Afyon, Eskişehir, Ankara, Kırıkkale, Kırşehir, Kayseri (yaklaşık 2200 km).

Tablo 3. *S. capillifolia* için herbaryumlardan ve Türkiye Florası'ndan edinilen lokasyon bilgileri.

Osmaniye; Yarpuz'un güneyi, Yağlıpınar civarı, 1450-1500 m, aynı yer, Hasanbeyli civar
Isparta; Eğridir, Yukarı Gökdere, Kasnak ormanı, 1700 m, 11.07.1994
Eskişehir; Seyitgazi, Türkmen dağı, Kaplan deresi, meşe açıklığı, 1500 m, 25.07.1976

Bu arazi çalışmasında Tablo 3'de belirtilen lokasyonlara gidilmiştir. Osmaniye'de bitkiler meyveye geçiş döneminde olup, genellikle çiçekli halde, bir miktarda meyveli örnekler toplanmıştır. Isparta ve Eskişehir adreslerinde bitki bulunamamıştır.

III. Arazi

21-24 Ağustos 2014 (4 gün)

Hem lokasyon tespiti hem de meyveli örnek için Eskişehir'e arazi yapılmıştır.

Ancak bitki bulunamamıştır. Özellikle Eskişehir lokasyonu için belirtilen adres 1976 yılına aittir. Bitki endemiktir ve yayılış alanı daralmış olabilme ihtimali söz konusudur.

2015 yılı arazi çalışmalarında ise *S. lazica* ve *S. capillifolia* için Tablo 1-3'de belirtilen bütün adreslere tekrar gidilmiş çiçekli ve meyveli örnekler toplanmıştır. Bir önceki yıl bazı adreslerde ulaşılamayan bitkiler tekrar aynı adreslerde taranmıştır.

Arazi çalışmalarında bitkiler iş paketlerindeki aşağıdaki hedeflere uygun olarak toplanmıştır.

Yapılan her arazi çalışmasında aşağıda belirtilen şekilde bitkiler gruplandırılmıştır.

1- Herbaryum örneği için hem çiçekli hem de meyveli en az 1'er tane olmak üzere bütün bir bitkiden örnekler alınıp preslenmiştir. Uygun şartlarda kurutulan örneklere toplayıcı numaraları verilmiştir.

2- Anatomik ve morfolojik çalışmalar için %70'lik etanol içeren kavanozlara bitkinin çiçek, meyve, gövde, yaprak ve köklerinden örnekler alınmıştır.

3- Kimyasal ve mikrobiyolojik çalışmalar için bitkilerin çiçekli ve meyveli toprak üstü kısımlarından bez çuvallar içerisine yeterli miktarlarda alınmıştır.
4- Moleküler çalışmalar için yaprak ve gövde örneklerinden alınarak buz içerisinde çalışmanın yapılacağı merkeze ulaştırılmıştır.

3.2. Moleküler Çalışmalar

Projemizin moleküler çalışmaları Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

***S. lazica* ve *S. capillifolia* Türlerinden DNA İzolasyonu**

DNA izolasyon çalışmalarında *S. lazica* ve *S. capillifolia* türlerinin gövde ve yaprakları kullanılmıştır. DNA izolasyonu DNeasy mericon® 96 QIAcube HT Kit (QIAGEN Ltd.) cihazı kullanılarak firmanın protokolüne göre yapılmıştır. PCR esaslı DNA moleküler markör teknikleri ile çalışırken kullanılan DNA konsantrasyonları oldukça önemlidir. Bu nedenle, her bir bitkinin PCR reaksiyonunda kullanılan DNA miktarının çok iyi ayarlanması gerekir. Bu araştırmada DNA konsantrasyonu Qubit Fluorometre (Invitrogen) cihazı kullanılarak veya %0.8'lik agaroz jelde konsantrasyonu belli λ DNA'lar (25ng-50ng-100ng-200ng) ile karşılaştırılarak tahmini olarak belirlenmiştir. Agaroz jel ethidium bromide ile boyanarak görüntüleme cihazında görüntüsü alınmıştır.

Türlerden sentezlenen DNA'lar sekanslama için BGI'ya gönderilmiş, *S. lazica*'dan primerler başarı ile sentezlenmiştir. Sonrasında moleküler çalışmalar sentezlenen bu primerler üzerinden yürütülmüştür. Moleküler çalışmalarda Şekil 1 ve Tablo 4'de görülen lokasyonlardan toplanan örnekler kullanılmıştır.



Şekil 1. Türkiye'den dört farklı lokasyondan *S. lazica* genotiplerini toplandığı bölgeler.

Table 4. Bu çalışmada *S. lazica* örneklerinin toplandığı lokasyonlar.

No	Aksesyon adı	Akronim	Lokalite	Enlem (N)	Boylam (W)
1	Camlıhemsin	RCH	Rize Camlıhemsin	41º 34'	41º 10'
2	Cayeli	RCE	Rize Cayeli	40º 53'	40º 44'
3	Altindere	TAD	Trabzon Altindere	40º 43'	39º 38'
4	Sumela	TSM	Trabzon Sumela	40º 41'	39º 39'

SSR-PCR için DNA'larin 5 NG /ML ayarlanması

Konsantrayonu belirlenen DNA'lar SSR-PCR reaksyonlarında standardı sağlamak amacıyla, SSR analizleri için 5 ng/µl konsantrasyonlarına ayarlanmıştır.

Illumina sekanslama ve primer dizaynı ile SSR lokuslarının geliştirilmesi

S. lazica genotiplerinin DNA örneklerinden biri Illumina Hi-Seq™ platformu kullanılarak yeni nesil sekanslama için kullanılmıştır. Örnekler için bir DNA kütüphanesi oluşturulmuş ve adaptörler ve düşük kalitedeki sekanslar uzaklaştırılarak 15,17G data elde edilmiştir. Birleştirme için SOAPdenovo2 (Luo et al., 2012) programı kullanıldı ve SSRIT (Temnykh et al., 2001) programı kullanılarak SSR lokusları aranmıştır. Araştırma parametreleri sırasıyla en az 11, 8, 6, 5 ve 4 olacak şekilde di-, tri-, tetra- penta- and hexanucleotide SSR motifleri bulmak için ayarlanmıştır. Primer dizaynı web tabanlı program olan Primer 3 (Rozen et al., 2000) programı ile standart parametreler kullanılarak yapılmıştır. 1.982 SSR primer çifti başarılı bir şekilde dizayn edilmiştir. Bu çalışmada 150 adet SSR primer çifti rastgele seçilmiş ve kullanılmıştır.

SSR lokuslarının başarılı bir şekilde amplifikasyonu için, gradient PCR ile DNA'ya optimum yapışma sıcaklıkları belirlenmiştir. Gradient PCR reaksyonlarında 2 genotip kullanılmıştır. Gradient PCR ürünleri % 3'lük agaroz jelde koşulduktan sonra ethidium bromideile yıkanarak görüntüleri alınmıştır. Gradient PCR sonucunda amplifiye olan primerler tarama amaçlı, her bir lokasyondan 2 adet olmak üzere toplam 8 adet *Scaligeria lazica* genotipi ile PCR yapılmış ve kapiller elektroforez ile allelleri belirlenmiştir.

PCR reaksyonları ve elektroforez

Gradient PCR yöntemi ile her bir primer çifti için belirli sıcaklık aralıklarında amplikasyon derecelerine bakılmıştır. Primerlerden spesifik PCR ürünleri elde etmek ve primerlerin DNA'ya optimum bağlandığı anneling sıcaklığının belirlenmesi için Gradient PCR yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde, 5 farklı sıcaklıkta (52,2°C, 54,6 °C,57,7°C, 59,3 °C 62,2 °C) ve Çizelge **Tablo 5**'de belirtilen PCR bileşenleri kullanılarak, **Tablo 6**'da belirtilen PCR koşullarına göre PCR yapılmıştır. Örnekler için Gradient PCR 12,5 ul hazırlanmıştır.

Tablo 5. SSR Reaksiyonunda Kullanılan Kimyasal ve Konsantrasyonları

Kimyasal maddeler	**Konsantrasyon**
Dream tag PCR buffer	1,25
dNTP	1
Primer F	0.025
Primer R	0.5
SM13 Boya	0.5
Hot Start Taq enzim	0.12
ddH_2O	7.11
DNA	2
Toplam	**12,5**

Tablo 6. *S. lazica* için SSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

İşlem	**Sıcaklık (0C)**	**Süre(dk)**	**Döngü sayısı**
Ön denatürasyon	94	5	
Denatürasyon	94	45 sn	35
Primerin DNA'ya yapışma safhası	Belirlenen 6 sıcaklık	45 sn	
Uzama safhası	72	1	
Son uzama safhası	72	5	

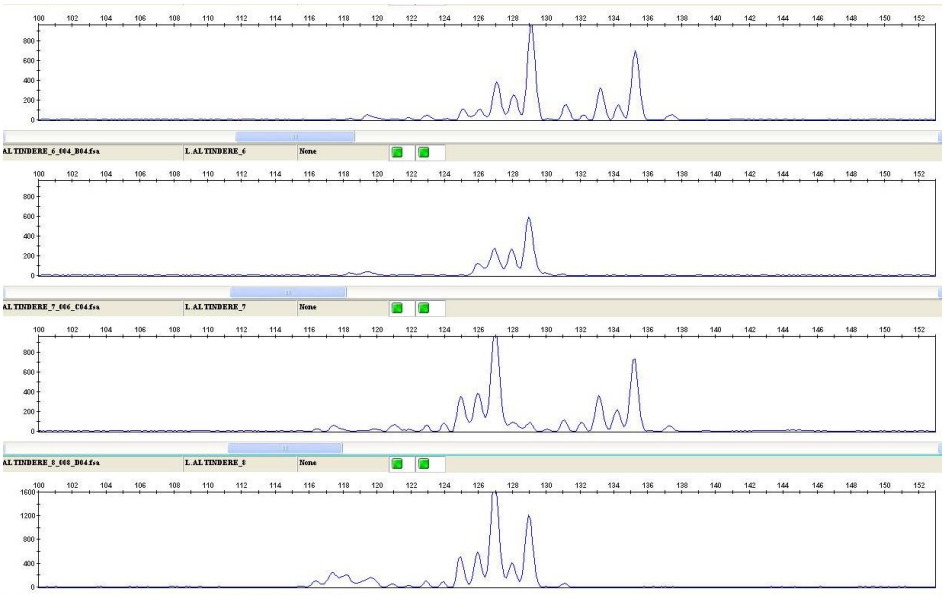
Gradient PCR'da, primerlerin amplifiye olup olmadıkları ve primerin DNA'ya bağlandığı en uygun sıcaklıklar saptanmıştır.

SSR primer çiftlerinin 40 adet *S. lazica* genotipinde analizi

Gradient PCR sonucu amplifiye olan ve DNA'ya bağlanma sıcaklıkları saptanan primerler 40 adet *S. lazica* genotipinde analiz edilmiştir.

PCR ürünlerinin elektroferezi ABI 3130xl otomatik baz dizileme ünitesinde (kapiler elektroforez) yapılmıştır. SSR analizlerinin ABI'da elektroforez yapılabilmesi için primerlerin 5' uçlarına M13 üniversal (5`-TGTAAAACGACGGCCAGT–3`) baz dizisi eklenmiş (Schuelke, 2000) ve SSR analizlerinde M13 primerinin 5' ucu 4 farklı (6-FAM, VIC, NED, PET) boya ile etiketlenerek kullanılmıştır. ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroferezi yapılan örnekler için PCR 12.5 µl hazırlanmıştır.

SSR PCR koşulları 75 mM Tris-HCl, (pH: 8.8, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$), 2.0 mM $MgCl_2$, %0.01 Tween 20, 200 mM dNTP, 10 nM 5' ucunda M13 üniversal primeri eklenmiş ileri primer, 200 nM geri primer, 200 nM FAM, VIC, NED, PET ile işaretlenmiş M13 üniversal primer, 0.6 ünite Taq DNA Polimeraz ve 10 ng DNA içermektedir. Sıcaklık ve döngü koşulları 94^{o}C de 5 dakika, ön denatürasyon, 30 döngü boyunca 94^{o}C de 30 saniye, denatüre edilerek 56^{o}C de 45 saniye, annealing ve 72^{o}C de 45 saniye, uzama safhasının ardından, M13 için 10 döngü boyunca 94^{o}C 30 saniye, denatürasyon 52^{o}C 45 saniye, annealing ve 72^{o}C 45 saniye, uzama safhası aşamasının ardından 72^{o}C de 10 dakika, son uzama aşamasına tabi tutulmuştur **(**Schuelke, 2000). ABI cihazında elektroferezi yapılan örnekler GeneMapper paket programı kullanılarak DNA bantları pikler halinde değerlendirilerek primerlerin allelleri ve allel büyüklükleri belirlenmiştir. SclgSSR1762 SSR primerinin GeneMapper paket programı kullanılarak alınan görüntüsü Şekil 2' de verilmiştir.



Şekil 2. SclgSSR1762 SSR primerinin 4 *S. lazica* genotipindeki elektroferogramı

Geliştirilen SSR primer çiftlerinin genetik çeşitlilik değerlerinin hesaplanması

Çalışmada kullanılan 40 SSR lokusun 40 *S. lazica* genotipinden elde edilen allel sayısı (Na), etkili allel sayısı (Ne), beklenen heterozigotluk (He) ve gözlenen heterozigotluk (Ho) GenAlEx (Version 6.5) programı kullanarak hesaplanmıştır (Peakall and Smouse, 2012). Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) ise Liu ve Muse (2005) tarafından geliştirilen PowerMarker (v 3.25) kullanarak hesaplanmıştır.

Ayrıca çalışmada 40 SSR lokusundan elde edilen alleller kullanılarak verilerin yapısal analizi STRUCTURE 2.3.4 paket programında yapılmıştır (Pritchard ve ark, 2000). Genetik yapısal analizinin değerlendirme kısmı STRUCTURE HARVESTER programında yapılmıştır.

