

**TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN *PETRORHAGIA*
TÜRLERİ ARASINDAKİ GENETİK AKRABALIĞIN
MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE TESPİT EDİLMESİ**

Muhip HİLOOĞLU
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak-2012

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Muhip HİLOOĞLU' nun '**Türkiye**'de Yayılış Gösteren *Petrorhagia* Türleri Arasındaki Genetik Akrabalığın Moleküler Belirteçlerle Tespit Edilmesi' başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 18/01/2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. EMEL SÖZEN
Üye : Prof. Dr. ERSİN YÜCEL
Üye : Yard. Doç. Dr. İSMAİL POYRAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *PETRORHAGIA* TÜRLERİ ARASINDAKİ GENETİK AKRABALIĞIN MOLEKÜLER BELİRTEÇLERLE TESPİT EDİLMESİ

Muhip HİLOOĞLU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN

2012, 82 Sayfa

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) cinsinde bulunan 9 taksona ait her birinden 5’er birey kullanarak toplam 45 bireyle çalışılmış ve PCR tabanlı teknik olan ISSR belirteçleriyle genetik akrabalık seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu taksonlar *P. dubia*, *P. prolifera*, *P. pamphylica*, *P. peroninii*, *P. saxifraga*, *P. cretica*, *P. alpina* subsp. *alpina*, *P. alpina* subsp. *olympica*, *P. lycica*’dır. Çalışmada 10 adet ISSR primeri kullanılmış olup hepsi polimorfik olan toplam 409 adet ISSR bandı oluşturmuştur. Primerlerin oluşturduğu bant sayıları 25 ile 64 arasında değişmekte olup, ortalama bant sayısı 41,1’dir. Bantların büyüklükleri 200 bç ile 2500 bç arasında değişmektedir. Elde edilen bantlar bireyler arasında var (1) ya da yok (0) olarak kaydedilmiş ve benzerlik matrisi oluşturulmuştur. İstatistik analizleri POPGENE 1.32 programı kullanılarak yapılmış ve UPGMA tekniği ile türler arası genetik uzaklıklara dayanan bir dendogram oluşturulmuştur. Sonuçlara göre birbirine en yakın *Petrorhagia* türleri *P. peroninii* ve *P. dubia* (0.0491), en uzak türler ise *P. lycica* ve *P. saxifraga* (0.1198)’dir. Bu çalışma ISSR tekniğinin *Petrorhagia* türleri arasındaki genetik akrabalığı çalışmada uygun belirteç yöntemi olduğunu göstermiştir. Bu çalışma Türkiye’de yayılış gösteren *Petrorhagia* türlerine yönelik yapılan ilk moleküler çalışmadır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar daha ileride yapılabilecek tür içi genetik çalışmalara temel hazırlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Caryophyllaceae*, *Petrorhagia*, ISSR, Genetik akrabalık

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF THE GENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN PETRORHAGIA SPECIES DISTRIBUTED IN TURKEY

MUHİP HİLOOĞLU

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Assistant Prof. Dr. EMEL SÖZEN
2011, 82 Pages

In this thesis study, it is studied with total 45 individuals by using 5 individuals belong to 9 taxa from *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) genus naturally occurring in Turkey and targeted to determine genetic relationship levels with ISSR markers that is a PCR based technique. These species are *P. dubia*, *P. prolifera*, *P. pamphylica*, *P. peroninii*, *P. saxifraga*, *P. cretica*, *P. alpina* subsp. *alpina*, *P. alpina* subsp. *olympica*, *P. lycica*. In the study, it is used 10 ISSR primers and has created totally 409 ISSR bands all of them polymorphic. The number of bands formed by primers have changed between 25 and 64, average band number is 41,1. The size of bands have changed between 200 bp and 2500 bp. The bands obtained were recorded either present (1) or absent (0) and similarity matrix was produced. Statistical analysis were performed by using POPGENE 1.32 and dendrogram based on genetic distance between *Petrorhagia* species was constructed by using UPGMA technique. According to our results the closest *Petrorhagia* species were *P. peroninii* and *P. dubia* (0.0491). The farthest species were *P. lycica* and *P. saxifraga* (0.1198). The study showed that ISSR technique can be successfully used in determination of the genetic relationships between *Petrorhagia* species distributed in Turkey. In addition our study represents the first molecular work on Turkish *Petrorhagia* species. The results obtained from this study could be used in further studies about estimation of genetic variation within any endemic *Petrorhagia* species.

Keywords: *Caryophyllaceae*, *Petrorhagia*, ISSR, Genetic relationship

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve sonuca ulaştırılmasında büyük yardımları olan ve bundan sonraki süreçte de bilgi ve deneyimlerinin bana yol gösterici olacağı danışman hocam Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN'e,

Gerek çalışma öncesinde bitki materyallerinin temini gerekse de çalışma süresince bilgilerine başvurduğum Eczacılık Fakültesi Öğretim Görevlisi Dr. İlham ERÖZ POYRAZ'a,

Yardımlarını hiç esirgemeyen Yard. Doç. Dr. İsmail POYRAZ ve Araş. Gör. Gülçin YILMAZ'a,

Maddi ve manevi destekleriyle tüm hayatım boyunca yanımda hissettiğim AİLEME,

Şükranlarımı sunarım.

Muhip HİLOOĞLU

Eskişehir, Ocak 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Caryophyllaceae</i> Familyasının Genel Özellikleri.....	3
1.1.1. <i>Caryophyllaceae</i> Familyasının Cins Teşhis Anahtarı.....	4
1.1.2. <i>Petrorhagia</i> (Ser.) Link. Cinsinin Genel Özellikleri	7
1.1.3. <i>Petrorhagia</i> (Ser.) Link. Cinsi Taksonlarının Tayin Anahtarları.....	8
1.1.4. Ülkemizde yayılış gösteren <i>Petrorhagia</i> Türlerine Ait Özellikler...10	
1.2. Genetik Çeşitlilik ve Önemi.....	14
1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	15
1.4. Belirteçler Tipleri.....	16
1.4.1. Morfolojik Belirteçler.....	16
1.4.2. Biyokimyasal Belirteçler.....	17
1.4.3. DNA Belirteçleri.....	18
1.4.3.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler (RFLP) Belirteçler.....	19
1.4.3.2. PCR Tekniğine Dayalı Moleküler Belirteçler.....	20
1.4.3.2.1. Basit iç dizi tekrarları (ISSR)	21
1.4.3.2.2. Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD).....	23
1.4.3.2.3. Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP).....	24
1.4.3.2.4. Basit tekrar dizileri (SSR).....	25
1.5. Konu İle İlgili Yapılan Çalışmalar	26
1.6. Amaç	31

2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. Materyal	32
2.2.Yöntem	34
2.2.1. Bitki Örneklerinin Labaratuar Çalışmaları İçin Hazırlanması.....	34
2.2.2. DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması	34
2.2.3. DNA Konsantrasyonunun Spektrofotometrik Ölçümü.....	37
2.2.4. ISSR-PCR Analizleri.....	38
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi İle Yürütme.....	37
2.2.6.DNA Bantlarının Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi.....	38
3. BULGULAR	40
3.1. DNA İzolasyonu	40
3.1.1. DNA Miktar ve Saflık Tayini	40
3.2. ISSR-PCR Optimizasyonu	42
3.2.1. Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu	43
3.2.2. Kalıp DNA Konsantrasyonun Optimizasyonu	44
3.2.3. Tampon ve MgCl ₂ Konsantrasyonu Optimizasyonu	46
3.2.4. Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu	44
3.3. ISSR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
KAYNAKLAR	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

2.1. Fermentas GeneRuler 100bç DNA Ladder Plus	38
3.1. GAG-(CAA)5 primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	46
3.2. VHV-(GT)7G primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	47
3.3. (GT)8YC primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	48
3.4. (AG)8T primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	49
3.5. (AG)8C primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	50
3.6. (AC)8C primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	51
3.7. (AGC)6G primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	52
3.8. (AGC)6C primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	53
3.9. BDB-(ACA)5 primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	54
3.10. DD-(CGA)5 primeri ile <i>Petrorhagia</i> bireylerinde oluşan bant profilleri.....	55
3.11. UPGMA tekniği ile <i>Petrorhagia</i> taksonları genetik uzaklık dendrogramları	60
a) Brakteler kaliksi örtmüş durumuna göre	
b) Brakteler kaliksi örtmemiş durumuna göre	
3.12. UPGMA tekniği ile <i>Petrorhagia</i> taksonları genetik uzaklık dendrogramı.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

1.1. En Sık Kullanılan PCR Temelli Belirteçlerin karşılaştırılması.....	20
2.1. Amplifikasyonda kullanılan ISSR primerleri ile ilgili ayrıntılı bilgiler.....	37
2.2. Uygulanan PCR Protokolü.....	37
3.1. PCR analizi için izole edilen örneklerin DNA miktar ve saflık değerleri.....	41
3.2. Çalışmada kullanılan primerlerin optimizasyon değerleri.....	43
3.3. ISSR primerlerinin oluşturdukları bant sayıları ve büyüklükleri.....	56
3.4. ISSR primerlerinin <i>Petrorhagia</i> taksonlarında tür içi oluşturdukları monomorfik bant sayıları.....	57
3.5. <i>Petrorhagia</i> cinsine ait 9 takson için polimorfik lokus sayı ve yüzdeleri.....	58
3.6. <i>Petrorhagia</i> türlerinin 9 taksonu için genetik parametre değerler.....	59
3.7. <i>Petrorhagia</i> taksonları birinci grup (braktelerin kaliksi örtmüş) için Nei (1978) genetik benzerlik (üst üçgen matris) ve genetik uzaklık (alt üçgen matris) ölçümleri.....	59
3.8. <i>Petrorhagia</i> taksonları ikinci grup (braktelerin kaliksi örtmemiş) için Nei (1978) genetik benzerlik (üst üçgen matris) ve genetik uzaklık (alt üçgen matris) ölçümleri	60
3.9. <i>Petrorhagia</i> taksonları için Nei (1978) genetik benzerlik (üst üçgen matris) ve genetik uzaklık (alt üçgen matris) ölçümleri	60
4.1. <i>Petrorhagia</i> türleri kromozom sayıları ve önemli morfolojik özellikleri.....	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	:	Adenin
bç	:	baz çifti
AFLP	:	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
C	:	Sitozin
DNA	:	Deoksribonükleik asit
dNTP	:	Deoksribonükleosid trifosfat
G	:	Guanin
IUCN	:	Uluslar arası doğayı koruma birliği
ISSR	:	Basit dizin arası tekrarları
M	:	Molar
Mg ⁺²	:	Magnezyum
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
mg	:	Miligram
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
ng	:	Nanogram
nm	:	Nanometre
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	:	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	:	Kesilmiş parça uzunlukları polimorfizmi
SSR	:	Basit dizin tekrarları (mikrosatellitler)
T	:	Timin
Taq	:	Taq polimeraz enzimi
TBE	:	Tris- borik asit- EDTA
UV	:	Ultraviole
UPGMA	:	Unweighted pair group method with arithmetic means (Aritmetik ortalamalar ile ağırlıklandırılmamış eşlenmiş grup metodu)