3.3. Morfolojik Çalışmalar

***S. lazica* ve *S. capillifolia* türlerinin morfolojik özellikleri**

Türlerin sepal, petal, kaliks korolla, yaprak, meyve parçalarının ayrıntılı çizimleri yapılarak ölçümleri alınmıştır. Türkiye Florası'nda belirtilen ölçümlerle kıyaslanmış, burada belirtilmemiş yeni bulgulara yer verilmiştir.

Polen analizleri

Projenin çalışma paketlerinde yer almayan ancak morfolojik analizlerde önem teşkil ettiği düşünülen polen analizleri çalışmalara dahil edilerek daha önce Anabilim Dalımızda yer alan *Scaligeria*'nın kurutulmuş olan diğer türlerinden de örnekler hazırlanarak polen analizleri için Üniversitemizin Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (TAUM) yer alan Taramalı Elektron Mikroskobu'nda (SEM) ve Fakültemiz Araştırma Laboratuvarı'nda yer alan Stereomikroskop ile görüntüler alınmıştır. Sonuçlar Tablo 7 ve Şekil 3-6'da görülmektedir.

3.4. Anatomik Çalışmalar

Anatomik çalışmalarda bitkilerin yaprak yüzeyel ve enine kesitleri ile gövde enine kesitleri alınarak ışık mikroskobuna bağlı kamera ile çekimleri yapılmıştır.

3.5. Uçucu Yağ analizleri

S. lazica ve S. capillifolia bitkilerinin çiçekli toprak üstü kısımlarından ve meyvelerinden 100'er g kullanılarak, uçucu yağ elde etmek üzere Avrupa Farmakopesi'ne uygun Clavenger düzeneği kurulmuş ve hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağ elde edilmiştir. Yağların analizleri, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında yer alan Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile yapılmıştır.

GK analiz şartları:

Cihaz : Agilent 6890N GC

Kolon : Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, 0.25 μm film kalınlığı)

Taşıyıcı gaz : Helyum (0.8 mL/dk)

Dedektör : AID

Split oranı : 40:1

Sıcaklıklar

Enjeksiyon : 250ºC

Dedektör : 300ºC

Sıcaklık Programı : 60ºC-10dk//4ºC/dk//220ºC -10dk//1ºC /dk//240ºC

Enjeksiyon Miktarı : 1 μL

GK/KS analiz şartları:

Cihaz : Agilent 5975 GC-MSD

Kolon : Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, 0.25 mm film kalınlığı)

Taşıyıcı gaz : Helyum (0.8 mL/dk)

Split oranı : 40:1

Sıcaklıklar

Enjeksiyon : 250ºC

Dedektör : 300ºC

Sıcaklık Prog.: 60ºC-10dk//4ºC/dk//220ºC -10dk//1ºC /dk//240ºC

Elektron enerjisi : 70 *e*V

Mass Kütle Aralığı : 35-450 *m*/*z*

3.6. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Mikroorganizma kültürlerinin geliştirilmesi

-85°C'de ve -20°C'de saklanan bakteriyel kültürler canlandırılmak üzere Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (MHB) 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Candida albicans suşunun gelişmesi ise 37°C'de 24 saat Potatoes Dextrose Agar (PDA) ve RPMI ile sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra türbidometre ile Mc Farland No: 0.5 tüpüne göre mikroorganizmaların kültür yoğunlukları ayarlanmıştır (CLSI, 2002; CLSI, 2006). Test edilecek numuneler Dimetil-Sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek distile su ile seyreltilmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Çalışmada 96 adet flat bottom kuyucuklara sahip mikrotitrasyon petrileri kullanılmıştır. Seyreltilmiş numunelerden 100'er µL mikrotitrasyon petrilerine aktarılmıştır ve seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bakteriler için pozitif kontrol olarak kloramfenikol; *Candida* için ketokenazol pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Antibakteriyel aktivite çalışması

Her kuyucuğa yoğunluk ayarı yapılmış ve 1:100 seyreltilmiş 100 µL mikroorganizma eklendikten sonra test numuneleri ve mikroorganizmalar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (CLSI, 2007; Demirci ve ark., 2009).

Antikandidal aktivite çalışması

Yoğunluk ayarı yapılmış ve 1:1000 seyreltilmiş *Candida* suşu 100'er µL mikrotitrasyon petrisinin kuyucuklarına eklenmiştir (CLSI, 2002). İnkübasyon süresi sonunda renklenme için kuyucuklara 20'şer µL % 0.01 (a/h)'lik rezasurin çözeltisi eklenmiştir ve 37°C'de 3 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda renklenme olmayan kuyucuklar üremenin olmadığını göstermiştir. Sonuçlar minimum inhibitör konsantrasyonları (MIK) olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Çalışma Sonuçları

Çalışmada yeni nesil sekaslama yöntemi kullanılarak *S. lazica*'nın 2 örneğinin DNA'sı kullanılarak 15.17G Illumina datası elde edilmiştir. 1.982 SSR primer çifti başarılı bir şekilde dizayn edilmiştir. Dizayn edilen bu primerlerden 150 adet SSR primer çifti rastgele seçilmiş

ve kullanılmıştır. Bu primerlerden 139 tanesi amplifiye olurken, 84 tanesi polimorfik bulunmuştur. 40 adet SSR lokusu, 4 farklı lokasyondan toplanan 40 adet *S. lazica* genotipinde genetik çeşitlilik analizinde kullanılmıştır.

Polimorfik SSR primerlerin geliştirilmesi

SSR primerleri geliştirmek amacı ile, yeni nesil sekaslama yöntemi kullanarak *S. lazica'*nın 2 örneğinin DNA'sı kullanılarak elde edilen sekansların SSR lokusları aranmıştır. Araştırma parametreleri sırasıyla en az 11, 8, 6, 5 ve 4 olacak şekilde di-, tri-, tetra- penta- and hexanucleotide SSR motifleri bulmak için ayarlanmıştır. Primer dizaynı web tabanlı program olan Primer 3 (Rozen et al., 2000) programı ile standart parametreler kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen data sonucuna göre *S. lazica*' da di-nükleotit tekrarlar (70.63%) en fazla sayıda bulunurken bunu trinukleotit (11.5%), ve hexanukleotit tekrarlar (11.3%) takip etmektedir. Tetranukleotit (4.3%) ve pentanukleotit (2.1%) tekrarlar ise en az bulunmuştur. En fazla bulunan dinükleotit ve trinükleotit tekrar motif tipleri sırasıyla, TC/GA ve TTC/GAA motifleridir.

Test edilen 150 adet SSR primer çiftinden gradient PCR sonucunda amplifiye olan ve annneling sıcaklıkları belirlenen toplam 139 adet SSR primer çifti edilmiştir. Bu primerlerden 84 tanesi polimorfik bulunmuştur. Polimorfik bulunan primerlerden 40 tanesi 40 *Scaligeria* genotipinde filogenetik ve structure analizlerinde kullanılmıştır. 40 adet SSR primer çiftinin PIC değerleri, He, Ho, Na ve Ne değerleri ile primerlerin tekrar motifleri Tablo 7' de verilmiştir.

Tablo 7. *S. lazica'*dan geliştirilen 40 adet SSR primer çiftinin tekrar motifleri, allel sayısı (Na), etkili allel sayısı (Ne), gözlenen heterozigotluk (Ho), beklenen heterozigotluk (He) ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC).

No	SSR lokus	Motif	Na	Ne	Ho	He	PIC
1	SclgSSR164	$(AG)_{19}$	7	4.07	0.71	0.75	0.72
2	SclgSSR170	$(CT)_{14}$	5	3.43	0.50	0.71	0.66
3	SclgSSR179	$(AGA)_{9}$	2	1.74	0.10	0.43	0.34
4	SclgSSR285	$(AG)_{15}$	12	7.04	0.64	0.86	0.84
5	SclgSSR323	$(AG)_{14}$	3	1.35	0.25	0.26	0.24
6	SclgSSR709	$(CT)_{15}$	6	3.99	0.40	0.75	0.71
7	SclgSSR762	$(AG)_{21}$	12	6.26	0.76	0.84	0.82
8	SclgSSR774	$(GA)_{14}$	6	2.93	0.38	0.66	0.6
9	SclgSSR796	$(AG)_{14}$	3	2.47	0.43	0.60	0.53
10	SclgSSR810	$(TC)_{14}$	5	3.13	0.36	0.68	0.62
11	SclgSSR815	$(GT)_{15}$	6	2.56	0.46	0.61	0.57
12	SclgSSR858	$(AC)_{14}$	8	3.83	0.51	0.74	0.70
13	SclgSSR909	$(GAT)_{10}$	7	4.46	0.62	0.78	0.74
14	SclgSSR913	$(AGCAGA)_{5}$	3	2.17	0.53	0.54	0.43

15	SclgSSR915	$(TC)_{15}$	9	5.27	0.55	0.81	0.78
16	SclgSSR928	$(TTTTCC)_{5}$	4	1.92	0.40	0.48	0.39
17	SclgSSR929	$(GA)_{14}$	3	1.38	0.14	0.27	0.25
18	SclgSSR979	$(AG)_{17}$	8	2.86	0.45	0.65	0.59
19	SclgSSR1018	$(GT)_{21}$	5	2.92	0.25	0.66	0.6
20	SclgSSR1029	$(CT)_{14}$	5	2.77	0.11	0.64	0.58
21	SclgSSR1094	$(TG)_{14}$	6	3.06	0.31	0.67	0.63
22	SclgSSR1258	$(ATTA)_{6}$	8	4.38	0.24	0.77	0.74
23	SclgSSR1283	$(AG)_{15}$	6	3.06	0.49	0.67	0.63
24	SclgSSR1319	$(TC)_{14}$	7	3.75	0.22	0.73	0.69
25	SclgSSR1354	$(CT)_{22}$	8	5.15	0.43	0.81	0.78
26	SclgSSR1488	$(CAT)_{10}$	2	1.98	0.79	0.49	0.37
27	SclgSSR1544	$(GA)_{16}$	6	3.97	1.00	0.75	0.71
28	SclgSSR1547	$(AGA)_{10}$	4	2.74	0.50	0.64	0.58
29	SclgSSR1613	$(TC)_{14}$	4	1.87	0.15	0.46	0.42
30	SclgSSR1614	$(TC)_{15}$	11	3.08	0.51	0.68	0.65
31	SclgSSR1636	$(AG)_{59}$	13	4.93	0.31	0.80	0.78
32	SclgSSR1645	$(AG)_{19}$	9	4.71	1.00	0.79	0.76
33	SclgSSR1762	$(TC)_{15}$	8	3.63	0.36	0.72	0.69
34	SclgSSR2076	$(AG)_{24}$	10	5.49	0.67	0.82	0.79
35	SclgSSR2196	$(TG)_{16}$	8	2.59	0.88	0.61	0.54
36	SclgSSR2364	$(AGA)_{10}$	3	2.69	0.31	0.63	0.55
37	SclgSSR2475	$(GA)_{17}$	9	5.9	0.48	0.83	0.81
38	SclgSSR2548	$(TC)_{16}$	5	2.58	0.28	0.61	0.55
39	SclgSSR2725	$(GA)_{16}$	11	3.91	0.69	0.74	0.71
40	SclgSSR2798	$(TGG)_{11}$	7	2.27	0.44	0.56	0.53
	Total	-	264				
	Mean		6.6	3.46	0.47	0.66	0.60

40 adet mikrosatellit primeri 4 popülasyona ait 40 adet *S. Lazica* genotipinde kullanılmış ve toplam 264 allel elde edilmiştir. Allellerin oranı her bir lokusta 2 ile 13 arasında değişmiştir. En yüksek alleleri üreten primerler SclgSSR1636 (13), SclgSSR285 (12), SclgSSR762 (12), SclgSSR1614 (11), ve SclgSSR2725 (11) olmuştur. Etkili allel sayıları 1,35 (SclgSSR323) ile 7,04 (SclgSSR285) arasında değişmiştir. Gözlenen heterozigotluk 0,10 (SclgSSR179) ile 1.00 (SclgSSR1645 ve SclgSSR1544) arasında değişmiştir. Beklenen heterozigotluk 0.25 (SclgSSR323) ile 0.86 (SclgSSR285) arasında değişmiş ve ortalaması 0.66 bulunmuştur. PIC değeri 0.24 ile 0.84 arasında değişmiş ve ortalaması 0.60 bulunmuştur. SclgSSR285 primeri en yüksek PIC değerine sahiptir.

Popülasyon genetik parametrelerinin ortalama değerleri bu çalışmada Tablo 8 te verilmiştir. Genetik çeşitliliğin en fazla görüldüğü lokasyon RCE iken, TSM ve RCH ve TAD lokasyonlarda daha düşük görülmüş ve benzer çeşitlilik derecelerine sahip olmuştur. Lokasyona özel allel sayısı RCH lokasyonunda diğer üç lokasyona göre oldukça yüksektir.

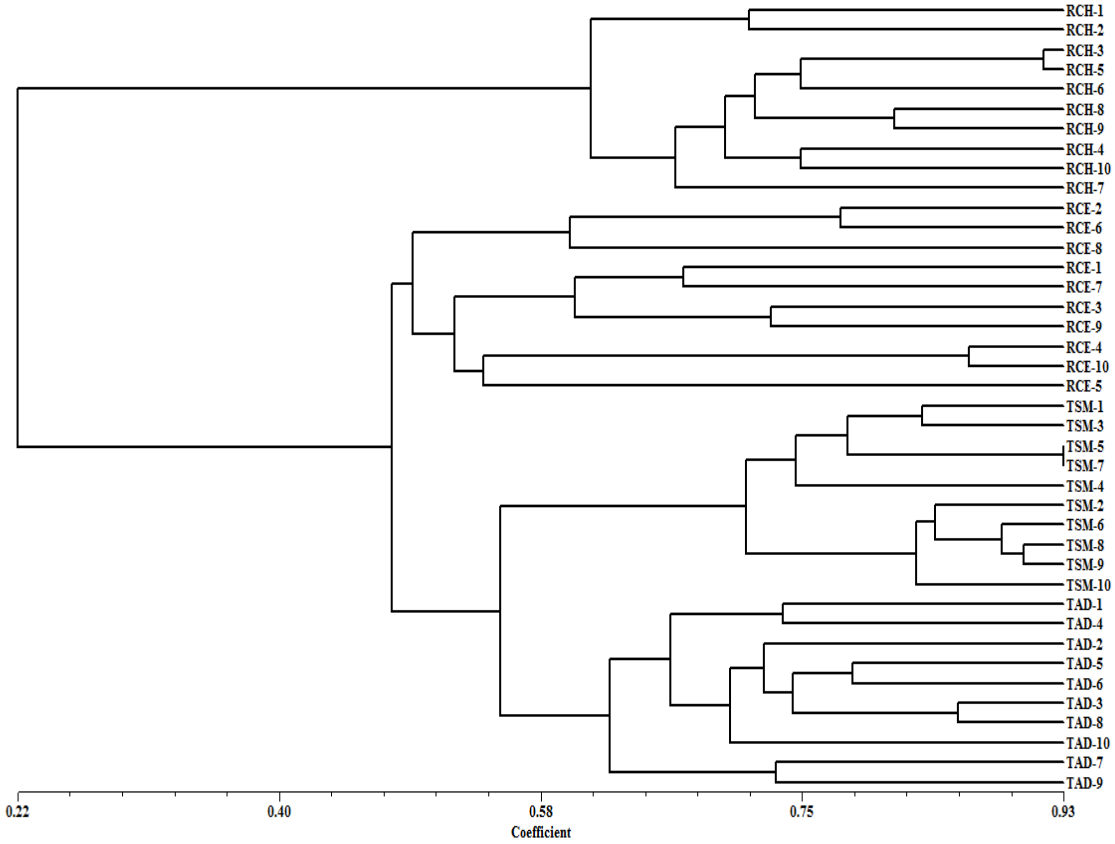
264 alleldeki polimorfizm oranı en yüksek RCE lokasyonunda (97.3%) bulunurken TSM (91.3%) ve RCH (92.4%) lokasyonları en düşük polimorfizme sahip olmuşlardır.

Table 8. Çalışmada kullanılan popülasyon genetik parametrelerinin ortalamaları.

Populasyon	Örnek sayısı	Na	Ne	Ho	He	PIC	polimorfizm(%)	Popülasyona özel allel sayısı
RCH	10	3.10	2.12	0.43	0.42	0.37	92.4	65
RCE	10	4.10	2.76	0.57	0.57	0.52	97.3	44
TSM	10	2.53	1.74	0.42	0.35	0.30	91.3	4
TAD	10	2.93	2.11	0.44	0.46	0.40	94.7	16

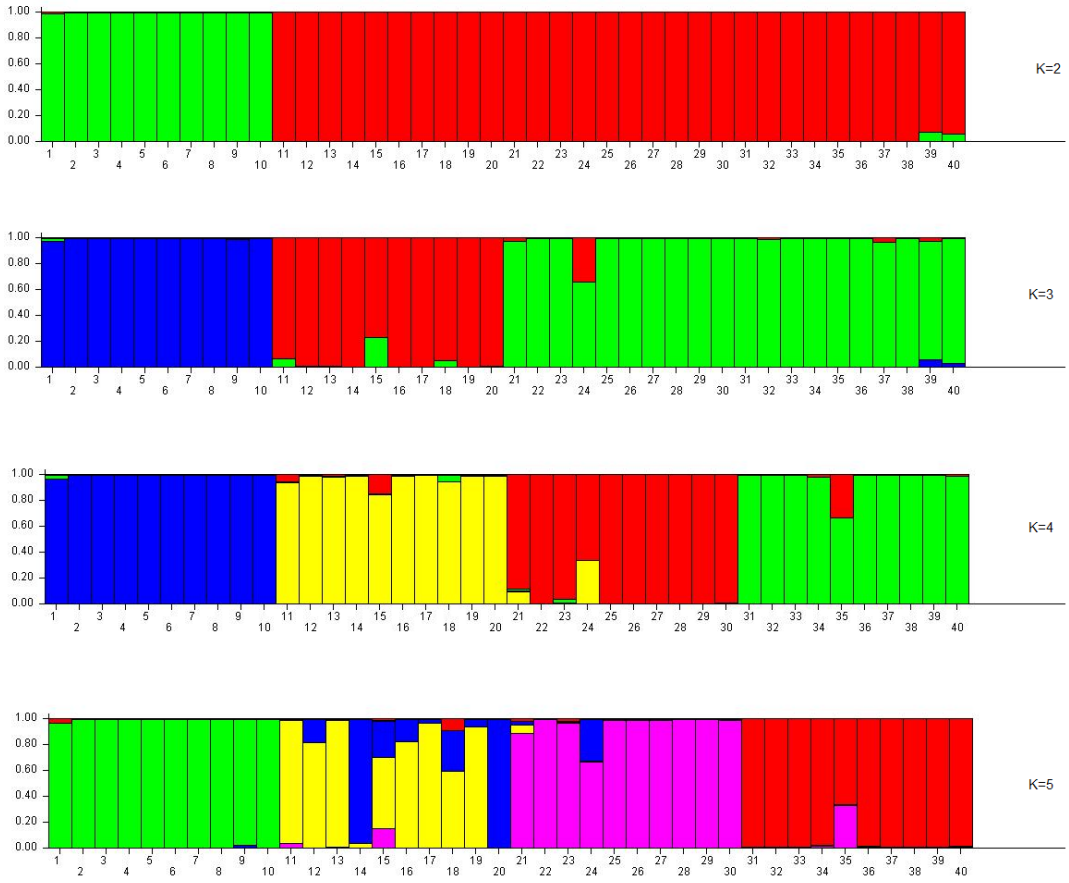
Genetik İlişkiler ve Popülasyon Yapısı

S. lazica genotiplerini arasındaki genetik ilişkiler Şekil 3'te verilmiştir. 40 *Scaigeria lazica* genotipinin kümeleme analizlerinde coğrafik orijn ve toplanan bölge temel alınmıştır. UPGMA dendrogramları ile bütün genotiplerin grupları iki ana büyük grubu oluşturmuştur; ilk grup RCH popülasyonunu içerirken geriye kalan 3 popülasyon ikinci grubu oluşturmuştur. İkinci grupta iki ana alt grup oluşmuş: birinci alt grup RCE genotiplerinin tamamını içerirken, ikinci alt grup Trabzon'dan toplanan bütün örnekleri (TAD and TSM) içerir.

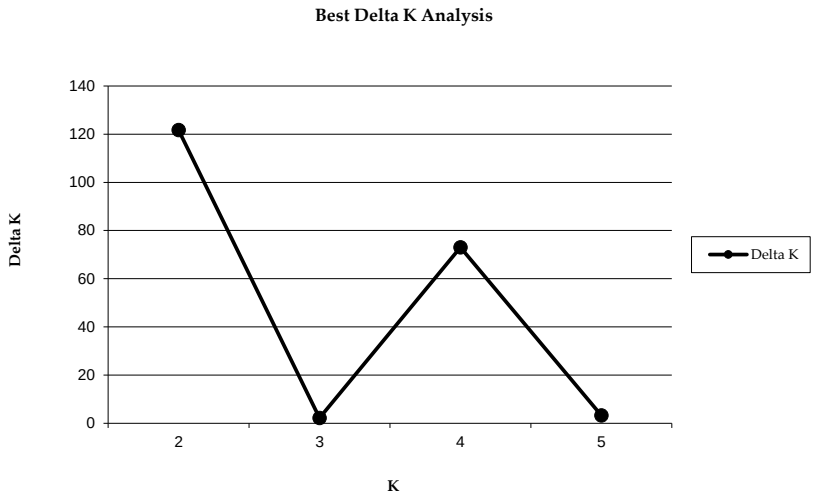


Şekil 3. 40 SSR primeri ile analiz edilen 4 farklı lokasyon alınan 40 *S. lazica* genotiplerinin UPGMA dendrogramı

Çalışmada kullanılan Scaligeria genotiplerinin genetik yapısı Şekil 4'te verilmiştir. 40 SSR primeri kullanarak 40 genotipte kümeleme metodunu temel alan bir model uygulanmıştır. Olabilecek en muhtemel kümeleme sayısı Delta K (ΔK) hesaplanarak bulunur. K değerleri (K = 1'den K = 5'e) arasındaki dataların muhtemel değişiminin oranı temel alınmıştır. ΔK grafiğinin tepe noktası datalarda popülasyonların en muhtemel sayısına karşılık gelir. Bu çalışmada ΔK'nın en yüksek sayısı K=2 bulunmuştur (Şekil 5) UPGMA dendrogram sonucuna benzer olarak, 40 genotipin tamamı iki ana gruba ayrılmıştır: RCH genotipleri ve diğer lokasyondan toplanan (RCE, TSM, TAD) genotiplerdir.



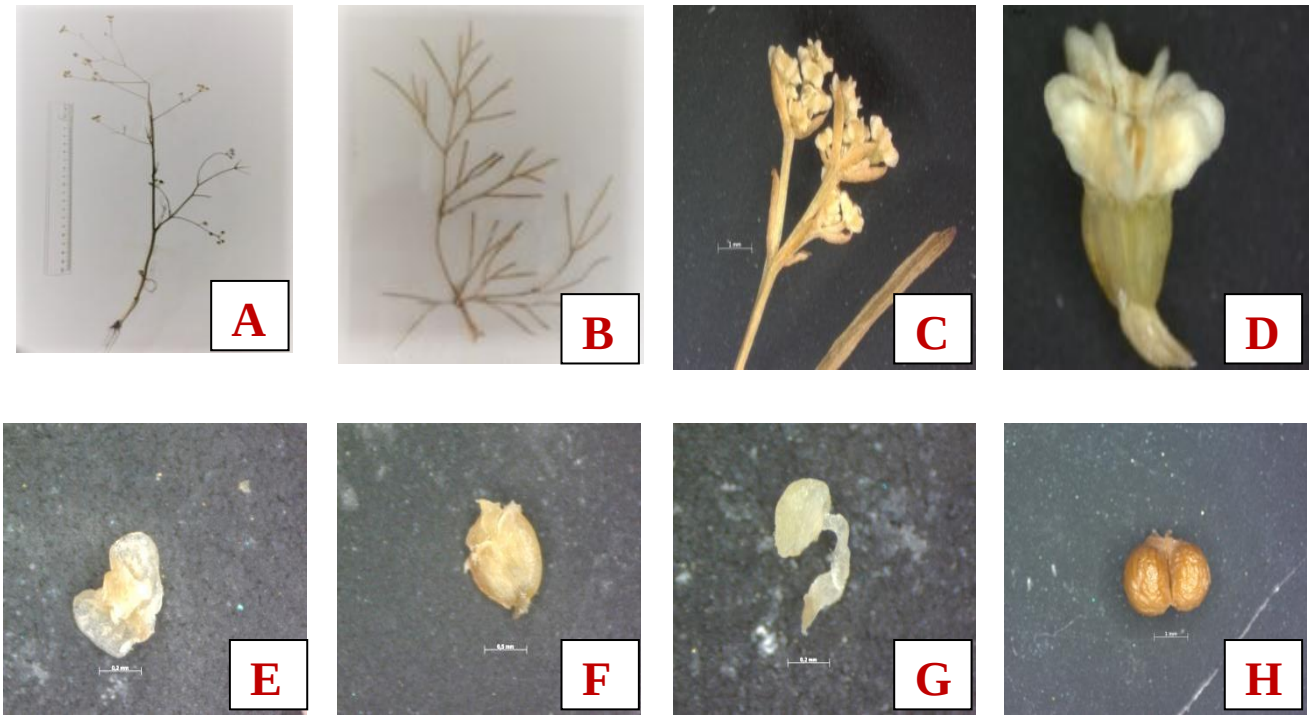
Şekil 4. STRUCTURE programı kullanılarak 40 SSRs primerinin 40 genotipte structer analizi. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış 40 genotipte alt popülasyonu temsil eden K = 2'den K = 5'e kadar olan dataların muhtemel değişim oranı.