1. GİRİŞ

1900'lü yılların ortalarından sonra DNA'nın varlığının tespiti, yapısının, şeklinin ve biyokimyasal mekanizmasının anlaşılması ile birlikte moleküler biyoloji ve moleküler belirteç teknolojileri büyük bir hızla gelişmeye başlamıştır. Böylece bitkilerin genetik yapılarının aydınlatılması, moleküler karakterizasyon, gen haritalarının çıkarılması, filogenetik çalışmalar ve belirteç (markör, markır) destekli teknikler kullanılarak, diğer alanlarda olduğu gibi genetik akrabalık çalışmalarında da yeni bir dönem başlatmıştır. Doğadan toplanan bitkisel örneklerde ilk önceleri morfo-fizyolojik özelliklerin incelenmesiyle genetiksel varyasyonlar bulunmaya çalışılmış, bunu biyokimyasal belirteçler (izoenzim ve dane proteinleri) izlemiş ve son olarak da moleküler seviyede genetiksel varyasyonu ortaya çıkaracak teknikler geliştirilmiştir (Yalım, 2005). Moleküler biyolojide kullanılmaya başlanan tekniklerin daha önce kullanılan tekniklerden (morfolojik, biyokimyasal ayrımlar) sahip oldukları üstünlükler, zamanla birçok DNA belirteçlerinin ortaya çıkmasında büyük rol oynamıştır. Hızla büyüyen moleküler tekniklerin kullanımı, uygulaması kolay daha geniş bir yapıya bürünmüştür (Lee ve ark., 2011). Özellikle son yıllarda gelişen moleküler belirteç teknolojisi diğer tekniklerin sahip olduğu pek çok dezavantajı ortadan kaldırması nedeniyle tercih edilir bir duruma gelmiştir. Moleküler belirteçlerin en önemli avantajları çevresel faktörlerden etkilenmemeleri ve polimorfizm oranlarının yüksek oluşudur. Aynı zamanda pleiotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermezler (Soller ve Beckmann, 1983; Tanksley, 1983; Avise 1994; Bretting ve Widrechner, 1995).

DNA teknolojilerinde moleküler belirteç kullanımı ve kullanım alanları dünyayla paralel olarak ülkemizde de hızla gelişme göstermektedir. Teknolojinin gelişmesiyle de beraber moleküler belirteçlerin kullanım alanları artmakta olup başlıcaları; gen kaynakların karakterizasyonu, bitki ıslah çalışmalarında, bitki türlerinin genetik olarak ismine uygunluğunun araştırılması, evrimsel ve filogenetik çalışmalar ile genetik çeşitlilik ve akrabalık çalışmalarıdır.

Moleküler belirteçlere dayalı teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması, yeterli DNA dizisi düzeyinde polimorfizmi ortaya çıkarmak için, bireyler arasındaki ve populasyon içindeki genetik çeşitliliğin tespitinde yeterli olan güçlü araçlar sunmaktadır (Kresovich ve ark., 1995; Simmons ve ark., 2007). Bu belirteçler birçok bitki ve hayvan türlerinin populasyonların genetik çeşitliliğinin dinamiklerini çalışmak için kullanılmıştır (Zeitkiewicz ve ark., 1994; Tsumura ve ark., 1996; Dayanadhan ve ark., 1997; Gabierelsen and Brochman, 1998; Wolfe ve ark., 1998; Knox ve Palmer, 1999). Moleküler belirteçlerin, morfolojik ve biyokimyasal belirteçler üzerinden pek çok avantajı olduğu bilinmektedir çünkü bu belirteçler durağan (stable) ve çevresel etkilerden bağımsızdır (Berbatsky and Tanksley, 1989; Gepts, 1993 Dhanikachalam ve ark., 2008). Moleküler belirteçler, çok sayıda bitki türlerinin çeşitliliğinin değerlendirilmesinde yararlı oldukları kanıtlanmıştır (Waugh ve Powell, 1992). Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR-PZR) dayalı belirteçler moleküler belirteçlerin en sık kullanılanlarıdır. Birçok farklı PCR tabanlı teknikler, son on yılda geliştirilmiştir ve her biri belirli avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Zheng ve ark., 2005). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanarak, bir dizi özel (spesifik) belirteç tekniği geliştirilmiştir, ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat-Basit İç Dizi Tekrarları) (Zietkiewicz ve ark., 1994), (RAPD) (Random Amplified Polymorphic DNA-Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) (Williams ve ark., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi) (Vos ve ark., 1995), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Kesilmiş Parça Uzunlukları Polimorfizmi) (Botstein ve ark., 1980) gibi. Son zamanlardaki birkaç çalışma, moleküler belirteçler kullanılarak (örneğin: AFLP (Peng ve ark., 2004), ISSR (Xue ve ark., 2006), RAPD (Kim ve ark., 1998) ve RFLP (Kanazawa ve ark., 1998) türler arasındaki genetik çeşitlilik ve genetik akrabalık durumlarını belgelemiştir.

1.1. *Caryophyllaceae* Familyasının Genel Özellikleri

Caryophyllaceae Familyası sistematığı

Divisio: Spermatophyta

Subdivisio: Angiospermae

Classis: Dicotyledoneae (Magnoliopsida)

Subclassis: Caryophyllidae

Ordo: Caryophyllales

Family: Caryophyllaceae

Ordo: *CARYOPHYLLALES*

Periant farklılaşmış; genellikle sepaller 2-5, serbest veya birleşik, petaller yok veya 2-5, serbest veya birleşik. Stamen sayısı genellikle petal sayısının iki katı olup serbesttir. İki veya daha fazla karpel birleşerek genellikle tek odacıklı ovaryuma sahip ginekeumu oluşturur. Plasentalanma yalancı serbest, merkezi veya bazaldır. Ovaryum üst durumlu ve stiluslar genellikle serbesttir. Meyve çok tohumlu bir kapsül veya tek tohumlu fındıkçık ya da bir akendir (Yalçınkaya, 2006).

Çeşitli değişik biyolojik çalışmalar, *Caryophyllales* içinde filogenetik akrabalıklar üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, familyalar içi sistematik moleküler bir biyolojik sınıflandırma yoktur (Judd ve ark., 2011).

Familya: *CARYOPHYLLACEAE*

Caryophyllaceae familyası bir kısmı kuzey yarıkürenin ılıman bölgelerinde, bir kısmı arktik bölgede, güney yarıkürede ve tropik dağlarda yayılış göstermekle birlikte daha çok Akdeniz iklimine sahip bölgelerde yetişen zengin bir familyadır (Gunderson, 1950; Bateman 1978; Eröz Poyraz, 2008). Bugün, Caryophyllaceae ailesi 104 cins (Böttger ve Melzig, 2010) ve 2200 tür ile temsil edilmekte olup üç alt familyaya ayrılmaktadır: Alsinoidea, Caryophylloidea, ve Paronchioidea (Schweingruber, 2007). Familyanın 2200 türünün çoğunluğu açık ve kuru alanlarda yayılış gösteren heliofitlerdir. Bu bitkiler alçak kesim yağmur ormanlarında yayılış göstermezler. Familya üyelerinin bazıları da dağlık alanlara özgüdür ve en yüksek rakımlı bölgelerde yayılış gösteren tohumlu bitkiler

arasında yer alır (Fior ve ark., 2006; Aktaş ve ark., 2010a). Çok soğuk ortamlardan kurak ortamlara kadar pek çok habitatta yaşayabilen kozmopolit türleri içerir (Watson ve ark.2000). Bu familyanın üyeleri bir veya çok yıllık otsu, nadiren çalimsı, toprağa yakın kısımları olan bitkilerdir. Familyanın en belirgin özellikleri arasında gövdenin nodlarının şişkin oluşu sayılabilir. Yapraklar bütün, basit, genellikle karşılıklı dizilmiş veya bir halkada alternat, zarımsı stipullu veya çoğunlukla stipulsuzdur (Yalçınkaya, 2006). Çiçek özelliklerinden ötürü ‘Pink Family’ olarak isimlendirilmektedir. Çiçekler aktinomorf simetrlili ve sepaller tüp oluşturmaktadır. Petalleri serbest olup 4–5 adettir. Stamenler 3 ile 10 arasında değişenlik gösterir. Ovaryumları üst durumlu olup, plasentasyonu serbest-sentraldir. Meyve bir kapsül olup valflerle açılmaktadır. Familya türleri çok sayıda tohum oluştururlar (Huber-Morath, 1967).

Caryophyllaceae familyasının taksonomik gruplara ayrılmasında yaprak şekli ve dizilişi, stipul özellikleri, kapsül özellikleri, stil sayısı, petal özellikleri, sepal damarlarının özellikleri, tohum yüzey morfolojisi ve tohum sayısı gibi karakterler kullanılır (Sarıoğlu, 2006).

1.1.1. *Caryophyllaceae* Familyasının Cins teşhis anahtarı

(Huber-Morath, 1967) :

1. Yaprak alternat.....**16. *Telephium***
1. Yapraklar opposit veya vertisillat
 2. Yapraklar stipullu
 - 3.Sepaller sert kıllı**15. *Loeflingia***
 - 3.Sepaller sert kılsız
 4. Yapraklar obovat veya orbikular, sıklıkla 4 halkalı.....**14. *Polycarpon***
 4. Yapraklar lineardan linear-lanseolata, opposit
 5. Stipüller birleşik, stillus 3.....**13. *Spergularia***
 5. Stipüller serbest, stillus 5–6 **12. *Spergula***
 2. Yapraklar stipülsüz
 - 6.Sepaller tabanda serbest
 7. Stillus 2

8. Kapsül 2 valf ile açılır, petaller çoğunlukla kenarı kemirilmiş gibi veya belirli belirsiz iki esit parçalı
9. Yapraklar lanseolat, zayıf ve genişleyen bir gövde...**3. Lepyrodiclis**
9. Yapraklar linear-subulat, sert ve dik gövde**10. Bufonia**
8. Kapsül 4 dis ile açılır, petaller derin iki parçalı.....**5. Stellaria**
7. Stillus 3-5
10. Kapsül disli veya valfler stillere kadar
11. Stillus 3..... **2. Minuartia**
11. Stillus 4-5
12. Yapraklar linear subulat, sepaller 3 mm' ye kadar
.....**1. Sagina**
12. Yapraklar dar ovat, sepaller 5-10 mm.**6. Mysoton**
10. Kapsül disi stillerin iki katı kadar
13. Petaller yarıya kadar bifid veya daha çok ya da yok
14. Sepaller belli belirsiz damar düzenine sahip ...**5. Stellaria**
14. Sepaller belli bir damar düzenine sahip değil. **1. Arenaria**
13. Petaller bütün veya yarısından daha kısa iki parçalı
15. Çiçeklenme basit bir semsiye gibi..... **8. Holosteum**
15. Çiçekler tek tek, salkım veya bir talkım
16. Strofilli tohumlar, yapraklar ± ovat, petiolat, 3 damarlı
.....**4. Moelaringia**
16. Tohumlar strofilsiz, yapraklar çeşitli, yukarıdaki kadar değil
17. Petaller en az 1/3'üne kadar bölünmüş veya bazen emarginate, kapsül bazen kavisli
17. Petaller bütün veya yarı kenarlı, kapsül bütün
18. Genellikle stiluslar 5, tüysüz, mat yeşil, tek yıllık.....**9. Moenchia**
18. Stilluslar 3, çok yıllık veya tüylü, tek yıllık mat renkli değil**1. Arenaria**