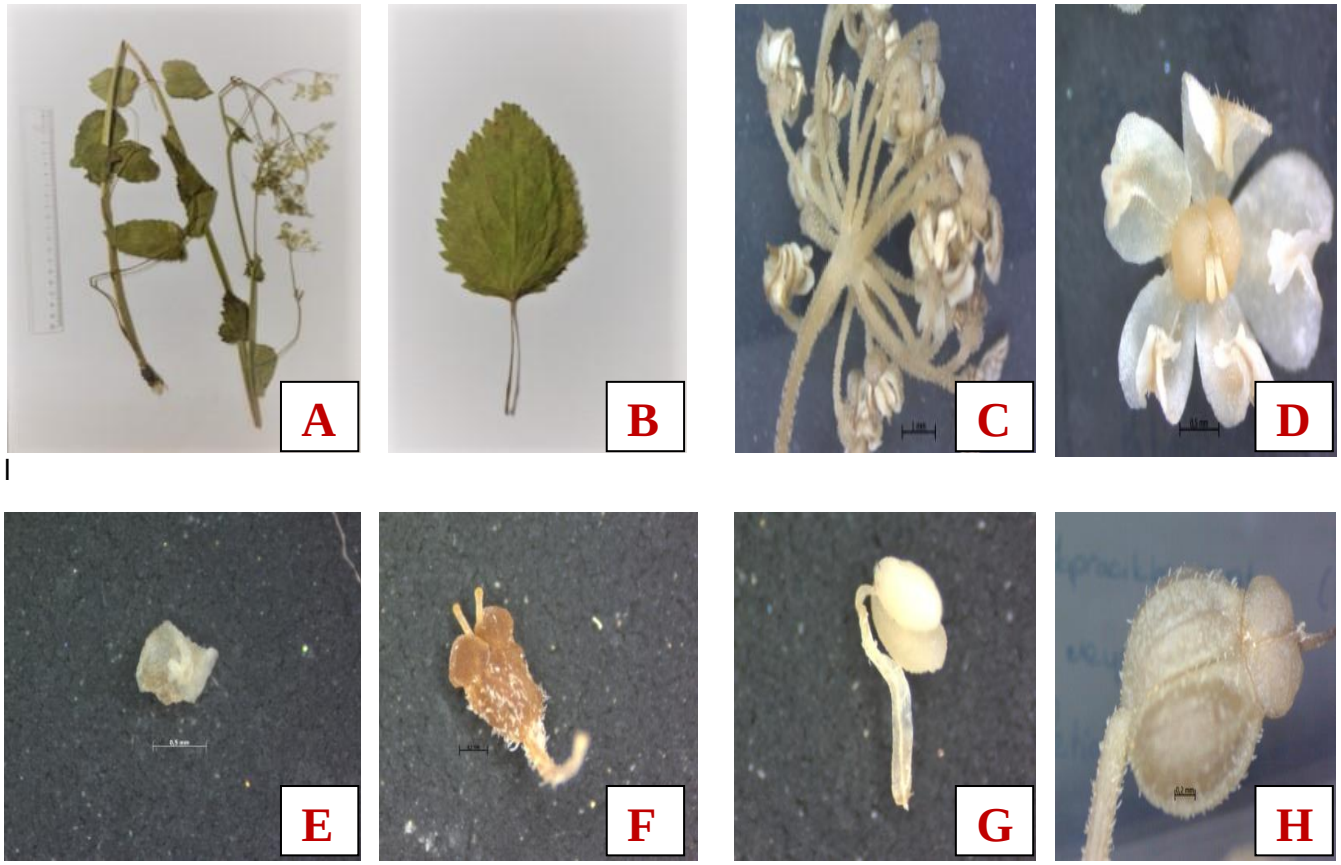
Şekil 5. ΔK değeri, en muhtemel K değerinin belirlenmesinde kullanılan model, K=2 için 2 alt grup.

4.2. Morfolojik Çalışma Sonuçları

S. lazica ve *S. capillifolia* yaprak ve çiçek parçalarının stereomikroskop görüntüleri ve ayrıntılı morfolojik çizimleri Şekil 6-8'de görülmektedir. Türlerin morfolojik bulgularının Türkiye Florası'ndaki bilgilerle kıyaslanması Tablo 9'da verilmiştir.



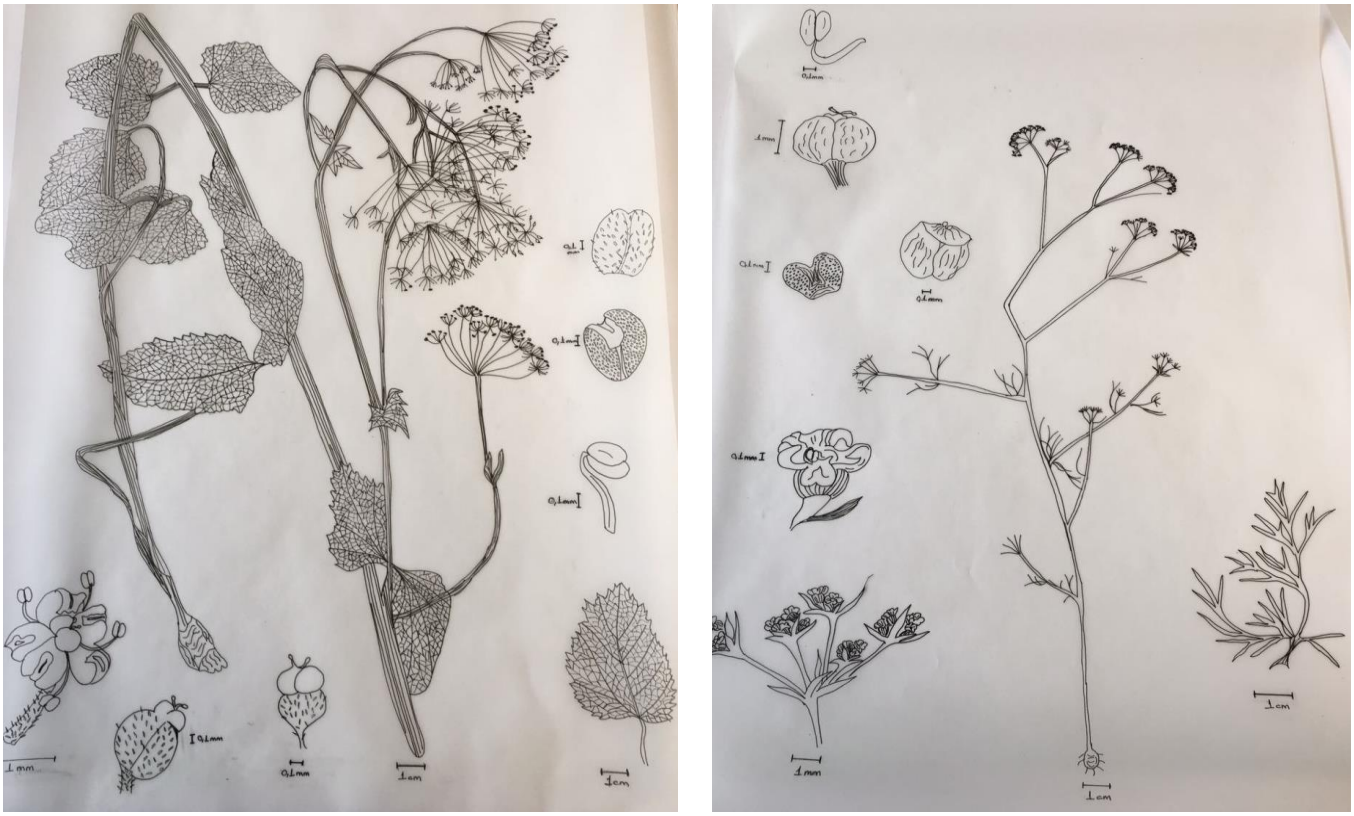
Şekil 6. *S. capillifolia* için morfolojik görüntüler. A: Bitki genel görünüş, B: Yaprak, C: Çiçek durumu, D: Çiçek, E: Sepal, F: Pistil, G: Stamen, H: Meyve



Şekil 7. *S. lazica* için morfolojik görüntüler. A: Bitki genel görünüş, B: Yaprak, C: Çiçek durumu, D: Çiçek, E: Sepal, F: Pistil, G: Stamen, H: Meyve

Tablo 9. *S. capillifolia* ve *S. lazica* türlerinin morfolojik bulgularının Türkiye Florası'ndaki bilgilerle kıyaslanması.

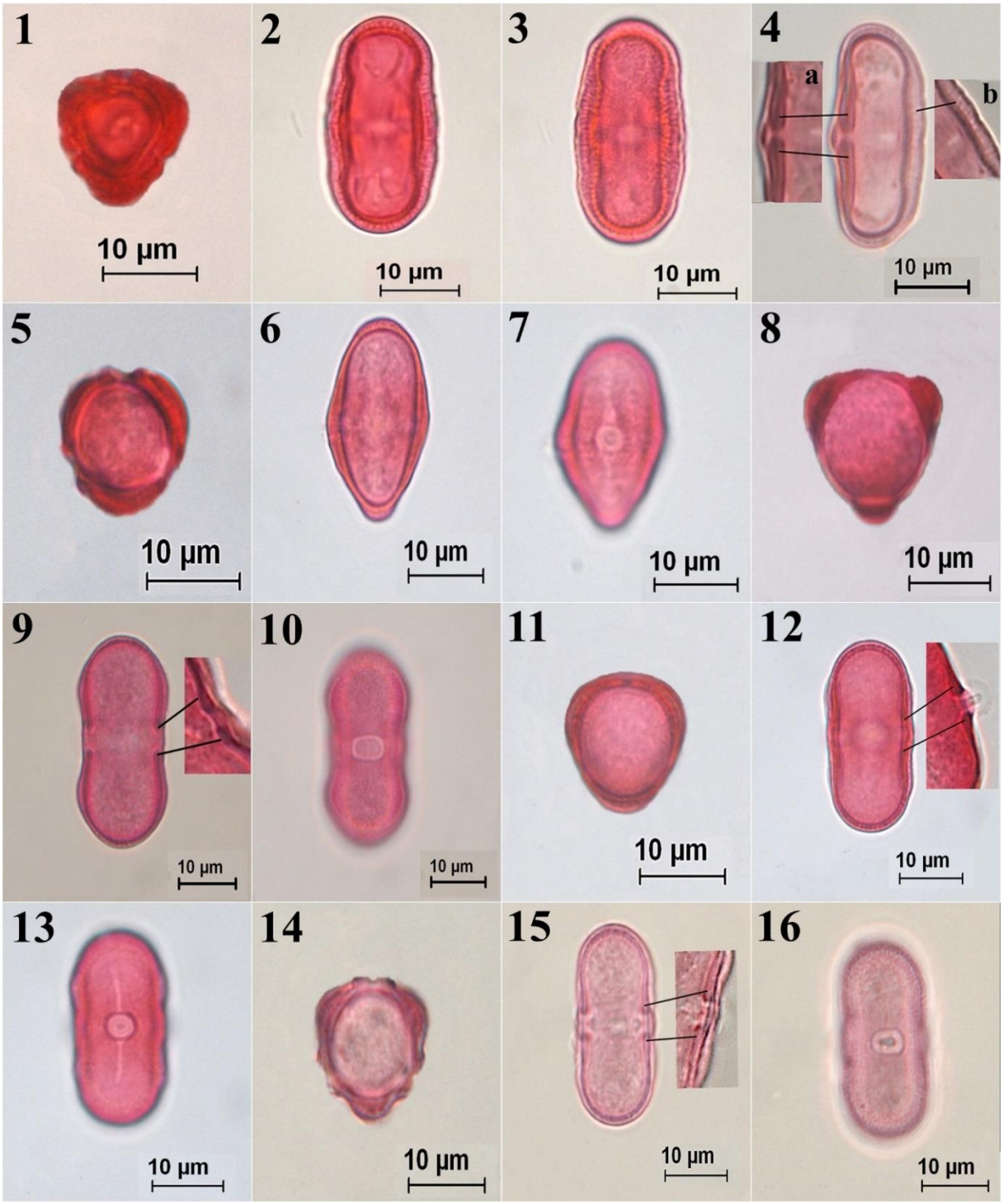
S. capillifolia		**Flora**	**Bizim ölçümlerimiz**
	Gözde uzunluğu	60-100 cm	30-100 cm
	Bazal yaprakların linear uç segmentleri genişliği	0,7mm	0,5 mm
	Alçak ovat yaprakların genişliği	1,5x0,2-0,3mm	-
	Umbeller ışın sayısı	2-4 ışınlı	3-5 ışınlı
	Umbellulların çiçek sayısı	4-6 çiçek	4-6 çiçek
	Brakte ve brakteoller	(2)-4-5	4-5
	Brakte uzunluk		4,5-5 mm
	Brakteol uzunluk		1,5-2,5 mm
	Meyve boyutları	2 mm (merikarp)	2,2x2,8mm (en boy tüm meyve)
	Çiçek		1,3x1,6mm
	Pistil		0,88x1,7mm
	Stamen		Flament:0,39 Anter:0,19
	Sepal		0,61x0,84 mm
S. lazica		**Flora**	**Bizim ölçümlerimiz**
	Gözde uzunluğu	70-90 cm	70-90 cm
	Bazal yapraklar	Petiol: 20cm Yaprakçık:4-5x3-3,5 cm Petiolul: 1cm	Petiol: 15-20cm Yaprakçık:6-10x2,5-7 cm Petiolül: 1-5cm
	Umbeller ışın sayısı	9-15 ışınlı	14-18 ışınlı
	Meyve boyutları	3 mm(merikarp)	1,7-2,5x2,5mm(en boy tüm meyve)
	Çiçek		1,3x1,6mm
	Pistil		0,78x044mm
	Stamen		Flament:0,74mm Anter: 0,5mm
	Sepal		1,5x0,9 mm



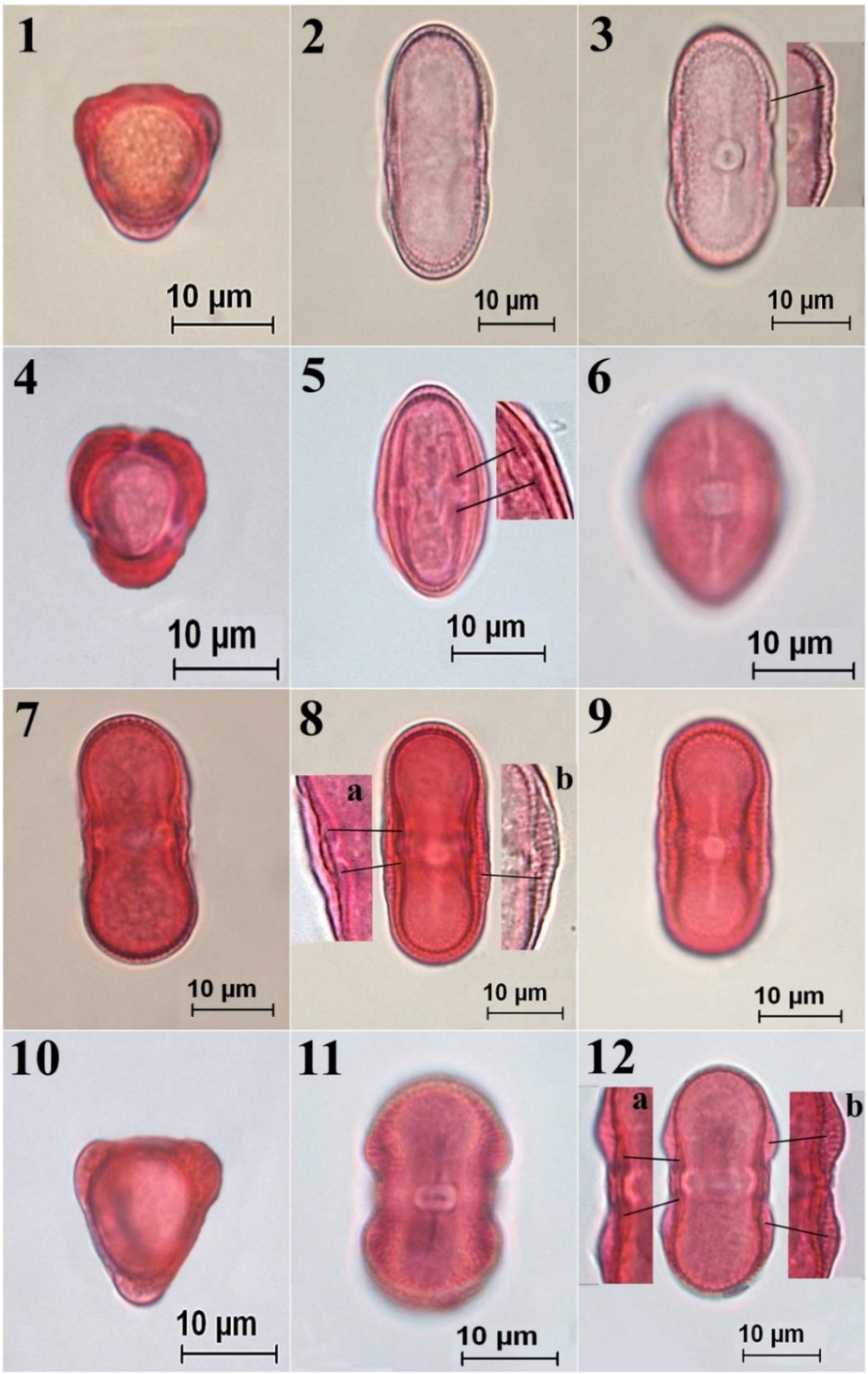
Şekil 8. A. *S. lazica* morfolojik çizim, **B.** *S. capillifolia* morfolojik çizim.

Polen analiz sonuçları

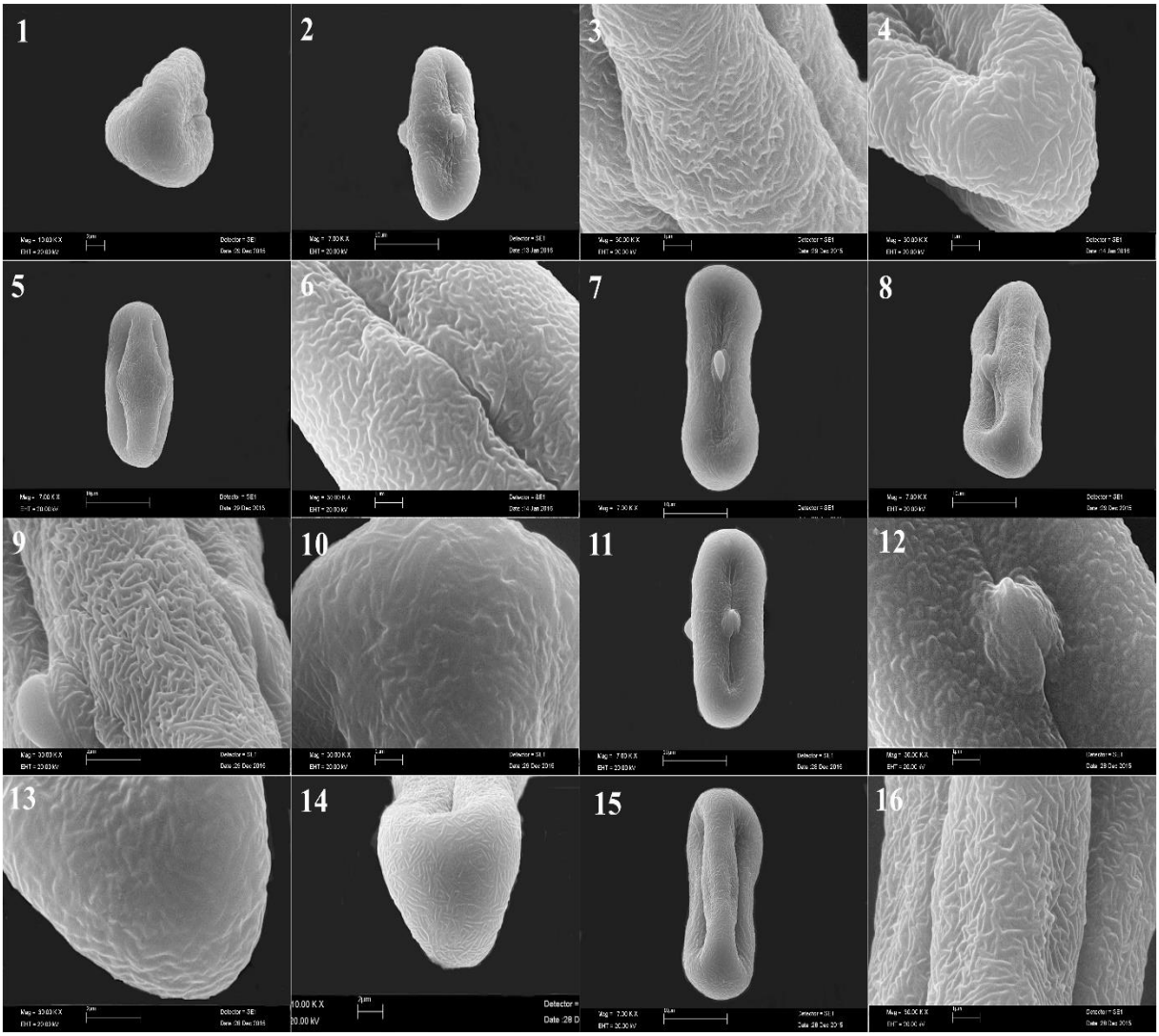
Scaligeria türlerinin polen analizleri yapılmış sonuçları Şekil 9-12 ve Tablo 10'da görülmektedir.



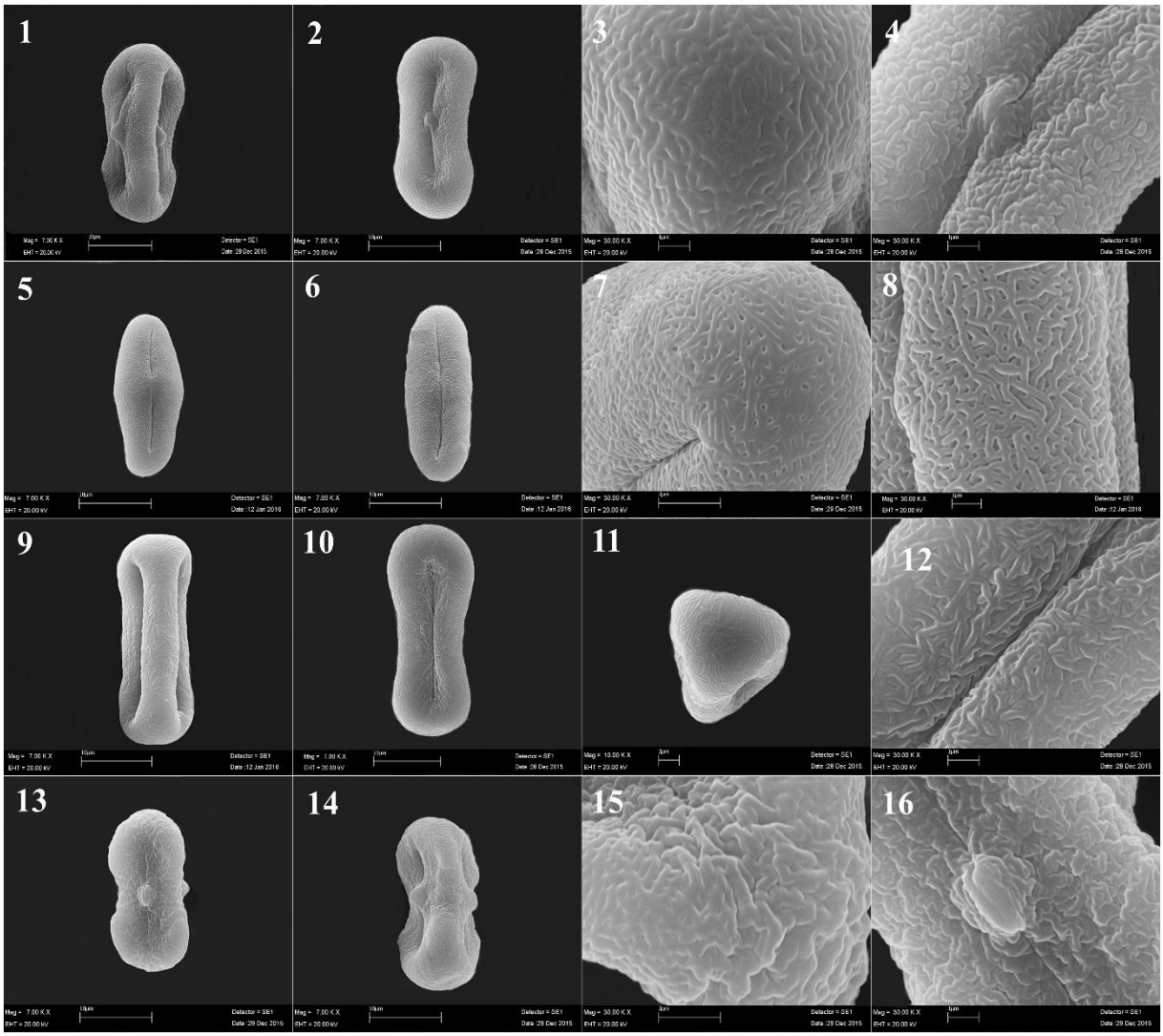
Şekil 9. *Scaligeria*'nın polen morfolojisi (ışık mikroskobu görüntüleri). 1-4 *S. capillifolia*, 4a: Fastigum, 4b: Ekzin yapı. 5-7 *S. glaucescens*. 8-10 *S.hermonis*. 11-13 *S. lazica* (Rize-Çamlıhemşin). 14-16 *S. lazica* (Trabzon-Köprübaşı).



Şekil 10. *Scaligeria*'nın polen morfolojisi (ışık mikroskobu görüntüleri). 1-3 *S. lazica* (Trabzon-Sümela). 4-6 *S. meifolia*. *7-9 S. napiformis* 8a:Fastigum, 8b:Ekzin yapı. 10-12 *S. tripartita* 12a:Fastigum, 12b:Ekzin yapı



Şekil 11. *Scaligeria*'nın polen morfolojisi (taramalı elektron mikroskobu görüntüleri) (SEM). 1-3 *S. capillifolia*, 4-6 *S. glaucescens*. 7-11 *S. hermonis*. 12-13 *S. lazica* (Trabzon-Köprübaşı). 14-16 *S. lazica* (Rize-Çamlıhemşin).



Şekil 12. *Scaligeria*'nın polen morfolojisi (taramalı elektron mikroskobu görüntüleri) (SEM). 1-4 *S. lazica* (Trabzon-Sümela). 5-8 *S. meifolia. 9-12 S. napiformis*. 13-16 *S. tripartita*

Tablo 10. *Scaligeria* türlerinin polen morfolojik ölçümleri.

Tür	**Kutup eksenleri (P) (µm)**			**Ekvatoral eksen (E) (µm)**			**P/E**	**Polen şekli**		**Kenarlar**	**Ekzin kalınlığı (µm)**	**Intin kalınlığı (µm)**
	Min	**Mak**	**Ort**	**Min**	**Mak**			**Ekvatoral görünüş**	**Kutupsal görünüş (Amb)**			
S. capillifolia	33.1	37	35.2	23.3	30	1.75-2.5	0.3-0.5	Subprolate	Triangular	Convex to subparalel	1.75-2.5	0.3-0.5
***S. lazica* (A)**	18.5	25.7	22.3	12.3	16.5	1.5-1.7	0.5-1.0	Prolate	Triangular to subtriangular	Concave to subparalel		
***S. lazica* (B)**											1.5-1.7	0.5-1.0
***S. lazica* (C)**												
S. meifolia	19.5	23.3	20.9	11.3	13.8	0.9-1.3	0.5	Prolate	Triangular	98% Convex, 2% Convex to subparalel	0.9-1.3	0.5
S. napiformis	23.1	27	25.1	13.8	17.2	2.0-2.5	0.5	Prolate	Triangular	98% Concave to subparalel, 2% concave	2.0-2.5	0.5
S. tripartita	18.4	23	20.7	9.8	12.2	1.5-2.0	0.75	Prolate	Triangular	Concave	1.5-2.0	0.75

Tablo 10. (devam)

Tür	Ornamentasyon		Apertur tipi	Kolpi (µm)		Por			
	Kutup görünüşü	**Ekvatoral görünüş**		**Clg**	**Clt**	**Plg**	**Plt**	**Yapı**	**Şekil**
S. capillifolia	Striate	Striate-rugulate	Tricolporate	13.0-15.0	0.5-0.9	2-2.5	4.0-4.5	Hafifçe çıkıntı yapmayan kalın endeksin	lalongate
S. glaucescens	Striate-rugulate	Striate-rugulate	Tricolporate	13.0-15.0	0.8-1.2	2.0-3.0	2.5-3.5	Hafifçe çıkıntı yapan, kalınlaşmış endeksin, ekteksin kemer	lalongate
S. hermonis	Striate	Striate	Tricolporate	15.0-18.7	1.0-2.0	0.9-1.5	3.3-5.0	Hafifçe çıkıntı yapan, kalınlaşmış endeksin, ekteksin kemer	rectangular elliptical
***S. lazica* (A)**	Striate	Striate-rugulate	Tricolporate	14.0-17.5	1.2-2.0	3.0-3.5	3.5-4.0	Hafifçe çıkıntı yapan, kalınlaşmış endeksin, ekteksin kemer	
***S. lazica* (B)**	Granulate-perforate	Verrucate							lalongate
***S. lazica*(C)**	Rugulate	Rugulate							
S. meifolia	Striate reticulate	Striate reticulate	Tricolporate	16.0-19.7	1.0-2.0	1.2-1.7	1.5-3.0	Genellikle gömülü kalın endeksin	lalongate
S. napiformis	Striate	Rugulate	Tricolporate	12.0-13.0	0.5-1.0	2.0-2.5	1.5-2.0	Hafifçe çıkıntı yapan, kalınlaşmış endeksin, biraz ekstüksein kemer	lalongate
S. tripartita	Rugulate	Rugulate	Tricolporate	13.0-15.0	0.5-0.75	3.0-3.5	3.5-4.0	Çıkıntı yapan, kalınlaştırılmış endeksin, ekstrüksin kemer	rectangular elliptical

4.3. Anatomik Çalışmalar

Her iki türün gövde, ışın, pedisel, brakte, brakteol, meyve, yaprak ve pedunkul özellikleri Tablo 11'de görülmektedir.