6. Sepaller en az tabanda birlesik
19. Yapraklar tarak seklinde dikenli, sepaller, petaller ve stamenler üst
durumlu**17. Thurya**
19. Yapraklar tarak seklinde degil, sepaller alt durumlu
20. Kaliks birlesik damarlı, 3–5 stilli
21. Meyve bakka, uzun tırmanıcılar..... **30. Cucubalus**
21. Meyve bakka degil, genellikle bir kapsül uzun tırmanıcı degil
22. Kaliks disleri yapraksı (15–35 mm), petalleri geçer
22. Kaliks disleri yapraksı degil, 10 mm'den daha az, petallerden
kısa**32. Agrostemma**
23. Kapsül stiller kadar disli, 5 stilli, hermafrodit
.....**31. Lychnis**
23. Kapsül stillerin 2 katı kadar disli, stiller 3 veya 5 ise
çiçekler tek eseyli.....**29. Silene**
20. Birlesik damar yok, 2 stilli
24. Kaliks 5 kanatlı..... **28. Vaccaria**
24. Kaliks kanatsız
25. Kaliks ve damarlar arasında membransı seffaf aralık yok
26. Brakteoller kalikse dogru neredeyse yassılaşmış
.....**18. Dianthus**
26. Brakteoller kalikse dogru yassılaşmamış
27. Yüzeysel bir hilum ile semsiye biçimli tohumlar,
petaller taç seklinde küçük pullu yada pulsuz
.....**20. Velezia**
27. Tohumlar yanal bir hilum ile böbrek seklinde, petaller
genellikle taç seklinde pullu..... **21. Saponaria**
25. Kaliks ve damarlar arası membransı seffaf bosluklar var
28. Tohumlar yüzeysel bir hilum ile semsiye biçimli
.....**19. Petrorhagia**
28. Tohumlar yanal bir hilum ile böbrek biçimli veya virgül
biçimli
29. Kaliks tabanda 1–4 çift brakteoll.....**23. Phyrna**

29. Kaliks brakteolsüz
30. Meyveler 1–4 tohumlu, tabanda açılır veya yırtık düzensiz
31. Petaller 3 parçalı**22. Ankyropetalum**
31. Petaller çok disli
32. Yapraklar brakteli ve kaliks \pm dikenli, stamenler dışarı çıkmış
.....**27. Acanthophyllum**
32. Bitki dikenli değil, stamenler dışarı çıkmamış**26. Allochrysa**
30. Meyve 4-36 tohumlu, disler veya valflerle açılır
33. Tek veya çok yıllık kaliks çoğunlukla drus kristalleri taşıyan campanulattan turbinata kadar, tek yıllık tüpsü kaliks asla püsküllü değil
.....**24. Gypsophila**
33. Tek yıllık tüpsü kaliks zayıf püsküllü kalsiyum oksalat kristalleri taşımaz
.....**25. Bolanthus**

Caryophyllacea familyası Türkiye’de 35 cins (Williams, 1989) ve 494 tür ile temsil edilmektedir. (Güner ve ark., 2000; Seçmen ve ark., 2004). Familyanın Türkiye florasındaki endemizm oranı ise % 47,7’ dir (Yalçınkaya, 2006).

1.1.2. *Petrorhagia* (Ser.) Link. Cinsinin Genel Özellikleri

Petrorhagia (Ser.) Link cinsi Yunanistan ve Türkiye’den orjin almış ve Avrupa, Akdeniz Bölgesi ve Batı Asya’da yayılış gösterir ve toplam 32 taksondan oluşmaktadır. (Strid ve Tan, 1997). *Petrorhagia* cinsi “Flora of Turkey” in 2. cildinde (Davis, 1967) 4’ ü endemik toplam 11 taksonla yer almaktadır. Bu taksonlar *P. Velutina* (Guss.) Ball & Heywood, *P. prolifera* (L.) Ball & Heywood, *P. pamphylica* (Boiss. & Ball) Ball & Heywood, *P. peroninii* (Boiss.) Ball &

Heywood, *P. saxifraga* (L.) Link, *P. hispidula* (Boiss. & Heldr.) Ball & Heywood, *P. cretica* (L.) Ball & Heywood, *P. alpina* subsp. *alpina* (Habl.) Ball & Heywood, *P. alpina* subsp. *Olympica* (Boiss.) Ball & Heywood, *P. lycica* (Davis) Ball & Heywood ve *P. Armerioides* (Ser.) Ball & Heywood' dur. "Flora of Turkey" in 1. Ek cilti olan 10. Ciltte (Davis, 1988) ise *P. Syriaca* (Boiss.) Mouterde & Greuter taksonu da floraya dahil edilmiştir. Böylece ülkemizde toplam 12 türün varlığı kayıt altına girmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda (Ball & Heywood, 1964), (Aktaş, 2006; 2010) *P. Syriaca* türünü DD(Data Defices - Veri Yetersiz) kategorisinde ele almışlardır. Aktaş (2006, 2010a) tarafından yapılan çalışmalarda *P. armerioides* türüne ulaşamadığını belirtmiş ve bu türü de DD (Data Defices - Veri Yetersiz) kategorisinde değerlendirmiştir. Ayrıca "Flora of Turkey" in 2. Ek cildi olan 11. Ciltte (Ekim ve ark, 2000) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" da *P. Velutina* için doğru adlandırmanın *P. dubia* (Rafin.) G. López & Romo olduğunu belirtmişlerdir.

Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı ve IUCN (Uluslararası Doğayı Koruma Birliği)' ne göre Türkiye'de doğal yayılış gösteren *Petrorhagia* cinsine ait taksonların tehlike kategorileri: *P. pamphylica*, *P. lycica* ve *P. hispidula* : Zarar Görebilir (Vulnerable) (VU), *P. peroninii*: Az Tehdit Altında (Lower risk). *P. armerioides* ve *P. syriaca* Veri Yetersiz (DD) (Data deficient) olarak gösterilmişlerdir. Ancak daha sonra yapılan revizyon çalışmalarında (Ataşlar, 2008) bizim çalıştığımız türlerden *P. pamphylica*, *P. lycica* ve *P. peroninii* CR (Critically Endangered - Çok Tehlikede) kategorisine dahil edilmiştir

1.1.3. *Petrorhagia* (Ser.) Link. Cinsi Taksonlarının Tayin Anahtarları

1. Brakteler, kaliksi tamamen örtmüş
2. En büyük brakte en azından 3 mm genişliğinde; Petaller bariz olarak pençe şeklinde ve geniş bir obkordat yada obdeltat dudaklı
3. Yaprak kınları genişliğinden 2 katı kadar uzundur; gövdeler orta kısma yakın tüylü (pubescent); üst Yaprakların kenarları düz (pürüzsüz)..... **11. *P.dubia***

3. Yaprak kınları genişliğinden 2 katından daha azdır; üst yapraklar serrat-setose kenarlı**10. P. prolifera**

2. En büyük braktenin genişliği 3 mm' den az; petaller bariz olarak pençe şeklinde değil ya da eğer öyleyse o zaman küçük bir eliptik dudaklı

4. Tek yıllık bitkiler, yapraklar 3 damarlı

5. Kaliks kaburgaları 5-7 damarlı; tohumlar 1.3-1,6 x 0,6-0.8mm

.....**8. P. pamphylica**

5. Kaliks kaburgaları 3 damarlı; tohumlar 1.1-1.2 x 0.7-0.9mm

.....**9. P. peroninü**

4. Çok yıllık bitkiler yapraklar 1 damarlı

6. Kaliks kaburgaları 3 damarlı.....**6. P. syriaca**

6. Kaliks kaburgaları 5 damarlı.....**7. P. saxifraga**

1. Brakteler kaliksi örtmemiş

7. Petaller 4 loblu..... **4. P. hispidula**

7. Petaller tam

8. Tek yıllık bitkiler

9. Kaliks kaburgaları 3-damarlı,tohumlar 2-2.8 mm, pürüzsüz. **3. P. cretica**

9. Kalikskaburgaları 1-damarlı;tohumlar 2 mm 'den daha az, Retikulat-

Tuberculat

10.Yapraklar oblong-oblanseolat, çiçek durumu yoğun, pedisel 0,5-12 mm uzunluğunda..... **5. 1. P.alpina subsp. alpina**

10. Yapraklar linear-oblanseolat; çiçek durumu gevşek, pedisel 3 - 30 mm uzunluğunda.....**5 .2. P.alpina subsp. olympica**

8. Çok yıllık bitkiler

11. Alt yapraklar 15-30 mm; tohumlar 1.8-2.1 x 1-1.3mm **1. P.armerioides**

11. Alt yapraklar 10-15 mm; tohumlar 1.5 - 2 x 0,4-0.5mm.....**2. P. lycica**

1.1.4. Ülkemizde yayılış gösteren *Petrorhagia* türlerine ait özellikler

Petrorhagia lycica (Davis) Ball & Heywood

Yarıçalı, ince ,dik, gövdesi salgı tüylü (glandular- pubescent), 10- 20 cm uzunluğunda, odunsu filizden kıvrılarak oluşmuş bitkilerdir. Alt yapraklarının uzunluğu 10-15 mm, şeritsi (linear) –ya da şeritsi (linear)- ters mızrak (oblanceolate) şeklinde, 3 damarlıdır. Çiçek durumu 10-30 tane çiçek bulunan gevşek panikula şeklindedir. Brakteler kaliksi örtmez. Kaliks genellikle yaprak sapını aşar, 5,5-6,5 mm uzunluğunda, kaburgası 3 damarlı, kaliks dişleri üçgensiz (triangular) ve sivri ya da keskin uçludur (acute). Petaller 7-9 mm uzunluğunda, tam, ters mızraksı (oblanceolate) -spatula şeklindedir (spatulat). Petal rengi mor damarlı beyazdır. Tohumlar 1,5 x 0,5 mm, kahverengi ve hafif siğillidir (papillose). Temmuz ayında çiçeklenir. Kireçtaşı kayalıkları 500-1650 m yükseklikte yetişir. Doğu Akdeniz elementidir. Endemik olup tehlike kategorisi CR (Critically Endangered -Çok Tehlikede-)’dir.

Petrorhagia lycica (P.H. Davis) P.W. Ball & Heywood, op. cit. 142.

Syn: *Tunica lycica* P.H. Davis in Notes R.B. G. Edinb. 22: 163 t. 10 (1957).

Tip Lokalitesi: C2 Muğla: Fethiye (Lycia), Baba Dağ above Akbel yayla, 1650 m, on calcareous rocks, 30 Temmuz 1947, Davis & K. Bilger (D. 13675-holo. E; iso. K., ANK!) Minara, 31 Temmuz 1947, Davis 13709.

Petrorhagia cretica (L.) Ball & Heywood

Tek yıllık dik, üst kısımlarda dallanmış, 10- 40 cm uzunluğunda, gövdenin orta kısmında yoğun salgı tüylü (glandular- pubescent) bitkilerdir. Bazal yapraklar dikdörtgensiz (oblong) ya da ters mızrak (oblanceolate) şeklinde, 5-20 mm uzunluğunda, ±1 damarlı, gövde yaprakları şeritsi (linear)- mızraksı (lanceolate) şeklinde, 15- 20 mm uzunluğunda, ±3 damarlıdır. Panikula gevşek bir şekilde 4-10 adet çiçekten oluşmuş veya hemen hemen tabanda dallanmış ve 20-30 adet çiçekten oluşmuştur. Brakteler kaliksi örtmez. Yaprak sapının uzunluğu 5-20 mm’dir. Kaliks 9-10 mm uzunluğunda, tüysüz, kaburgası 3 damarlı, damarların birleşme yeri kağıt gibi ve buruşuktur. Petaller hemen hemen kaliksin uzunluğuna

eşit, tam ve beyazdır. Tohumlar 2-2,8 x 1,3-1,9 mm'dir. Haziran ayında çiçeklenir. Step, tarlalar, açık taşlık alanlarda 300-2050 m yükseklikte yetişir.