Tablo 11. *S. capillifolia* ve *S. lazica* türlerinin anatomik özelliklerinin karşılaştırılması.

Tür	Gövde	Işın	Pedisel	Brakte	Brakteol	Meyve	Yaprak	Pedunkul
S. capillifolia	Enine kesitte; daire şeklinde kütikula dalgalı, epiderma hücreleri kare veya dikdörtgen şekilli hemen altında 7-8 sıralı parenkima hücreleri ve kollenkima hücreleri sıralanmış. -Parenkima hücrelerinin ortasında ve kollenkima hücrelerinin ortasında birer salgı kanalı var. iletim demetleri çok sayıda sklerenkima dalgalı daire şeklinde kambiyum belirsiz özde çok sayıda küçük salgı kanalı mevcutiletim demeti arasındaki parenkimalar bol miktarda nişasta içerir.	Enine kesitte: Daire şeklinde hafif kenarları dalgalı kutikula belirgin, epiderma hücreleri küçük dikdörtgen şeklinde iletim demetleri 5'li ve hepsinin tepesinde iri salgı hücreleri var. Epiderma altındaki hücreler kollenkima	Enine kesitte; 4-7 adet salgı kanalı özde bulunur.kutikula dalgalı epiderma dikdörtgen ince uzun hücrelerden oluşur.6-7 sıralı klorenkima (?) 2-4 sıralı parenkima içinde nişasta mevcuttur, Prarenkima hücreleri içerisinde gömülü halde irili ufaklı salgı kanalları hemen altında floem ksilen ve merkezde iletim demetleri mevcut.	Enine kesitte; genel şekli kordat, kutikula ince ve dalgalı, altında epiderma hücreleri onun altında 1-2 sıralı palizat parenkiması mevcut.2 kösede bir adet merkez de olmak üzere 3 adet salgı kanalı ve iletim demeti bulunmaktadır.	Enine keistte şekli üst epidermadan haifif basık daire şeklinde kutikula ince altında iri epiderma hücreleri var ve dikdörtgen kare şekilli 2-3 sıralı palizat ve 3 adet iletim demeti mevcut bunlardan ikisi merkezde birisi ortada konumlanmış, yine aynı şekilde konumlanmış salgı kanlaları mevcuttur. Palizat ve palizatın altında sünger parenkiması var.	Merikarplar daire şeklinde çıkıntılar belirgin değil ancak 5 adet	Monofasiyal tipte, 1-2 sıralı palizar içermektedir.3 tane salgı kanalı ve salgı kanalalrı içermektedir.	Hafif daire şeklinde 7 adet salgı kanalı mevcut, kutikulası dalgalı, belirgin altında dikdörtgen şeklinde ince epiderma hücreleri altında dört beş sıralı klorenkima hücreleri var. Altında parenkima hücreleri mevcut. 8 adet iletim demeti ve özde iri parenkima hücreleri mevcut.

Tablo 11. (devamı).

	Gövde	Işın	Pedisel	Petiol	Petiolül	Meyve	Yaprak	Pedunkul
S. lazica	Hafif dalgalı dairemsi kutikula belirgin epiderm hücreleri dikdörtgenimsi irili ufaklı 6-7 sıralı kollenkima kümeleri ve aralarında 5-6 sıralı klorenkima hücreleri bunlaraın altında iri parenkima hücreleri onların içinde de gömülü salgı kanalları mevcuttur. Sayısı (?). örtü tüylerinin kutikulası noktacıklı cok hücreli	Kutikula belirgin dalgalı epiderma altında kollenkima ve klorenkima mevcut. Bunkların altında da palizata gömili olarak bulunan 4 salgı kanalı 3'lü iletim demeti bulunmaktadır. örtü tüyleri yine aynı şekildedir	Daire şeklinde kutikulası belirgin, dalgalı epiderma altında iri epiderma hücreleri dikdörtgenimsi ve oval altında 3-4 sıralı klorenkima hücreleri bulunmaktadır. Ortada iletim demeti parenkimaya gömülü, iki adet salgı kanalı bulunmaktıdır. tüyler aynı tiptedir.	Yumurta şeklinde ince küçük dikdörtgenimsi epiderma hücreleri altında 5-6 sıralı kollenkima altında iri parenkima ve içine gömülü 9 adet salgı kanalı bulunmaktadır. Aralarında ise sekiz adet salgı kanalı bulunmaktadır. Floemde nişastalar görülür.	Yumurta şeklinde kollenikima-5 sıralı altında iri parenkima hücreleri var. 5 adet ieltim demeyi ve 5 iletim demetinin üstünde salgı kanalları mevcuttur. Yine 6 adet üstlerinde bir adet te orta salgı kanalı mevcuttur.	Merikarpların birleşme yerinde 4+4 salgı kanalları mevcut. 5 adet çıkıntısı var. Valekulumda gömülü salgı kanalları mevcut. Kostalarda birer salgı kanalı var. Örtü tüyleri mevcut aynı tipte.	Bi fasiyal tipte yaprak kütikül haifif dalgalı ve kare şeklinde epiderma hücreleri mevcut. Altında genelde 1-2 sıralı palizat ve altında sünger parenkiması var. Orta damarda; üst epidermanın altında 6-7 sıralı kollenkima altında parenkima, ve parenkimanın son sırasında salgı kanalı ve altında iletim demeti bulunmaktadır. merkezde iletim demeti halkası var. Sonrasında üç adet salgı kanalı. Seyrek tüylü, stoma alt epidermada ve diastik.	Kutikulası dalgalı, tüyler daha fazla kutikula ince epiderma hücreleri kare şeklinde, 7-8 sıralı kollenkima mevcut. Yine 5-6 sıralı klorenkima hücreleri mevcuttur. Altındas parekimaya gömülü halde bulunan 7 adet salgı kanalı parenkima 4-5 sıralı 11 adet iletim demeti kambiyum belirgin iletim demetleri altında salgı kanalı var.

4.4. Uçucu yağ analiz çalışma sonuçları

Türlerin uçucu yağlarının verimleri Tablo 12'de görülmektedir.

Türler	Toplayıcı Numarası	Yağ verimleri* (%)
S. lazica	Paksoy 2055	0.19
S. lazica	Paksoy 2049	0.08
S. lazica	Paksoy 2050	0.38
S. capillifolia	Paksoy 2081	0.18

Scaligeria cins bazında kemotaksonomik açıdan yorum yapabilmek adına *S. lazica* ve *S. capillifolia* türlerinin uçucu yağ analiz sonuçları ile birlikte diğer 5 *Scaligeria* türününde yağ bileşenleri Tablo 13'de verilmiştir.

Table 12. *Scaligeria* türlerinin çiçekli toprak üstü kısımlarının uçucu yağlarının relatif yüzdeleri (%).

RRI	Bileşik	SM-1 Siirt	SM-2 Mardin	SC-1 Osmaniye	SL-1 Artvin	SL-2 Trabzon köprübaşı	SL-3 Trabzon altındere	SG-1 Van	SH-1 Konya	ST-1 Rize
1032	α-Pinene	-	-	-	-	-	-	2.3	-	tr
1118	β-Pinene	-	-	0.5	-	-	-	4	-	-
1132	Sabinene	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-
1159	δ-3-Carene	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-
1174	Myrcene	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-
1194	Heptanal	4.9	2.2	-	-	-	-	1.10	-	-
1203	Limonene	-	-	-	-	-	-	1	-	-
1218	β-Phellandrene	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-
1244	2-Pentyl furan	-	-	-	-	-	-	tr	-	-
1246	(*Z*)-β-Ocimene	-	-	-	-	-	-	4.5	tr	-
1255	γ-Terpinene	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-
1266	(*E*)-β-Ocimene	-	-	-	-	-	-	1.8	0.1	-
1280	*p*-Cymene	-	-	-	-	-	-	1	-	tr
1290	Terpinolene	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-
1296	Octanal	-	-	-	-	-	-	0.3	0.3	-
1337	Geijerene	-	-	-	-	-	-	-	0.1	12.4
1400	Nonanal	-	-	-	-	-	-	0.2	tr	-
1466	α-Cubebene	1	1.2	-	-	-	-	0.7	0.1	-
1490	Isogeijerene	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3
1492	Cyclosativene	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-
1497	α-Copaene	**7.2**	5.2	3.8	-	0.3		12	0.7	0.1
1506	Decanal	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
1535	β-Bourbonene	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-
1544	Cogeijerene*	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Table 13. (devamı).

RRI	Bileşik	SM-1 Siirt	SM-2 Mardin	SC-1 Osmaniye	SL-1 Artvin	SL-2 Trabzon köprübaşı	SL-3 Trabzon altındere	SG-1 Van	SH-1 Konya	ST-1 Rize
1548	(*E*)-2-Nonenal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1549	β-Cubebene	-	-	0.2	-	-	-	5.2	0.8	-
1553	Linalool	-	-	-	-	-	0.4	-	0.3	0.2
1568	*trans*-α-Bergometene	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1572	Pregeijerene B	-	-	-	-	-	-	-	-	59.2
1589	β-Ylangene	-	-	-	-	-	-	0.3	0.2	-
1591	Bornylacetate	-	-	0.9	-	-	-	0.7	-	-
1594	*trans*-β-Bergamotene	-	-	0.2	-	-	0.1	-	-	-
1595	Isothymol methyl ether	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-
1597	β-Copaene	-	-	-	-	-	-		0.2	-
1600	β-Elemene	-	-	-	-	-	-	0.1	0.2	0.1
1604	Thymol methyl ether	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
1611	Terpinen-4-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1612	β-Caryophyllene	-	-	1.6	24.9	12.9	17.8	0.9	0.9	0.8
1613	Acora-2,4-diene	-	-	1.6	-	-	-	-	-	-
1614	Carvacrol methyl ether	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1617	6,9-Guaiadiene	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-
1655	(*E*)-2-Decenal	1.8	1.4	-	-	-	-	0.4	-	-
1668	(*Z*)-β-Farnesene	1	2.9	-	4	4.1	4.8	-	-	3.8
1670	*trans*-Pinocarveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1687	α-Humulene	-	-	0.5	1.8	0.9	1.2	-	0.2	-
1693	β-Acoradiene	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-
1695	(*E*)-β-Farnesene	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1704	γ-Muurolene	-	-	1.1	-	-	-	0.4	0.2	-

Table 13. (devamı).

RRI	Bileşik	SM-1 Siirt	SM-2 Mardin	SC-1 Osmaniye	SL-1 Artvin	SL-2 Trabzon köprübaşı	SL-3 Trabzon altındere	SG-1 Van	SH-1 Konya	ST-1 Rize
1707	*trans*-Muurola-4(14),5-diene*	-	-	4.6	-	-	-	-	-	-
1711	γ-Himachalene	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-
1718	4,6-Guaiadine	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
1722	Dodecanal	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-
1726	Germacrene D	-	-	-	1.6	1.1	1.2	18.7	58.9	-
1726	α-Zingiberene	-	-	-	1.9	1.1	2.1	-	-	-
1740	α-Muurolene	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-
1741	β-Bisabolene	-	-	-	-	0.6	0.9	-	-	-
1742	β-Selinene	-	-	3.4	-	-	-	-	-	-
1755	Bicyclogermacrene	-	-	-	-	-	-	0.7	2.5	0.7
1766	1-Decanol	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-
1771	γ-Bisabolene	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1773	δ-Cadinene	1.4	3.5	23	1	0.3	-	1.9	0.5	-
1776	γ-Cadinene	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-
1783	β-Sesquiphellandrene	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1786	*ar*-Curcumene	1	1.1	-	3.1	1.8	2.3	-	-	-
1827	(*E*,*E*)-2,4-Decadienal	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-
1845	(*E*)-Anethol	-	-	-	43	49.4	38	-	-	0.3
1849	Calamenene	1.6	1.1	-	-	-	-	-	0.1	-
1853	*cis*-Calamenene	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
1868	(*E*)-Geranyl acetone	tr	1.4	-	-	-	-	-	-	-
1870	*trans*-Calamenene	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-
1871	Traginone	-	-	-	-	-	-	-	-	1
1898	1,11-Oxidocalamenene	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-

Table 13. (devamı).