Petrorhagia cretica (L.) P.W. Ball & Heywood, op. cit. 142. Syn: *Saponaria cretica* L., Sp. Pl., ed. 2, 584 (1762); *Tunica cretica* (L.) Fisch. & Mey., Ind. Sem. Hort. Bot. Petrop. 4:49 (1837) quoad syn.: *T. pachgona* Fisch. & Mey., op. cit. 50; *T. brachypetala*, Jaub. & Spach, Ill. Or. 1: 11, t. 5 (1842).

Tip örneği: C4 İçel: in montibus ad cacumen urbis Anamour Ciliciae Trachaeae sitis (BMK)

Petrorhagia alpina (Habl.) Ball & Heywood

Tek yıllıktır. Gövdeleri dik, dallanmış, tüsüzdür. Yaprakları dikdörtgensel (oblong) ya da ters mızrak (oblanceolate) şeklinde, 1 damarlıdır. Brakteler kaliksi örtmez. Kaliks 2,5- 5,5 mm uzunluğunda, tüsüz, kaburgası 1 damarlıdır; dişleri sivri veya keskin uçlu (acute) ya da küt uçlu, sivri ve keskin olmayan (obtuse) ve sert ve dik yapılıdır (mucronate). Petaller beyaz, tam, 3-6 mm uzunluğundadır. Tohumlar 0,7- 1,2 x 0,4- 0,9 mm, ağsı (reticulate)- tepeciklidir (tuberculate).

Petrorhagia alpina (Habl.) Ball & Heywood subsp. ***alpina***

Yaprakları dikdörtgensel (oblong)- ters mızrak (oblanceolate) şeklinde; çiçek durumu yoğundur. Haziran-Ağustos aylarında çiçeklenir. Taşlık açık alanlarda 1600-3000 m yükseklikte yetişir.

Petrorhagia alpina (Habl.) P.W. Ball & Heywood ssp. ***alpina*** op. cit. 145 (1964). Syn: *Gypsophila alpina* Habl., Neues Nord. Beitr. 4:57 (1783); *Gypsophila stricta* Ledeb, Ic. Pl. 1:4 (1829); *Tunica stricta* (Ledeb.) Fisch. & Mey. in Ind. Sem. Hort. Petrop. 4:50 (1837).

Petrorhagia alpina (Habl.) Ball & Heywood subsp. ***olympica*** (Boiss.) Ball & Heywood

Yaprakları şeritsi (linear), ters mızrak (oblanceolate) şeklinde; çiçek durumu seyrek. Temmuz ayında çiçeklenir. Orman altları ve yamaçlarda 250-1900 m yükseklikte yetişir.

Petrorhagia alpina (Habl.) P.W. Ball & Heywood ssp. *olympica* (Boiss.) P.W. Ball & Heywood

Petrorhagia saxifraga (L.) Link

Çok yıllık gövdeler çok sayıda , yay şeklinde yükselenden dike kadar çeşitli formlarda, tabanda odunsu,. Çıplak tüsüzden, kısa sert –yumuşak tüylüye kadar değişen tüy örtüsüne sahiptir. Yapraklar şeritliden (linear), ters mızraklıya (oblanceolate) kadar değişebilir. Yapraklar 1 damarlıdır. Tüyler saplı ve testere dişli. Çiçek durumu gevşektir. Brakte kaliksi çevreler ve kaliks 3-6 mm uzunluğundadır. Petaller beyaz ve pembe, 4.5 ile 10 mm uzunluğundadır. Tohumlar 0.9-1.6 x 0.6 - .1.1 mm ebatlarıdır. 4. ve 9. aylar arasında çiçeklenir. Yamaçlarda, nehir kenarlarında, deniz seviyesinden 1500 m kadar olan yükseklikte yetişir. Avrupa – Sibiryaya elementidir.

Petrorhagia saxifraga (L.) Link; Gewächse 2: 235 (1831).

Syn: *Dianthus saxifragus* L., Sp. Pl. 413 (1753); *Tunica saxifraga* (L.) Scop., Fl. Carn. Ed. 2, 1: 300 (1772); *Kohlrauschia saxifraga* (L.) Dandy in Watsonia, 4:42 (1957). Ic: Bonnier, Fl. Comp. Fr., Suisse et Belge 2: t. 395 (1913).

P. pamphylica (Boiss. & Ball) Ball & Heywood

Tek yıllık. Gövdeler tüsüz, dik yükselen tabandan zengin bir şekilde dallanır. Yapraklar şeritsi (linear), sivri uçlu 3-5 damarlı. Brakteler kaliksten daha kısa ve onu çevreler. Kaliks 3-7 mm Kosta (kaburga) geniş, 5-7 damarlı dişler sivri (acute). Petaller açık pembe, tam, 7-9 mm boyunda. Tohumlar 1.6 - 2 x 1.2 – 1.7 mm. Temmuz ayında çiçeklenir. Taşlık yamaçlar, açık taşlık alanlar, yol kenarlarında 0-400 m yükseklikte yetişir. *P. peronini*' ye çok yakın Akdeniz elemintir. Endemik olup tehlike kategorisi CR (Critically Endangered -Çok Tehlikede-)’ dir.

Petrorhagia pamphylica (Boiss. & Bal.) P.W. Ball & Heywood

Tip: A3 Antalya: circa Adalia Pamphyliae, *Balansa*.

P. peroninii (Boiss.) Ball & Heywood

P. pamphylica’ dan kaliksi aşan brakteleri, kaliksin kostasının 3 damarlı olması, petallerin beyaz veya altta morumsu olması ve tohumların 1.1 – 1.2 x 0.7 x 0.9 mm olması ile ayrılır. Ağustos-Eylül aylarında çiçeklenir. Tepelerde, deniz seviyesine yakın, sürülmüş tarla içlerinde 50 – 100 m yükseklikte bulunur. *P. pamphylica*’ ya benzerdir, Akdeniz elementidir. Endemik olup tehlike kategorisi CR (Critically Endangered -Çok Tehlikede-)’ dir.

Petrorhagia peroninii (Boiss.) P.W. Ball & Heywood

Tip: C4 İçel: in montibus ad cacumen urbis Anamour Ciliciae Trachaeae sitis, *Péronin* (BMK)

P. prolifera (L.) Ball & Heywood

Tek yıllıktır. Gövdeler hemen hemen diktir. Tüysüzdür. 6 – 40 cm’ dir. Yaprak kınları kısadır. Genişliği boyunun 2 katından kısadır. Yapraklar şeritsiden, şeritsi diktörtgensiyeye kadar değişebilir. 3 damarlı, testere dişli, saplı tüylüdür. Çiçek durumu başsı, genellikle bir çiçeğe indirgenmiştir. Brakteler kahverengi zarımsıdır. Brakteler kaliksi içerisine alır. Kahverengi zarımsıdır. En geniş brakte 4 mm veya daha geniştir. Kaliks 10 – 13 mm’ dir. Kosta 3 damarlıdır. Dişler kör uçludur. Petaller 10 – 14 mm’ dir. Bariz olarak tırnaklıdır. Pembe veya morumsudur. Dudak ters kalpsidir. Tohumlar 1.3–1.9 x 0.8–1.1 mm ebatlarındadır. Ağımsıdır. 6. e 8. aylar arasında çiçeklenir. Yamaçlarda 1000 – 1200 m arasında yayılış gösterir.

Petrorhagia prolifera (L.) P.W. Ball & Heywood

Syn: *Dianthus prolifer* L., *Tunica prolifera* (L.) Scop.

P. dubia (Rafin.) G. López & Romo

P. prolifera’ dan gövdesinde ortadaki internodların tüylü olmasıyla, yaprak kınının boyunun genişliğinden 2 veya daha fazla kat olmasıyla, üst yaprakların yumuşak kenarlarıyla, tohumların 1 – 1.3 x 0.7 – 0.8 ebatlarında olmasıyla ayrılır. Nisan-Haziran ayları arasında çiçeklenir. Çayır, nehir kenarı ve yamaçlarda, deniz seviyesinden 400 m’ ye kadar olan yüksekliklerde yetişmektedir.

Petrorhagia dubia (Raf.) G. López & Romo

Syn: *Dianthus velutinus* Guss., *Kohlrauschia velutina* (Guss.) Rchb., *Petrorhagia velutina* (Guss.) P.W. Ball & Heywood, *Tunica velutina* (Guss.) Fisch. & C.A. Me

1.2. Genetik Çeşitlilik ve Önemi

Genetik çeşitlilik, bir biyolojik çeşitlilik düzeyi olup bir türün gen havuzundaki genetik özelliklerin toplam sayısını gösteren bir biyolojik çeşitlilik düzeyidir. Genetik çeşitlilik, bir türün sahip olduğu bir genin değişkenliği yani farklılığıdır. Örneğin; bir bitkinin çiçek rengini belirleyen bir gen için farklı alleller ortaya çıkabilir (Örneğin; pembe, mor, beyaz allel). Her bir durumda, aynı gen çiçek rengini belirler, fakat gene ait allellerinin DNA dizisi farklıdır. Bireylerin belirli bir karakter için aynı genin farklı çeşidine (allele) ya da değişik gen kombinasyonlarına sahip olmaları bireyler arası genetik çeşitliliğine neden olur. Populasyon açısından ele alındığında da bir genin farklı populasyonlarda farklı sıklıkta ya da farklı kombinasyonlarda oluşu populasyonlar arası genetik çeşitliliği ortaya çıkaracaktır (Çağlar, 2010). Genetik çeşitlilik, bir populasyondaki heterozigotluk seviyesi, her bir lokustaki allel sayısı ya da polimorfik lokus yüzdesi ile tahmin edilebilir.

Bir populasyonun genetik kompozisyonu genellikle allel sıklığı, allel sayısı ve heterozigotluk bakımından değerlendirilir. Allel sıklığı gen sıklığı olarak da tanımlanabilir. Allel sıklığı, bir populasyondaki belirli bir allele ilişkin sıklıktır. Heterozigotluk ise genellikle tek bir lokus için genetik çeşitliliğin tanımlanmasında kullanılan bir ölçüdür. Bir lokustaki genetik çeşitliliğin kapsamı ‘heterozigotluk’ olarak ifade edilir. ‘Gözlemlenen heterozigotluk’ basit olarak heterozigot olan örneklenmiş bireylerin oranıdır. Genetik çeşitliliğin tanımlanmasında kullanılan diğer bir kavram ise allelik çeşitliliğidir. Allelik

çeşitlilik her bir lokusta yer alan allellerin ortalama sayısı olarak tanımlanır. Eğer birden fazla lokus çalışılıyorsa, allelik çeşitlilik lokuslar arası ortalama allel sayısıdır.

Populasyon içinde büyük bir genetik çeşitlilik seviyesine sahip bir tür, en uyumlu alellerden seçilen varyasyonlara daha çok sahip olacaktır. Genetik çeşitliliğin artması, bir türün evrimi için de zorunludur. Çok az genetik çeşitliliğe sahip olan türler büyük bir risk altındadır (Anonim, 2011). Belirli bölgelerdeki birey kaybı, genetik çeşitlilikte hemen kayba neden olmayabilir, fakat daha fazla zarar, küçük populasyon büyüklüğü ve azalmış birey sayısından dolayı uzun süreli genetik sonuçlar doğurabilir. Genetik çeşitlilik kaybı, hem kısa hem de uzun vadede demografik dalgalanmalarla ve değişen çevre koşullarıyla başa çıkabilmek için türlerin yeteneklerinde bir azalmaya neden olabilir (Ellstrand ve Elam, 1993). Genetik çeşitlilik, populasyonların değişen çevre koşullarına uyum sağlamalarına olanak tanımaktadır. Daha fazla varyasyon ve genetik çeşitlilik sayesinde, populasyondaki bazı bireyler, çevre için uygun olan alel varyasyonlarına sahip olurlar. Bu bireylerin, aynı alelleri taşıyan döller vererek hayatta kalma olasılığı daha yüksektir. Bu bireylerin başarılı olmaları sonucu populasyon, daha fazla nesille süre gelmeye devam edecektir (Anonim, 2011).

1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR= Polymerase Chain Reaction)

PCR ile ilgili ilk makale 1985 yılında Saiki ve ark., tarafından yayınlanmıştır (Block, 1989). PCR tekniği ile özel bir DNA dizisi seçilip çoğaltılmaktadır. Bu özellik aynı zamanda DNA'nın analiz edilmesini de sağlamaktadır. PCR'nin diğer önemli bir özelliği de özel bir DNA dizisinin seçilip çoğaltılarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir (Saiki ve ark., 1988). PCR döngüsü, DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (denatürasyon), primerin bağlanması ve uzama safhalarından oluşan üç aşamadan oluşmaktadır. 30-45 defa tekrarlanan PCR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin her döngüde iki katına çıkması ile sonuçlanmaktadır.

PCR'nin temel bileşenleri;

- Kalıp olarak kullanılan DNA molekülü,
- Uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan Tampon,

- Polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu $MgCl_2$,
- Kalıp DNA'ya bağlanacak olan Primerler,
- DNA üretilmesinde kullanılacak deoksiribonükleozid tri fosfatlar (dNTP) karışımı ,
- Isıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi

Reaksiyon

- Hedef DNA'nın denatürasyonu (95 °C)
- Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması (37-50 °C)
- Polimerizasyon (70-72 °C) işlemlerini içermektedir .

Tüp içinde bulunan karışım önce 95 °C'ye ısıtılarak çift iplikli DNA'nın denatürasyonu sağlanır ve tek iplikçik haline getirilir. Bu işlem sonucunda tüp 37-50 °C sıcaklığa düşürülerek primerlerin tek iplikçiklerin 3' uçlarındaki nükleotidlere bağlanması sağlanır. Polimerizasyon için 70 °C'de primerler tek iplikçikli DNA'yı kalıp olarak kullanarak sentezini yapar ve çift iplikçikli DNA'lar meydana gelir. Böylece birinci döngünün sonunda DNA iki katına ulaşır. Bu 3 aşamalı birinci döngü bittikten sonra 30-55 döngü devam ettirilirse milyonlarca DNA elde edilebilir. Döngü sonucunda teorik olarak 2^n miktarda çift zincirli DNA molekülü elde edilir.

1.4. Belirteç Tipleri

1.4.1. Morfolojik Belirteçler

Morfolojik özellikler tek genle kontrol edilebilir ve genetik belirteç olarak kullanılabilir. Görsel olarak değerlendirilebilen kalitatif özelliklerdir. Bu belirteçler bitki doğasında vardır ve mutasyon sonucu ortaya çıkmışlardır (Aka-Kaçar, 2001; Tamam, 2008). Bitki popülasyonu içinde, bir bitki ya da bir grubu diğerlerinden ayıran seçici özellik, o genotipi ayıran bir belirteç olarak değerlendirilir. Meyve kabuğu, yaprağın şekli, çiçeğin rengi, bitki ağaç özellikleri bu grup belirteçleri oluşturur (Gülşen ve Mutlu, 2005). Morfolojik belirteçlerin kullanım potansiyelleri uzun bir süredir bilinmesine rağmen sınırlı sayıda olmaları

nedeniyle pratikte uygulanabilirliği kısıtlı kalmıştır (Paterson, 1996). Ayrıca benzer morfolojiye sahip çeşitler arasında mutlaka yakın evrimsel bir ilişki yoktur (Tian ve ark., 2008). Örneğin; genetik haritalamada kullanılan bazı morfolojik belirteçler arasında, arpa'da gövde mumluluğu, kılçığın kaba veya düz olması, "rachila" tüylülüğu gibi (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

1.4.2. Biyokimyasal Belirteçler

Tohum kabuğu proteinleri, yapraklarda bulunan kimyasallar, sekonder metabolitler, izoenzimler, vs. bu gruba girerler. Ancak en yaygın kullanılan komponentler izoenzimler ve tohum proteinleridir. Bu belirteçlerin maliyeti, moleküler belirteçlere oranla daha düşüktür ve daha az iş gücüyle elde edilirler. Fakat bitki türlerinde bugüne kadar yeterince biyokimyasal belirteç üretilememiştir. Bu belirteçlerdeki varyasyonlar, kodlayıcı DNA bölgelerindeki benzer olmayan değişikliklerden ya da translasyon sonrası (post-translational) protein modifikasyonlarından kaynaklanır. Ancak bu belirteçlerin kullanılabilirliği, çalışılan popülasyonların yapısına bağlıdır. Örneğin izoenzimler, türler arası veya nispeten uzak bitkiler arasındaki varyasyonları çalışmada oldukça yararlı olmasına rağmen, yakın akrabalar arasındaki ilişkileri tespit için uygun değildir (Staub ve Sequen, 1996; Gülşen ve Mutlu, 2005). Biyokimyasal belirteçler genlerin ürettikleri proteinlerdir. İzoenzimler farklı olarak yüklenmiş proteinlerdir. Elektroforez tekniği kullanılarak kolayca ayrılabilirler. Enzimler spesifik biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görölmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir. Renkli ürünler jel üzerinde görölür bantlar oluşturur. Bu bantlar genetik temellere sahiptir ve kodominant belirteç olarak genetik bilgi sağlar. Bununla birlikte morfolojik karakterlere göre çok daha yaygın kullanılmakla birlikte izoenzim lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması kullanımlarını sınırlar (Aka-Kaçar, 2001; Tamam, 2008). Örneğin; Buğday tohumunda bulunan iki depo protein grubu olan gliadin ve glutenin bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.4.3. DNA Belirteçleri

Moleküler belirteçlerin faydalı olmaları, morfolojik belirteçlerden kendilerini farklı kılan şu özelliklerden ileri gelmektedir (Khang ve Spoor, 2001):

- Morfolojik belirteçlerin çoğunun fenotipi, yalnızca tüm bitki seviyesinde teşhis edilebilir. Ancak, moleküler lokuslar, tüm bitkide, doku ve hücre seviyesinde denenebilirler.
- Allel frekansı, morfolojik belirteçlerle karşılaştırıldığında moleküler lokuslarda daha yüksek olma eğilimindedir.
- Morfolojik mutantlar, istenilmeyen fenolojik etkilerle bir arada olmaya meyillidirler.
- Morfolojik lokustaki alleller, heterozigot genotiplerin tanımlanmasını sınırlayan bir dominant –resesif tarzında birbirini etkiler.
- Moleküler lokuslar, bir açılım popülasyonundaki bireylerin genotiplerinin belirlenmesine izin veren bir ko-dominant tarz sergilerler.

Tek bir moleküler belirteç, bütün bu ihtiyaçları karşılayamamaktadır. Çeşitli moleküler belirteçler DNA seviyesinde polimorfizmi ortaya çıkartmaya elverişlidirler (Tamam, 2008).

Moleküler belirteç seçilirken dikkat edilmesi gereken noktalar:

- Güvenilir olması,
- Dominant/ Ko-dominant olması,
- Yüksek derecede polimorfizm göstermesi,
- Genomda sıkça ve düzgün dağılması
- Sonuçların tekrarlanabilirliğinin yüksek olması,
- Analizinin kolay ve basit olması,
- Otomasyona uygun olmasıdır.

Bu özelliklerden hepsi aynı moleküler belirteçte bulunmamaktadır. Fakat çalışmanın amacına uygun olarak seçeceğimiz belirteçte bu özelliklerden birkaçının birarada bulunması istenmektedir (Tanskley 1993; Weising ve ark., 1995). Bir çalışmada en uygun genetik belirtecin seçimi, belirtecin karakteristiğine, tür karakteristiğine ve genom karakteristiğine bağlıdır.

Genetik Belirteçlerle ilgili önemli kriterler:

Polimorfizm (Farklılık Gösterme): Kullanılan bir belirtecin farklı genotipleri ayırt edebilme yeteneğidir. Belirteçlerin farklılık gösterme oranları belirteç tipine ve bitki türüne göre büyük ölçüde değişmektedir (Yıldırım ve ark., 2001). Polimorfizm oranının yüksek olması tercih edilen bir durumdur.

Güvenilirlik: Aynı genetik materyal üzerinde yapılan bir belirteç analizinin her zaman ve her koşulda aynı sonuçları vermesidir. Güvenilirlik belirteç tipine göre değişmektedir (Yıldırım ve ark., 2001).

Eşbaskınlık (ko-dominantlık): Belirteçlerin eşbaskın olması, yani her iki allelinde ayırt edilebilmesidir. Belirteçlerin ko-dominant olması sayesinde homozigot ve heterozigot ayrımı sağlanır. Bu durum bize ebeveynler hakkında sağlıklı bilgiler vermektedir.

Moleküler belirteçlere dayalı teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması, yeterli DNA dizisi düzeyinde polimorfizmi ortaya çıkarmak için, bireyler arasındaki ve popülasyon içindeki genetik çeşitliliğin tespitinde yeterli olan güçlü araçlar sunmaktadır. (Kresovich ve ark., 1995; Simmons ve ark., 2007). DNA polimorfizmini değerlendirmek üzere moleküler belirteçlerin çeşitli tipleri kullanılır. Bunlar genel olarak iki sınıfa ayrılır: Hibridizasyon temelli belirteçler, PCR temelli belirteçler.

1.4.3.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler (RFLP) Belirteçler

Southern blotting olarak bilinen RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) belirteci, hibridizasyona temelli ko-dominant bir belirteç sistemidir (Sambrook ve ark., 1989). RFLP belirteçleri (Bostein ve ark., 1980) dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve oluşan DNA parçalarının elektroforez' de ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek DNA proplarıyla etiketlenmesi esasına dayanır. RFLP belirteçleri ile türler arasındaki ve içindeki farklılık kolayca belirlenir. Güvenilir, eşbaskın (kodominant) özellikte olup polimorfizm oranı orta düzeydedir (Yıldırım ve ark.,

2001). En önemli dezavantajı ise analizlerinin pahalı olması, fazla zaman, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyulmasıdır (Walton, 1993).

1.4.3.2. PCR Tekniğine Dayalı Moleküler Belirteçler

Moleküler belirteçlerin çok sayıda bitki türlerinin çeşitliliğinin değerlendirilmesinde yararlı oldukları gösterilmiştir (Waugh ve Powell, 1992). PCR' a dayalı olanlar belirteçlerin en sık kullanılanlarıdır.

Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan ilk DNA belirteci RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olmuştur. Fakat bu yöntemin maliyetinin çok yüksek ve yavaş olması PCR (Polymerase Chain Reaction)'a dayalı moleküler belirteçlerin gelişmesine neden olmuştur. Birçok farklı PCR tabanlı teknikler, son on yılda geliştirilmiş olanlardır ve her biri belirli avantajları ve dezavantajlarına sahiptir (Wu ve ark., 2005). Bu belirteçlerin bazıları RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve mikrosatellitlerdir (SSR-Simple Sequence Repeat) (Tanskley ve ark., 1989).