RRI	Bileşik	SM-1 Siirt	SM-2 Mardin	SC-1 Osmaniye	SL-1 Artvin	SL-2 Trabzon köprübaşı	SL-3 Trabzon altındere	SG-1 Van	SH-1 Konya	ST-1 Rize
1900	*epi*-Cubebol	6.2	4.5	-	-	-	-	1.2	0.1	-
1933	Tetradecanal	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
1941	α-Calacorene	-	-	3.5	-	-	-	0.2	-	-
1942	4-Hydroxy-2-methyl acetophenone	-	-	-	-	0.5	0.3	-	-	-
1945	1,5-Epoxy-salvial(4)14-ene	-	-	-	-	-	-	0.3	0.7	-
1957	Cubebol	**7.4**	5.2	-	-	-	-	1	0.1	-
1958	(*E*)-β-Ionone	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-
1973	1-Dodecanol	tr	1.1	-	-	-	-	04	-	-
1984	γ-Calacorene	-	-	1.2	-	-	-	-	-	-
2001	Isocaryophylleneoxide	-	-	-	tr	1	0.5	-	-	-
2008	Caryophyllene oxide		9.8	2.6	9.8	7.7	3	1.9	0.9	0.1
2037	Salvial-4(14)-en-1-one	-	3.1	-	-	-	-	1.5	1.9	-
2050	(*E*)-Nerolidol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2053	Anisaldehyde	-	-	-	-	0.3	0.4	-	-	-
2071	Humulene epoxide-II	-	1.7	0.6	-	-	tr	0.2	-	-
2080	Cubenol	0.9	1.2	-	-	-	-	-	-	-
2084	Octanoic acid	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
2088	1-*epi*-Cubenol	2.2	28	-	-	-	-	0.4	-	-
2095	Hexylbenzoate	4.1	3.7	-	-	-	-	-	-	-
2096	Elemol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,.
2130	Salviadienol	-	-	-	-	-	-	0.7	0.8	-
2131	Hexahydrofarnesyl acetone	1.3	2.3	-	-	-	-	0.2	-	-
2143	Rosifoliol	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
2144	Spathulenol	3.8	2.5	0.2	tr	0.9	0.5	1.9	2.9	0.1

Table 13. (devamı).

RRI	Bileşik	SM-1 Siirt	SM-2 Mardin	SC-1 Osmaniye	SL-1 Artvin	SL-2 Trabzon köprübaşı	SL-3 Trabzon altındere	SG-1 Van	SH-1 Konya	ST-1 Rize
2148	(Z)-3-Hexen-1-yl benzoate	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-
2148	Dictamnol	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-
2113	Guaiyl acetate	-	-	2	-	-	-	-	-	-
2161	Muurola-4,10(14)-dien-1-ol	1.4	2.3	2.3	-	-	-	0.8	-	-
2166	Osmorhizol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2179	nor-Copaonone	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-
2179	1-Tetradecanol	4.9	2	-	-	-	-	0.4	-	-
2180	Junenol (=Eudesm-4(15)-en-6-ol)	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-
2180	β-Copaen-4α-ol*	3.9	4.9	-	-	-	-	-	-	-
2187	T-Cadinol	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-
2209	T-Muurolol	-	-	0.4	-	-	-	-	0.4	-
2214	*ar*-Turmerol	-	1.7	-	-	0.3	0.1	-	-	-
2219	δ-Cadinol (=α-muurolol)	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-
2247	*trans*-α-Bergamotol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2255	α-Cadinol	-	-	-	-	-	-	0.3	0.5	-
2256	Cadalene	-	-	1	-	-	-	-	-	-
2273	Selin-11-en-4α-ol	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-
2278	Torilenol	-	-	-	-	-	-	2	1.4	-
2300	Tricosane	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
2316	Caryophylla-2(12),6(13)-dien-5β-ol (=*Caryophylladienol I*)	-	2	-	-	0.7	0.2	-	-	-
2369	Eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	-	-	-	-	-	-	2	2.1	-
2384	1-Hexadecanol	2.3	2.2	-	-	-	-	-	-	-

Table 13. (devamı).

RRI	Bileşik	SM-1 Siirt	SM-2 Mardin	SC-1 Osmaniye	SL-1 Artvin	SL-2 Trabzon köprübaşı	SL-3 Trabzon altındere	SG-1 Van	SH-1 Konya	ST-1 Rize
2392	Caryophylla-2(12),6-dien-5β-ol (=*Caryophyllenol II*)	-	-	0.4	-	0.6	0.3	-	-	-
2411	4-Isopropyl-6-methyl-1-tetralone	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-
2456	Methyl oleate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2500	Pentacosane	3.6	4.2	-	-	-	-	-	-	-
2509	Methyl linoleate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2568	14-Hydroxy-α-muurolene	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-
2607	14-Hydroxy-δ-cadinene	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-
2622	Phytol	-	1.9	-	-	-	-	-	0.5	0.1
2663	(Z)-Pseudoisoeugenyltiglate			-	tr	0.9	2.9	-	-	0.2
2700	Heptacosane	1.1	2.7	-	-	-	-	-	-	-
2766	(*E*)-Pseudoisoeugenyltiglate	-	-	-	tr	0.7	0.8	-	-	-
2800	Epoxy-*trans*-pseudoisoeugenyl angelate	-	-	-	5.7	6.7	16.4	-	-	8.7
2887	Epoxy-*trans*-pseudoisoeugenyl tiglate	-	-	-	3.2	2	1.8	-	-	-
2900	Nonacosane	3.2	1.8	0.4	-	-	-	1.6	-	-
2931	Hexadecanoicacid	7.1	5.3	0.3	tr	1.3	0.7	3.6	-	-
	Total identified (%)	**89.1**	**88.9**	**59.7**	**100.0**	**96.9**	**97**	**85.3**	**82.7**	**90.6**

RRI n-alkanlar serisine karşı relatif retansiyon indisleri hesaplanmıştır.
% FID verilerinden hesaplanmıştır
tr eser (< 0.1 %)
*Adams and Başer kütüphanelerinden faydalanılmıştır.

4.5. Antimikrobiyal aktivite sonuçları

S. lazica ve *S. capillifolia* uçucu yağlarına ait minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri Tablo14'de görülmektedir.

Tablo 14. Uçucu yağlara ait minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri (MIK, mg/mL)

Bitki Kodları	***Bacillus cereus* NRRL B-3711**	***Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1026**	***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145**	***Candida albicans* ATCC 90028**
SC-1	0,25	0,25	0,5	0,5
SL-1	0,5	0,5	0,5	0,5
SL-2	0,5	0,5	0,5	0,5
SL-3	0,5	0,5	0,5	0,5
Amfoterisin B	-	-	-	0,064
Kloramfenikol	8	2	4	-
Ketokenazol	-	-	-	0.25

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

SSR markörlerinin ko-dominant olması ve yüksek oranda polimorfik olmalarından dolayı genetik çeşitlilik, popülasyon yapısı analizlerinde, genetik haritalama çalışmalarında, parmak izi çalışmaları ve ebeveyn belirleme çalışmalarında en sık tercih edilen markörlerdir. Ancak SSR primerleri türe özgü olduğundan her bir tür için primer geliştirirken sekans bilgisine ihtiyaç duyulur. Yeni nesil sekanslama teknolojisinde kısa zaman ve daha düşük maliyetle binlerce SSR lokusunu üretme fırsatı sunuyor. Ancak laboratuvarlarda bu testleri uygulamak hala pahalı ve zaman alıcıdır. Fakat SSR lokusları geliştirildikten sonra çok güçlü ve ajantajlı yöntemlerdir.

Bu çalışmada 15,14G Illumina datasından, 1,982 SSR primer çifti başarılı bir şekilde dizayn edildi. En fazla tekrarlar dinükleotit (70.63%) tekrarlardan elde edildi. *Scaligeria'*da en fazla bulunan dinükleotit motif ise TC/GA motifi olduğu görülmüştür. Popülasyonlar arasında, Rize'den toplanan örnekler (RCE) en yüksek genetik çeşitlilik ve polimorfizm oranına sahiptir. Trabzon'dan toplanan Sumela (TSM) örnekleri ise en düşük seviyede genetik çeşitlilik ve polimorfizm oranına sahipken, gene bu lokasyondan alınan örneklerin sahip olduğu özel allel sayısı ve polimorfizm seviyesi de en düşüktür..

Sonuç olarak, yeni nesil sekanslama teknolojisi ile *S. lazica'*da **ilk kez** yeni SSR primerleri geliştirildi. *S. lazica'*da dinükleotit tekrarlar en fazla bulunan motif olmuştur (70.63%). Daha sonra ise trinükleotit (11.5%) ve hekzanükleotit tekrarlar (11.3%) gelmiştir. SSR'lar kodominant markörlerdir. Geliştirilen SSR markörleri farklı lokasyonlardan toplanan *S. lazica* örneklerinin genetik varyasyon, popülasyon yapısı ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

Bu çalışmada geliştirilen SSR markörleri, diğer *Scaligeria* türlerine transfer edilebilirliğini test etmek içinde analizler kullanılmıştır. 4 popülasyona ait 40 adet *S. lazica* genotipinde 40 adet mikrosatellit primeri kullanılmıştır. Bu primerler ayrıca daha önce Anabilim dalımızda mevcut diğer *Scaligeria* türlerinden de (*S. napiformis, S. meifolia, S. tripartita, S. glaucescens* ve *S. hermonis*) 2 şer örnek kullanarak geliştirilen SSR primerlerinin transfer edilebilirliği test edilmiştir. 40 adet primerle SSR-PCR yapılan primerlerin bu türlerde çalışma durumuna bakılmıştır. *S. napiformis* ve *S. tripartita* türlerinin toplam 39 primerde (% 97.5) bant verdiği ve bu primerlerin transfer edilebilirliğin en fazla bu türlerde olduğu gözlemlenmiştir. *S. meifolia* türünün 10 adet primerde (%25) bant verdiği, *S. glaucescens* türünün 5 adet primerde (% 12,5) bant verdiği, *S. hermonis* türünün 3 adet primerde (% 7,5) bant verdiği gözlenmiştir. Tüm bu 5 türde amplifiye olan primer sayısı ise 2 (% 5) tanedir.

Ancak yapılan bu primerlerin transfer edilebilme çalışması denenen türlerdeki genotip sayılarının az olması sebebi ile, sonraki çalışmalarda daha fazla genotip ile yapılması hedeflenmektedir.

Uçucu yağ analiz çalışmalarında ise daha önce çalışılan diğer 5 *Scaligeria* türünün sonuçları da çalışmaya dahil edilmiş böylece *Scaligeria* cins bazında kemotaksonomik olarak değerlendirilebilmiştir. Buradaki bulgulara göre özellikle *S. lazica* ve *S. tripartita* uçucu yağlarının ana bileşenleri daha önce aynı familyadaki yalnızca *Pimpinella* türlerinde tespit edilen kimyasal markörler olarak bulunmuştur. Kimyasal içerik bakımından bu iki türün *Scaligeria* cinsinden kesin bir şekilde ayrıldığı ve *Pimpinella* cinsine dahil edilebileceği kanısına varılmıştır.

Morfolojik çalışmalarda ise özellikle yine *Scaligeria* cins bazında değerlendirilen polen analizlerinde de moleküler ve kimyasal çalışma sonuçlarına yakın bulgular elde edilmiştir. Özellikle *S. lazica* farklı lokalitelerden toplanan örnekler arasında görülen çeşitlilik dikkat çekicidir.

Sonuç olarak bu proje çalışmasında hedeflenen iş paketleri başarı ile tamamlanmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda diğer *Scaligeria* türlerinde birey sayıları arttırılarak *S. lazica*'dan elde edilen SSR markörlerin, diğer *Scaligeria* türlerine transfer edilebilirliği araştırılacaktır.

Projeden elde edilen sonuçların sunulduğu ulusal ve uluslararası kongre / sempozyumlarda poster / sözlü bildiriler ile uluslararası indekslerde taranan hakemli dergilerde kabul edilmiş ve işlemde olan makalelerin çıktıları aşağıda özetlenmiştir.

1- İlk kez *Scaligeria* cinsi için geliştirilen SSR markörleri farklı lokasyonlardan toplanan *S. lazica* örneklerinin genetik varyasyon, popülasyon yapısı ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Bu çalışmada geliştirilen SSR markörleri, diğer *Scaligeria* türlerine transfer edilebilirliğini test etmek içinde analizlerde kullanılmıştır. Bu çalışmamız 2017 yılında yayına kabul edilmiştir.

Yayın Bilgisi: Ayşe Baldemir, Hayat Topçu, Mehmet Yavuz Paksoy, Elmira Ziya Motalebipour, Salih Kafkas. First microsatellite markers for *Scaligeria lazica* Boiss. (Apiaceae) by next-generation sequencing: population structure and genetic diversity analysis. Biotechnology & Biotechnological Equipment, DOI: 10.1080/13102818.2017.1301784.

2- *S. lazica* ve *S. capillifolia* türleri ile birlikte *Scaligeria* cins bazında uçucu yağ analizleri yapılmış ve kemotaksonomik olarak çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle *S. lazica* ve *S. tripartita* türlerinin bu cinsten ayrılabileceği kanısına varılmıştır.

Yayın Bilgisi: Chemical Composition of The Essential Oil and Antimicrobial Activity of *Scaligeria* DC. Taxa and Implications for Taxonomy. Makalemiz uluslararası indekste taranan bir dergide hakem değerlendirmesindedir.

Aynı çalışma yayın öncesinde Ulusal bir kongrede sözlü bildiri olarak sunulmuştur. Bilgileri aşağıdaki şekildedir.

Baldemir, A., Demirci, B., Demirci, F., Paksoy, M.Y., İlgün, S., Koşar, M., Başer, K.H.C. *Scaligeria* DC. Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimi ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Taksonomiye Katkıları, XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 31 Ağustos- 5 Eylül 2016, Trabzon [SC4].

3- Morfolojik çalışmalarda ise özellikle polen analiz sonuçları moleküler çalışmamızda *S. lazica*'nın farklı lokasyonları arasında görülen polimorfizmi destekler niteliktedir.

Yayın Bilgisi: The pollen morphology of *Scaligeria* DC. (Apiaceae) and its taxonomic significance. Makalemiz uluslararası indekste taranan bir dergide hakem değerlendirmesindedir.

4- *Scaligeria*'nın diğer türleri ile ilgili proje çalışmamızı destekler nitelikteki yayınımız 2016 yılında basılmıştır.

Yayın Bilgisi: Baldemir, A., Demirci, B., Ilgün, S., Koşar, M., Paksoy, M.Y., Essential oil composition of *Scaligeria napiformis* native to Turkey, Chemistry of Natural Compounds, 52(6): 1100-1101, 2016.

Aynı çalışma yayın öncesinde Uluslararası bir sempozyumda poster bildiri olarak sunulmuştur.