Bu belirteçlerden RAPD, ISSR ve AFLP dominant moleküler belirteçlerdir. SSR, RFLP ise ko-dominant moleküler belirteçlerdir (Kafkas, 2006). Bu belirteçlerin avantaj ve dezavantajlarını gösteren tablo aşağıda verilmiştir:

Çizelge 1.1. En Sık Kullanılan PCR Temelli Belirteçlerin karşılaştırması

Belirteç Tekniği	PCR Temelli Olması	Polimorfizm	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
RFLP	Hayır	Düşük/Orta	Kodominant	Yüksek	Düşük	Yüksek
AFLP	Evet	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
RAPD	Evet	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
SSR	Evet	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
ISSR	Evet	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük

1.4.3.2.1. Basit iç dizi tekrarları (ISSR)

İlk defa Zietkiewicz et al. (1994) ve Gupta et al. (1994) tarafından geliştirilen ISSR yöntemi dominant bir belirteç tekniğidir. Bu yöntem, yüksek oranda polimorfizm sağlaması nedeniyle avantajlı bir yöntemdir. ISSR belirteçleri genomik DNA'yı hedef alan ve DNA üzerindeki tekrarlı bölgeler olan ve SSR olarak adlandırılan bölgeler (100-3000 baz çifti) arasında kalan parçaların çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Zietkiewicz ve ark., 1994; Bornet ve ark., 2002). Genom boyunca yer alan iki SSR bölgesi arasındaki DNA parçaları'nın PCR (Polimerase Chain Reaction) ile çok sayıda kopyaları oluşturulur. ISSR bölgeleri tek primer ve tek enzim kullanılarak PCR yapılır ve oluşan ürünler elektroforez ile agaroz jelde yürütülerek büyüklükleri bakımından DNA'ların ayrımı yapılır (Anonim, 2005).

ISSR tekniği 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak kullanılmasını, PCR ürünlerinin elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir. ISSR tekniği iki mikrosatellit arasındaki DNA bölgesini çoğaltmak için belirli bir SSR'ye spesifik uç bağlantılı bir primer kullanır (Shi ve ark. 2006). Primer olarak 2-4 farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen, basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılır. Bir reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı kombinasyonları primer olarak aynı reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA dizilerinin sayıları arttırılır. Böylece bir jel üzerinde yürütülecek bant veya belirteç sayısı arttırılmış olur. Bu diğer DNA belirteçlerinin üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar (Gülşen ve Mutlu, 2005).

ISSR yöntemi RAPD yöntemi ile çok benzer bir yöntemdir. Temel farklılık ISSR yönteminde bağlanma sıcaklıkları daha yüksek olan mikrosatellit bölgelerden geliştirilen primerlerin kullanılmasıdır. RAPD ile maliyeti hemen aynı olan ISSR yöntemi (Inter-Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz ve ark., 1994), ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rasgele dağılımlarını esas alan (Saraçoğlu, 2007) ancak RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. RAPD belirteçlerinin düşük

üretkenliği, AFLP belirteçlerinin yüksek maliyeti ve primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisinin gerektiği SSR belirteçleri, bir çok çalışmada önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. ISSR belirteçleri bu kısıtlamaların birçoğunun üstesinden gelinmesinde önemli bir tekniktir. (Zietkiewicz ve ark., 1994). ISSR belirteçleri yüksek derecede polimorfizm göstermelerinden dolayı genetik çalışmalarda, filogenetik analizlerde, gen tespitinde, genom haritalamalarında ve evrimsel biyolojide kullanışlı bir yöntemdir (Iwata ve ark. 2008).

ISSR, bitki genetik kaynaklarının araştırılmasında etkin bir moleküler belirteçtir ve bitki genetik yapısı (Li ve Jin, 2008), genetik çeşitlilik (Sheeja ve ark., 2009), genetik akrabalık (Li ve ark., 2009) çalışmalarında sıkça kullanılır. Etkili bir marker sistemi olduğu belirtilen ISSR, yakın ilişkili ve ortak atadan gelen türler arasındaki akrabalıklar hakkında bilgi verir.

Son yıllarda, SSR tabanlı belirteçlerin kullanımı belirgin bir şekilde artmıştır. Sebepleri ise:

1. Allelik varyasyonlarının yüksek seviyede olması ve ko-dominant karakter taşımalarından dolayı maliyetin düşmesi
2. PCR uygulandığından dolayı çok düşük miktarlarda dokuya ihtiyaç duyulması
3. Özellikle ISSR belirteçlerinin diğer moleküler belirteçlere göre daha hızlı uygulanabilmesi
4. Bir tür için geliştirilen primerlerin akraba türlerde de aynı bölgeyi çoğaltabilmesidir (Trojanowska ve Bolibok, 2004).

Yapılan araştırmalar ve yayınlanan birçok araştırma sonuçlarından da anlaşılacağı üzere ISSR yöntemi doğal populasyonlarda yapılacak çalışmalarda daha etkin sonuç vermektedir. (Atalmış, 2007). ISSR belirteçleri kullanılarak yapılan bu tip bazı çalışmalar: Gaiero ve ark., (2011) Uruguay' dan toplanan *Buita* cinsine ait tehlikede olan *B. paraguayensis*, *B. lallemanti* ve *B. yatay* türleri arasındaki genetik çeşitliliği incelemişlerdir. (CTC)₄RT, (AG)₈YT, (AC)₈T, (CA)₈G ve (GA)₈T olmak üzere 5 adet ISSR primeri kullanılan çalışmada 71 tanesi polimorfik toplam 75 bant elde etmişlerdir. Taksonomik olarak türlerin konumlarının belirsiz olduklarını ifade ettikleri bu çalışmada cinse yakın başka bir türü de dış grup olarak kullanmışlardır. Martin ve ark. (2000) 12 ISSR primeri

kullanarak *Diplotaxis* cinsine ait 10 türün genetik çeşitlilik durumlarını ortaya koymuşlardır. Hepsi polimorfik toplam 494 bant elde etmişlerdir. En az bant sayısı (GAA)₆ primerinde 16, en çok bant sayısı da VHV(GT)₇'de 70 olarak bulunmuştur. Bunun sonucunda *Diplotaxis* türlerini 2 grup altında toplamışlardır. Haisehen ve Guizhu (2008) *Sonneratia* cinsine ait 6 türün genetik akrabalık seviyelerini ISSR belirteçleriyle belirlemişlerdir. 11 adet ISSR primeri kullanarak 481'i polimorfik toplam 485 bant elde etmişlerdir. Sonuç olarak *Sonneratia* türlerini UPGMA tekniğiyle iki ana gruba ayırmışlardır. Elde edilen bant büyüklükleri 160-2800 bp arasında değişmekte olup bunların 71'inin türler için spesifik bantlar olduklarını belirtmişlerdir. Böylece ISSR tekniğinin *Sonneratia* türlerinin genetik akrabalık seviyelerini belirlemede uygun bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir.

1.4.3.2.2. Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

PCR (Polymerase Chain Reaction)' in keşfi ile DNA polimerizasyonunu araştıran yeni belirteç yöntemleri ortaya koyulmuştur. Bu yöntemin uygulanması için genomik DNA'ya ait dizin bilgisine veya seçilen primerlerin dizin bilgisine gerek yoktur (Williams ve ark., 1990). Rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) işaretleyici tekniği kolay, hızlıdır ve önceden hiçbir dizi bilgisi gerektirmez. RAPD, geniş bir uygulama yelpazesi ile yaygın olarak kullanılan parmak izi yöntemidir. Ancak, RAPD birkaç dezavantaja sahiptir ki özel bakım ile değerlendirmeye tabi tutulması gereken bir yöntemdir. Primerin rasgele DNA zinciri üzerinde 200 ile 2000 bp mesafede farklı dizinlere yapışması gerekir. Eğer bu mesafeden daha fazla olursa polimeraz enzimi tarafından güçlendirilemez. RAPD belirteçlerinin en büyük dezavantajı, belirtecin üretildiği popülasyonun dışında o belirtecin çoğu zaman bulunamamasıdır. Bununla birlikte, tek dominant genler için gene çok yakın olduğu durumlarda ve başka popülasyonlarda da kullanılabilir. RAPD belirteçlerinin tekrarlanabilirliği, PCR ve DNA tespiti sırasında şartların tam olarak kontrol edilememesi nedeniyle düşüktür (Yu ve ark., 2000; Gülşen ve Mutlu, 2005). Williams ve ark., (1990) tarafından geliştirilen RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin

çoğaltılmasıdır. RFLP'nin tersine az miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen dominant belirteç (Corazza-Nunes ve ark., 2002) olmaları nedeni ile yorumlanmasın zor, güvenilirliğinin çok sınırlı ve tekrarlanama olasılıkları eğer optimizasyon çalışmaları yapılmamışsa oldukça düşüktür (Lavi ve ark., 1994). Bununla birlikte bugüne kadar RAPD belirteçleri kullanılarak genetik çeşitlilik, moleküler akrabalık çalışmaları yapılmıştır.

1.4.3.2.3. Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ya da çoğaltılmış arça uzunluğu polimorfizmi PCR temelli bir tekniktir (Vos ve ark. 1995). AFLP tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir (Yıldırım ve ark., 2001). AFLP analizi (Vos ve ark., 1995) polimorfizm tespiti için son derece duyarlı bir yöntemdir. Aslında RFLP ve PCR kombinasyonudur. Kısa sürede çok sayıda lokusun tahlil edilmesi, AFLP nin çok büyük avantajıdır. RAPD ile karşılaştırıldığında, AFLP düşük hata oranları ile son derece tekrarlanabilir (Lin ve ark., 1996; Jones ve ark., 1997).

AFLP tekniği temel olarak şu basamakları içerir:

1. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi (EcoRI/MseI) ve biyotinle işaretlenmiş 2 adaptör kullanılarak restriksiyon fragmentlerinin uygun bir DNA ligaz ile birleştirilmesi,
2. Ligaz edilen bu adaptörlere uygun primer ile restriksiyon fragmentlerinin preamplifikasyonu,
3. Bu fragmentlerin özel oluşturulan ve radyoaktif işaretlenmiş primerlerle gerçek amplifikasyonu ve PAGE (poliakrilamid jel elektroforez) de koşulmasıdır (Ergül, 2000).

AFLP yönteminin polimorfizm oranı çok yüksektir. Uygulanabilirliği, RAPD tekniğine göre kolay olmasa da RFLP tekniğine göre çok kolaydır. Kuruluş aşamasında maliyet gerektirir (Walton, 1993). Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer alır (Maughan ve ark., 1995). Örneğin; Özcan (2008) monoik olan *P. atlantica* (Antepfıstığı) ve bu monoik bitkinin

kendilenmesiyle elde edilmiş 10 adet yavru birey kullanılarak AFLP yöntemi ve AFLP'den türemiş yöntemler olan SAMPL ve TE-AFLP yöntemleri ile kodominant belirteç yöntemi olan SSR yöntemlerini kullanmıştır. Çalışma sonucunda, en fazla polimorfik bant veren yöntemin AFLP yöntemi olduğu ve genetik haritalama çalışması için AFLP yönteminin en uygun yöntem olduğunu belirtmiştir.

1.4.3.2.4. Basit Dizi Tekrarları (SSR)

Ökaryotik genomlarda bulunan ardışık tekrarlı 2-6 nükleotitli gruplara [(AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n ve (GACA)_n gibi] mikrosatellit denir. Burada 'n' ardışık tekrar sayısıdır. Tekrar üniteleri genellikle iki, üç, dört ya da beşli nükleotitlerdir (Frankham ve ark. 2004). Bu tekrarların her ünitesindeki nükleotid sayısına göre, mikrosatellit ve minisatellit olarak adlandırılır. Mikrosatellitler içerisinde en yaygını dinükleotid (örneğin ATATAT) tekrarlar olmakla birlikte, 1-6 bç'lik tekrarlar da bulunabilmektedir. Mikrosatellitler, aynı zamanda STR (short tandem repeats) veya SSR (simple sequence repeats) olarak da anılır ve 11-60 bç uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR) farklıdır. Minisatellitler genellikle kromozomların uç kısımlarında, yani telomere yakın bölgelerde bulunmasına karşın, mikrosatellitler yüksek organizma (*Eucaryote*)'lara ait kromozomlar üzerinde daha bol ve gelişigüzel bir dağılım gösterir (Tautz, 1989; Gülşen ve Mutlu, 2005).

Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık PCR sonucunda farklı uzunlukta parça çoğaltımıyla sonuçlanır. SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir (Yıldırım ve ark., 2001). 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 mikrosatelitlerin elde edilmesidir. Bu işlem çoğunlukla zaman alıcı olup fazla miktarda emek gerektirir (Büyükcinal-Bal, 2003)

1.5. Konu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Petrorhagia taksonları ile ilgili bugüne dek yapılan çalışmaları özetlersek;

Boissier (1867), “Flora Orientalis” adını taşıyan eserinde Doğu florasının Caryophyllaceae familyasının ve sahip olduğu cinslerin taksonomik bilgileri ve teşhis anahtarları yer almaktadır.

Böcher ve Ark. (1953) bazı bitki türleri üzerinde sitolojik çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada *P. velutina* 2n:30, *P. prolifera*'nın Fransa ve İspanya'nın farklı bölgelerinden alınan örneklerinin 2n:60, Danimarka, Avusturya ve Macaristan ve Fransa'dan toplanan örneklerinin kromozom sayısının ise 2n:60 olduğunu belirtmişlerdir.

P. W. Ball ve V. H. Heywood'un (1964) yaptığı revizyon çalışması *Petrorhagia* cinsi üzerinde yapılan en kapsamlı çalışmadır. Bu çalışmada *Petrorhagia* cinsi 5 seksiyon, 4 alt-seksiyon, 25 tür ve 32 takson ile tanımlamışlardır.

Mouterde ve Premier (1966) Suriye florasında *Caryophyllaceae* familyasını ve sahip olduğu cinslerin taksonomik bilgileri ve teşhis anahtarlarını açıklamışlardır.

Favarger (1966) *Petrorhagia* cinsine ait bazı türlerde sitotaksonomik çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmada sonucunda tespit edilen türlere ait kromozom sayıları şöyledir: *P. armerioides* n:13, *P. thessala* n:15, *Petrorhagia illyrica* subsp. *haynaldiana* n:13, *P. cretica* n:13, *P. saxifraga* var. *saxifraga* 2n:60, *P. giomerata* var. *giomerata* 2n:30, *P. illyrica* subsp. *taygetea* 2n:26.

Huber-Morath (1967) Türkiye Florası (2.cilt) *Caryophyllaceae* familyasının ve sahip olduğu cinslerin taksonomik bilgileri ve teşhis anahtarlarına yer vermiştir. *Petrorhagia* cinsinin 4'ü endemik olmak üzere 11 taksonun bulunduğu belirtilmiş ve daha sonra Flora'nın onuncu cildinde (Davis, 1988) yeni

bir türün varlığından bahsedilerek Türkiye’de 4’ü endemik 12 *Petrorhagia* taksonun bulunduğu belirtilmektedir.

Greuter ve Mouterde (1970) *Tunica syriaca* Boiss. üzerinde çalışma yapmış ve bu türü *Petrorhagia* cinsine dahil etmiştir. Yeni adıyla *P. syriaca* Suriye ve Türkiye arasında sınırdaki çok dar bir bölgede yayılış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Damboldt & Phitos (1972) Yunanistan’da *Petrorhagia graminea*, *P. fasciculata* ve *P. ochroleuca* türlerinin morfolojisi, varyasyonları, dağılımı ve akrabalık ilişkilerini ve kromozom sayıları üstüne çalışmışlardır.

Täckholm (1974) eserinde Mısır florasının *Caryophyllaceae* familyasının ve sahip olduğu cinslerin taksonomik özelliklerine ve cinsin teşhis anahtarlarına yer vermiştir.

Williams (1989) yaptığı çalışmada *Caryophyllaceae* familyasına ait taksonomik ve ekolojik bilgiler vermiştir.

Punt ve Hoen (1995) Kuzey Batı Avrupa’ nın *Caryophyllaceae* türleri için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada *Petrorhagia* türlerinden 3 tanesinin polen morfolojilerini incelemişlerdir. *P. saxifraga* 33.0-(34.5)-38.5, ekzin kalınlığı 3.0-4.0, silikon oil de hazırlanmış preparatlarda ise polen boyutunun 26.0-(28.5)-31.0, por sayısının ise 10-(14)-16, *Petrorhagia nanteuilii* için Gliserin Jelatinle yaptıkları preparatlarda polen boyutunun 56.0-(60.0)-62.5, ekzin kalınlığı 4.0-5.0, Silikon oil de hazırladıkları preparatlarda polen boyutunun 45.0-(51.0)-56.0 olduğunu, por sayısının ise 20-(22)-24; *P. prolifera*’nin Gliserin Jelatinle yaptıkları preparatlarda polen boyutunun 44.5-(48.5)-52.0, ekzin kalınlığının 3.0-4.5, silikon oil de hazırlanan preparatlarda ise polen boyutunun 38.0-(41.0)-44.0 por sayısının ise 14-(16)-18; olduğunu bulmuşlardır. Bu üç türün polen grubunun *Dianthus superbus* olduğunu belirtmişlerdir.

Ülkemizde de *Petrorhagia* taksonları üzerinde yapılan çalışmalar bulunmaktadır;

Çelebioğlu & Favarger (1993) Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren *Petrorhagia* türlerinden *P. saxifraga*'nin ve *P. alpina* subsp. *olympica*'nin kromozom sayısının $2n:30$ olduğunu bildirmişlerdir.

Ekim ve ark. (2000), Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)'nda Türkiye sınırları içinde yer alan eğrelti ve tohumlu bitkilerinin endemik olan ve olmayan, özellikle de tehlike altında olan türlerin listesini hazırlamışlardır. Türkiye'de yayılış gösteren *Petrorhagia* cinsine ait taksonların tehlike kategorilerini: *P. pamphylica*, *P. lycica* ve *P. hispidula*: Zarar Görebilir (Vulnerable) (VU), *P. peroninii*: Az Tehdit Altında (Lower risk). *P. armerioides* ve *P. syriaca* Veri Yetersiz (DD) (Data deficient) olarak gösterilmişlerdir.

Yıldız ve Çırpıcı (2000) Kuzey Anadolu *Caryophyllaceae* L. Taksonları ile ilgili korolojik bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda *Caryophyllaceae* familyasının Kuzey Anadolu'da yayılış gösteren 15 cinse ait, 16' sı endemik toplam 70 takson incelenmiştir. Bu çalışmada *Petrorhagia* cinsine ait incelen 3 tür şunlardır: *P. alpina* subsp. *alpina*, *P. saxifraga*, *P. prolifera*'dır.

Yıldız (2001) Türkiye'de yayılış gösteren *Caryophyllaceae* L. türlerini palinolojik açıdan incelemiştir. Bu çalışmada *Petrorhagia* cinsine bağlı üç türün polen morfolojisini ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobuyla (SEM) incelemiştir. İncelenen türlerin polen morfolojisi açısından özellikleri şöyle verilmiştir; *P. prolifera* polen çapı $40.92\mu\text{m}$, por çapı $5.73\mu\text{m}$, porlar arasındaki uzaklık $10.22\mu\text{m}$, ekzin kalınlığı $3.45\mu\text{m}$, por sayısı ise 13-16, *P. alpina* subsp. *alpina* Polen çapı $20.68\mu\text{m}$, por çapı $2.2\mu\text{m}$, porlar arasındaki uzaklık $5.00\mu\text{m}$, ekzin kalınlığı $1.92\mu\text{m}$, por sayısı 12-14; *P. Saxifraga* polen çapı $26.32\mu\text{m}$, por çapı $3.90\mu\text{m}$, porlar arası uzaklık $7.88\mu\text{m}$, ekzin kalınlığı $2.42\mu\text{m}$, por sayısı 12-15.

Yalçınkaya (2006) yüksek lisans tez çalışmasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbarium (ANK)'da *Caryophyllaceae* familyasının revizyonunu gerçekleştirmiştir.

ANK'da bulunan *Caryophyllaceae* familyasına ait 2326 bitki örneğinin incelenmesi sonucu 29 cins ve bu cinslere ait 410 takson tespit edilmiştir. *Petrorhagia* cinsine ait Türkiye'de daha önce kayıt altında olan 12 türün 10 (*P.*

armerioides ve *P. Syriaca hariç*) tanesinin herbaryum örneğinin olduğu bildirilmiştir.

Aktaş (2006) “Türkiye’nin *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) Cinsi Türleri Üzerinde Taksonomik Bir Çalışma” adlı doktora çalışmasında taksonlara ait morfolojik, anatomik, palinolojik ve sitolojik özellikleri kapsamlı bir biçimde ele alınmıştır.

Korkmaz (2007) yüksek lisans tez çalışmasında *Gypsophila* L. (*Caryophyllaceae*) cinsinin Türkiye revizyonuna hazırlık amacıyla tek yıllık taksonlarının biyosistemik özelliklerinin ortaya konulmasını hedeflemiş; bu amaçla sistematik, morfolojik, fenolojik ve habitat özelliklerini belirlemiştir. *G. Pilosa* ve *G. Confertifolia*’nın yetiştiği ortamların habitatında *Petrorhagia* türlerinin de sıklıkla rastlandığını not etmiştir.

Kılıç (2007) yüksek lisans tez çalışmasında Türkiye’de yayılış gösteren *Silene* L. (*Caryophyllaceae*) cinsinin seksiyonlarına ait taksonların morfolojik, anatomik, palinolojik ve tohum özellikleri, tür tanımları, teşhis anahtarları ve taksonların coğrafi yayılışları araştırılmıştır.

Ataşlar (2008) “Türkiye *Petrorhagia* (Ser.) Link., *Velezia* L., ve *Saponaria* L. Cinsleri Üzerinde Taksonomik, Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar” başlıklı proje çalışmasında *Petrorhagia* türleri araştırılmış ve daha önce zarar görebilir (Vulnerable) kategorisinde *P. pamphylica*, *P. lycica* ve Az Tehdit Altında (Lower risk) kategorisinde değerlendirilen *P. peroninii* türlerinin üçü de CR (Critically Endangered -Çok Tehlikede) kategorisine dahil edilmiştir.

Poyraz (2008) doktora çalışmasında Türkiye *Velezia* L. (*Caryophyllaceae*) cinsi revizyonunu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada anatomik, mikromorfolojik çalışmalar yapılmış ve çalışma RAPD-PCR DNA parmakizi tekniği ile desteklenerek cinsin filogenetik soyacı çıkartılarak türler arasındaki evrimsel ilişki belirlenmiştir.