Baldemir, A., Demirci, B. , İlgün, S., Koşar, M., Paksoy, M.Y., Essential Oil Composition of *Scaligeria napiformis* (Sprengel) Grande Native To Turkey, 45th International Symposium on Essential Oils, İstanbul, Türkiye, 3-7 Eylül 2014, vol.1, pp.74.

KAYNAKLAR

Arıas Dıaz Mm., Batzer Jc., Harrington Tc., Wong Aw., Bost Sc., Et Al., Diversity And Biogeography Of Sooty Blotch And Flyspeck Fungi On Apple İn The Eastern And Midwestern United States, *Phytopathology*, 100, 345–355, (2010).

Bakkalı F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., Biological Effects of Essential Oils- A Review, *Food And Chemical Toxicology*, 46, 446-75, (2008).

Başer Khc., Özek T., Kürkçüoğlu M., The Essential oil of *Scaligeria lazica* Boiss., *J. Essent. Oil Res*., 5, 463- 64, (1993).

Başer Khc., Özek T., Kürkçüoğlu M., The Essential oil of *Scaligeria lazica* Boiss., *J. Essent. Oil Res*., 7, 557-58, (1995).

Buschıazzo E., Gemmell Nj., The Rise, Fall And Renaissance of Microsatellites İn Eukaryotic Genomes, *Bioessays*, 28(10), 1040-50, (2006).

Catherıne Mh., Somutria G., Todd Ja., Microsatellites For Linkage Analysis of Genetic Traits**,** 8(8), (1992).

Cavagnaro PF, Chunh S-M, Manin S, Yıldız M, Ali A, Alessandro MS, Lorizzo M, Senalik DA, Simon PW, microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. BMC Genomics, 2011; 12(386): 2-20.

Davis P H, Mill Rr., Chamberlain Df., Phill D., Mathews Va., Flora of The Turkey And The East Aegean Islands, Ed.Davis P.H., Vol. 4, Edinburgh University Press, Edinburgh, (1972). Pp: 333-40.

Davis Ph, Mill Rr., Flora Of The Turkey And The East Aegean Islands, Tan, K. (Eds.), Vol.10, Edinburgh University Press, Edinburgh, (1988). Pp: 418.

Degtjareva GV, Kljuykov EV, Samigullin TH, Valiejo-Roman CM, Pimenov MG, molecular appraisel of *Bunium* and some related arid subarid geophilic Apiaceae-Apioideae taxa of the Ancient Mediterenean. Bot J Linn Soc. 2009; 160: 149-170.

Degtjareva GV, Kljuykov EV, Samigullin TH, Valiejo-Roman CM, Pimenov MG, ITS phylogeny of Middle Asian geophilic Umbelliferae-Apioideae genera with comments on their morphology and utility of psbA-trnH sequences. Plant Syst Evol. 2013; 299(5): 985-1010.

Doğan, B., Duran, A., Bağcı, Y., Dinç, M., Martin, E., Çetin, Ö., Öztürk, M., Phylogenetic Relationship Among The Taxa Of The Genus *Johrenia* Dc. (Apiaceae) From Turkey Based On Molecular Method, *Bangladesh J. Plant Taxon*, 17(2): 113-120, (2010).

Doğrar N., Akkaya Ms., Optimization Of Pcr Amplification Of Wheat Simple Sequence Repeat Dna Markers, *Turkish Journal Of Biology*, 25, 153-158, (2001).

Downie Sr., Katz-Downie Ds., Spalic K., A Phylogeny Of Apiaceae Tribe Scandiceae: Evidende From Nuclear Ribosomal Dna Internal Transcribed Spacer Sequences, *American Journal Of Botany*, 87(1), 76-95, (2000b).

Downie Sr., Katz-Downie Ds., Watson Mf., A Phylogeny Of The Flowering Plant Family Apiaceae Based On Chloroplast Dna *Rpl16* And *Rpoc1* Intron Sequence: Towards A Suprageneric Classification Of Subfamily Apioideae, *American Journal Of Botany*, 87(2), 273-92, (2000a).

Ekblom R, Galindo J, applications of next generation sequencing in moleculr ecology of non-model organisms. Heredity. 2011; 107: 1-15.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti Ve Tohumlu Bitkiler), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Barışcan Ofset, Ankara, (2000), s. 11-35.

Ellegren H., Variable Sıne 3' Poly (A) Sequences İn The Pig Genome: An Abundant Class Of Genetic Markers, *Mammalian Genome*, 4, 429-434, (1993).

Fu N, Wang P-Y, Liu X-D, Shen H-L, use of EST-SSR Markers for evaluating genetic diversity and fingerprinting Celery (*Apium graveolens* L.) cultivars. Molecules. 2014; 19: 1939-1955.

Fu N, Wang Q, Shen Huo-Lin, de novo assembly, gene annotation and marker development using illumina paired-end transcriptome sequences in Celery (*Apium graveolens* L.). Plos One. 2013 February 28. doi: 10.1371/journal.pone.0057686

Goulao L., Monte-Corvo L., Oliveira Cm., Phenetic Characterization Of Plum Cultivars By High Multiplex Ratio Markers: Amplified Fragment Length Polymorphisms And İnter-Simple Sequence Repeats., *J Am Soc Hort Sci.*, 126, 72-77, (2001).

Gulsen D., Li Cc., Chauhan A., Dispersion Of Dmpc Liposomes İn Contact Lenses For Ophthalmic Drug Delivery, *Curr Eye Res.*, 30(12), 1071–1080, (2005).

Güner A., Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları Flora Dizisi 1, İstanbul, (2012), 77-78.

Hamblın M. Et Al, Sequence Variation At Candidate Loci İn The Starch Metabolism Pathway İn Sorghum: Prospects For Linkage Disequilibrium Mapping. *Crop Sci.*, 47, 125-34, (2007).

Hamblin MT, Warburton, ML, Buckler ES, empirical comparis of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. Plos ONE. 2007; 2: el1367

Hua Z, Tatsumi E, He D, Te L, angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product. 2006; 98(3): 551-557

Huang Y, Guo X, Liu F, Chen Y, Russell TP, Han CC, improving the ordering and photovoltaic properties by extending π–conjugated area of electron-donating units in polymers with D-A Structure. Advanced Materials. 2012; 24(25): 3383-3389

Jarıc S., Mitrovic M., Djurdjevic L., Kostic O., Gajic G., Phytotherapy İn Medieval Serbian Medicine According To The Pharmacological Manuscripts Of The Chilandar Medical Codex (15-16th Centuries), *Journal Of Ethnophatmacology*, 137, 601-19, (2011).

Jewell, MC, Frere CH, Prentis PJ, Lambrides CJ, Godwin ID, characterization and multiplexing of EST-SSR primers in *Cynodon* (Poaceae) species. Am J Bot. 2010; 97: e99-e101.

Jing Z, Rouillon C, Kerou M, Reeks J, Brukker K, Graham S et al., structure and mechanism of the cmr complex for crispr-mediated antiviral immunity. Molecular Cell. 2012; 45(3): 303-313.

Jones BL, Waycott M, Robson HLA, Calladine A, Page T, Isolation and caharacterization of microsatellite loci in *Santalum lanceolatum* and *Santalum leptocladum* (Santalaceae). Am J Bot. 2010; 97: e97-e98

Kalıa Rk., Rai Mk., Kalia S., Singh R., Dhawan Ak., Microsatellite Markers: An Overview Of The Recent Progress İn Plants, *Euphytica* , 177, 309-334, (2011).

Kelkar Yd., Tyekucheva S., Chiaromonte F., Makova Kd., The Genome-Wide Determinants Of Human And Chimpanzee Microsatellite Evolution, *Genome Res.*, 18, 30–38, (2008).

Lepaıs O., Bacles Cfe., Comparison Of Random And Ssr-Enriched Shotgun Pyrosequencing For Microsatellite Discovery And Single Multiplex Pcr Optimization İn *Acacia Harpophylla* F. Muell. Ex Benth, *Molecular Ecology Resources*, 11(4), Pp. 711–24, (2011).

Liang C, Luo JW, Li RF, Tu NH, a visual representation for RNA secondary structure and its application. Int J Quantum. 2011 August 8. doi: 10.1002/qua.23188

Lin C, He-Ping L, Qu B, Tao H, Jin- Xing T, Ting-Dong F, Yu-Cai L, chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons. Plant Cell Rep. 2010; 29(4): 371-381

Liu K, Muse SV, powermarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics. 2005; (9): 2128-9

Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. Gigascience. 2012; 1(1):18

Moe AM, Weiblen GD, development and characterization of microsatellite loci in dioecious figs (*Ficus*, Moraceae). Am J Bot. 2011; 98(2), e25-7

Moe Am., Weiblen Gd., Development And Characterization Of Microsatellite Loci İn Dioecious Figs (Ficus, Moraceae), *Am J Bot.*, 98(2), E25-7, (2011).

Nasir E. Umbelliferae. In: Nasir E, Ali SJ. (eds.) Flora of West Pakistan 20. Stewart Herbarium, Gordon College, Rawalpindi; 1972

Papini A, Banci F, Nardi E, molecular evidence of polyphyletism in the plant genus *Carum* L. (Apiaceae). Genet Mol Biol. 2007; 30(2): 475-482

Pimenov M. Comments by M. Pimenov to the Caucasus endemic species list of the family Apiaceae attached to the letter dated 7 th November 2007 from Dmitry Geltman to Ketevan Batsatsashvili (Caucasus Plant Red List Authority); 2007

Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A., The Comparison Of Rflp, Rapd, Aflp And Ssr (Microsatellite) Markers For Germplasm Analysis, *Mol. Breed*, 2, 225–238, (1996).

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly, P, inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 2000; 155:945–959

Rakotondralambo SOR, Lussert A, Rivallan R, Danthu P, Noyer J-L, Baurens F-C, microsatellite markers isolated from the wild medicinal plant *Centella asiatica* (Apiaceae) from an enriched genomic library. Am J Bot. 2012; 99(4): e176-e178.

Rijal DP, Falahati-Anbaran M, Alm T, Alsos IG, microsatellite markers for *Heracleum persicum* (Apiaceae) and allied taxa: Application of next-generation sequencing to develop genetic resources for invasive species management. Plant Mol Biol Rep. 2015; 33: 1381-1390.

Rohlf FJ, NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.21c. Exeter Publishing, Setauket, NY; 2009.

Rozen S, Skaletsky H, primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol. 2000;132:365-386

Sahu J, Das Talukdar A, Devi K, Choudhury MD, Barooah M, Modi MK, Sen P, e-microsatellite markers for *Centella asiatica* (Gotu Kola) genome: validation and cross-transferability in Apiaceae family for plant omics research and development. Omics. 2015; 19(1): 52-65.

Schuelke, M, an economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. Nat Biotechnol. 2000; 18: 233-234

Shendure J, Ji H, next-generation DNA sequencing. Nat Bioechnol. 2008; 26: 1135-1145

Slatkin M, Barton NH, a comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. Evolution. 1989; 43:1349–1368.

Stevens PF. *Scaligeria*. In: Davis PH (ed.) Flora of Turkey and The East Aegean Islands, vol. 4 Edinburgh: Edinburgh University Press; 1972

Straub Kl., Stella Mc., Leptin M., The Gelsolin-Related Flightless I Protein İs Required For Actin Distribution During Cellularisation İn Drosophila, *J. Cell Sci*., 109(1), 263-70, (1996).

Sui C, Zhang J, Wei J, Chen S, Li Y, Xu J et al., transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins. BMC Genomics. 2009; 12: 539

Tabanca N., Demirci B., Başer K.H.C., Mincsovics E., Khan Sı., Jacob Mr., Wedge De. Characterization Of Volatile Constituents Of *Scaligeria Tripartita* And Studies On The Antifungal Activity Against Phytopathogenic Fungi, *Journal Of Chromatography* B, 850, 221-29, (2007).

Tabanca N., Douglas Aw., Bedir E., Dayan Fe., Kirimer N., Başer Khc., Aytaç Z., Khan Ia., Scheffler Be., Patterns Of Essential Oil Relationship İn *Pimpinella* (Umbelliferae) Based On Phylogenetic Relationships Using Nuclear And Chloroplast Sequences, *Plant Genetic Resources*, 3(2): 149-169, (2005).

Tanksley Sd., Young Nd., Paterson Ah., Bonierbale Mw., Rflp Mapping İn Plant Breeding: New Tools For An Old Science, *Bio/Technology*, 7, 257-264, (1989).

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S, computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res. 2001; 11:1441

Topcu H, Ikhsan AS, Sutyemez M, Coban N, Guney M, Kafkas S, development of 185 polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from walnut (*Juglans regia* L.). Sci Hort. 2015; 194: 160-167

Tutın Tg., Heywood Vh., Burges Na., Moore Dm., Valentine Dh., Walters Sm., Webb Da., Ball Pw., Chater Ao., Asst. Ferguson Ik., Flora Europaea, Cambridge At The University Press, Vol. 2, (1968), P. 143-48.

Tuzlacı E., Türkiye Bitkileri Sözlüğü, Alfa Basım Yayın Dağıtım Şirketi, Genişletilmiş 2. Baskı, İstanbul, (2011), S. 1183.

Wang R, Yu Y, Zhao J, Shi Y, Song Y, Wang T, population structure and linkage disequilibrium of a mini core set of maize inbred lines in China. Theor Appl Genet. 2008; 117(7): 1141-1153

Yiou Pan Y, Guo H, Gao X, carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2009; 152(3): 266-270

Zakharova EA, Degtjareva GV, Kljuykov EV, Tilney PM, the taxonomic affinity of *Carum piovanii* Chiov. and some *Bunium* species (Apiaceae). S Afr J Bot. 2014; 94: 122-128

Zalapa JE, Cuevas H, Zhu H, Stefan S, Sanalik D, Zeldin E, McCown B, Harbut R, Simon P, using Next- Generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. Am J Bot. 2012; 99(1): 1-16