Muca (2009) yüksek lisans tezi çalışmasında Türkiye’de yayılış gösteren *Ankyropetalum* Fenzl. (*Caryophyllaceae*) cinsine ait türlerin anatomik, morfolojik, palinolojik ve sistematik özellikleri incelemiştir. Çalışma alanlarının bir tanesinde kızılçam plantasyonunun olduğu yerlerde *Petrorhagia* türlerinin de baskın olduğunu gözlemlemiştir.

Güney (2009) yüksek lisans tezi çalışmasında Türkiye'de yayılış gösteren *Ankyropetalum* (*Caryophyllaceae*) cinsine ait *A. gypsophiloides*, *A. reuteri*, *A. arsusianum* türlerinin taksonomisi, morfolojisi, anatomisi, palinolojisi ve ekolojisini incelemiştir.

Aktaş ve ark. (2010a) Türkiye'de yayılış gösteren *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) taksonlarının bazı ekolojik özelliklerini çalışmışlardır. Bu çalışmada taksonların yayılış alanlarının özellikleri belirlenmiş, bitkilerin yetiştiği toprakların fiziksel ve kimyasal analizlerini yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir.

Aktaş ve ark. (2010b) Türkiye'nin *Petrorhagia* türlerinin polen morfolojisini Işık ve Elektron Taramalı Mikroskop (SEM) yardımıyla incelemiştir. Palinolojik sonuçlar ışığında türlerin sistematik açıdan ilişkilerini ele almışlardır.

1.6. Amaç

Bu çalışmayla Türkiye'nin değişik yerlerinden toplanmış *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) cinsinde bulunan 9 taksona ait toplam 45 birey kullanılarak PCR tabanlı teknik olan ISSR belirteçleriyle genetik akrabalık seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ISSR belirteçlerinin tür seviyesinde ayırddedici bantlar verip vermediği ve dolayısıyla tür tayininde bu belirteçlerden yararlanılıp yararlanılamayacağı ortaya konmuş olacaktır. Günümüze kadar olan literatürlerde *Petrorhagia* cinsine ait taksonlarla ilgili moleküler teknikler kullanılarak yapılan bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Ülkemizde bu cinse ait yapılan bu ilk moleküler çalışma sayesinde bu bitki türlerinin daha önceden morfolojik özellikleri kullanılarak yapılan taksonomik değerlendirmeler, moleküler belirteçler kullanılarak filogenetik verilerle doğruluğu üzerinde karşılaştırma olanağı sağlayacaktır. Ayrıca bu türlerle yapılacak olan daha kapsamlı moleküler çalışmalara ve tehlike kategorileri belirlenen cinsin bazı türlerinin korunmasına yönelik yapılacak çalışmalar içinde fikir verecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu tez kapsamında Türkiye’de yayılış gösteren *Caryophyllaceae* familyasından *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) cinsine ait 3’ü endemik 9 takson çalışma materyali olarak seçilmiştir. Bu türler Türkiye’den çeşitli yerlerden toplanmış ve her bir türden beşer birey kullanılacak şekilde toplam 45 bireyle materyaller çalışmaya hazır hale getirilmiştir. Bu çalışmadaki *Petrorhagia* türleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen “Türkiye *Petrorhagia* (Ser.) Link., *Velezia* L., ve *Saponaria* L. Cinsleri Üzerinde Taksonomik, Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar” başlıklı proje kapsamında (Proje No: 200319054) Öğrt. Görv. Dr. İlham ERÖZ-POYRAZ tarafından toplanılmış olup, herbaryum örnekleri OUFE kaydı ile saklanılmaktadır (Ataşlar, 2008).

Taksonların toplanma lokaliteleri şu şekildedir:

Petrorhagia lycica (Davis) Ball & Heywood

C2 Muğla: Fethiye, Babadağ, eşek bayıltan mevkisinin güneyi, 1525-1540 m, 21.07.2006, N 36° 31’ 67.4’’ E 29° 11’ 76.6’’, İEP 104, OUFE 13479.

Petrorhagia cretica(L.) Ball & Heywood

B2 Kütahya: Tunçbilek, Ömerler kömür ocağı girişi, 932 m, 25.06.2005, N 39° 40’ 48.5’’ E 29° 27’ 16.4’’, İEP 80, OUFE 13481. **C3 Isparta:** Şarkikaraağaç, Kızıldağ Milli Parkı, ca. 1200 m, 14.6.2004, İEP 24, OUFE 13480.

Petrorhagia alpina(Habl.) Ball & Heywood subsp. *alpina*

C4 Niğde-Aksaray: Hasan dağı, Taşpınar yaylası, 1730 m, 15.06.2006, İEP 95, OUFE 13483.

Petrorhagia alpina(Habl.) Ball & Heywood subsp. *olympica* (Boiss.) Ball & Heywood

A2 Bursa: Uludağ, Sarıalan, 1634 m, 06.07.2006, İEP 102, OUFE 13486. Dumlupınar, Oysu köyü çıkışı, *Juniperus-Pinus* ormanı, taşlık kuzey yamaç, 1090 m, 29.05.2006, N 38° 58' 20.2'' E 29° 51' 17.8'', İEP 91, OUFE 13485.

Petrorhagia saxifraga (L.) Link

A5 Samsun: Ladik, Hamamayağı-Ladik, kuzey doğu taşlık yamaç, 795 m, 28.06.2005, N 40° 58' 9.2'' E 35° 47' 14.8'', İEP 83a, OUFE 13493; Ladik, Hamamayağı'na ca. 9 km kala, taşlık kuzey yamaç, 930 m, 28.06.2005, N 40° 55' 57.5'' E 35° 50' 24.3'', İEP 84, OUFE 13488.

P. pamphylica (Boiss. & Ball) Ball & Heywood

C2 Antalya: Korkuteli-Antalya, 33. km, 415 m, yolun güney doğusu, Düzlerçamı köprüsünden sonra, yol kenarı, İEP 105, OUFE 13489. **C3 Antalya:** Gebiz, mezar yanı, 20 m, kuzey batı yönünde, yer yer *Quercus* ve *Pinus* altı, 23.07.2006, N 37° 07' 22.2'' E 30° 54' 74.9'', İEP 106, OUFE 13490.

P. peroninü (Boiss.) Ball & Heywood

C4 Antalya: Antalya: Alanya, Mahmutlar-Gözüküçüklü, biçilmiş tarla içi, güney-güney batı yamaç, 109 m, 06.09.2006, N 36° 29' 38.1'' E 32° 07' 24 9'', İEP 110, OUFE 13491.

P. prolifera (L.) Ball & Heywood

A3 Zonguldak: Devrek-Eğerci yolu, Özbağı'na 300 m kala, 190 m, 30.7.2004, çay kenarının üst kısmı, yol kenarı, İEP 43, OUFE 13492. **A5 Samsun:** Ladik, Hamamayağı-Ladik, kuzey doğu taşlık yamaç, 795 m, 28.06.2005, N 40° 58' 9.2'' E 35° 47' 14.8'', İEP 83b, OUFE 13487.

P. dubia(Rafin.) G. López & Romo

C2 Antalya: Kaş-Kale, Kekova kavşağından 5 km sonra, güney, *Quercus* altı, 420 m, 24.04.2005, N 36° 15' 46.4'' E 29° 57' 04.0'', İEP 48, OUFE 13516; Kaş-Kale, Kale girişi, Demre girişine 3 km kala, 30 m, 24.04.2005, N 36° 14' 09.9'' E

29° 58' 19.9'', İEP 49, OUFE 13517; Demre-Beymelek, yol kenarı, 2 m, 24.04.2005, İEP 50, OUFE 13518.

2.2. Yöntem

Araştırmada kullanılmış olan PCR tabanlı ISSR tekniği DNA izolasyonu, saflık ve miktar ölçümleri, PCR uygulamaları ve PCR ürünlerinin Agaroz Jel' de yürütülerek jel görüntüleme sisteminde görüntülenmesi son olarak da bilgisayar analiz programları yardımıyla yorumlanmasına dayanmaktadır.

2.2.1. Bitki örneklerinin laboratuvar çalışmaları için hazırlanması

Planlanan çalışma için arazi çalışmaları önceden yapılmış ve bitki örneklerinin teşhisi gerçekleştirilmiştir. Moleküler analizlerde kullanılacak DNA materyalini izole etmek amacıyla bitkilerden toplanan genç yapraklar kuru buz içerisinde laboratuvara getirilerek -20 °C'ye konulmuştur. Bundan sonraki aşama yapraklar alınıp sıvı azot ile beraber havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen bitki örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

2.2.2. DNA izolasyonu ve saflaştırılması

DNA izolasyonu için daha önceki çalışmalarımızdan yapılan ön denemelerde en uygun yöntemin 2XCTAB (setil three metil amonyum bromid) (Doyle ve Doyle, 1987) yöntemi olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı, bu çalışmada da DNA izolasyonu 2XCTAB metoduna göre yapılmış ve kullanılan ekstraksiyon çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

CTAB Litik Tampon hazırlanması;

NaCl	14 ml 1.4 M veya 4.095 g toz
Tris 1M (pH=8)	5 ml
CTAB (setil three metil amonyum bromid)	1 gr
EDTA (0.5 M)	2 ml
PVP (polyvynil pyrodine)	0.5 gr

Solüsyonun son hacmi 50 ml'ye steril distile su ile tamamlanmış ve 120°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Steril edildikten sonra tampona 200 µl merkaptolanol eklenmiştir.

Daha sonra DNA izolasyonu prosedürüne devam edilerek izolasyon tam olarak gerçekleştirilmiştir.

2X CTAB DNA İzolasyonu:

- Çalışmadan önce 2x CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) tamponu 65°C'de ısıtılmış ve hazır hale getirilmiştir.
- Sıvı azotta öğütülmüş 200- 500 mg *Petrorhagia* türleri dokusu 2ml'lik ependorf tüplerine alınarak üzerine 800-1500 µl CTAB tamponu eklenerek homojen hale gelene kadar yavaşça pipetlemiştir.
- Karışım tüpü 62°C'de 30-60 dakika inkübe edilmiş ve her 5 dk. bir tüpler alt üst edilmiştir.
- Karışım tüpüne eşit hacimde kloroform:isoamil alkol eklenmiş ve 10 dakika boyunca alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Karışım 7500 rpm'de 10 dakika 30 santrifüjlenmiş ve üstte kalan sıvı kısım yeni tüpe aktarılmıştır. Aktarılan miktar µl cinsinden kayıt edilmiştir.
- Aktarılan miktarın 2/3'ü kadar -20°C'de bekletilen isopropanol karışıma eklenmiş birkaç kere alt üst edildikten sonra -20°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışım tüpü 10 000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir.
- DNA peleti 300 µl % 70'lik etil alkol ile yıkanmış ve çeker ocakta kuruyana kadar bekletilmiştir. Kuruyan DNA peleti istenilen DNA konsantrasyonuna göre steril deiyonize suda çözündürülmüştür. (Doyle ve Doyle, 1987; Poyraz, 2007)

2.2.3. DNA konsantrasyonunun spektrofotometrik ölçümü

İzolasyonu sonucu elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık tayinleri Nanodrop spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okunarak

tespit edilmiştir. Ayrıca DNA örneklerinin kalitesi %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek de belirlenmiştir. Elde edilen miktarlar kullanılarak DNA'lar µl'inde 2 ng olacak şekilde seyreltilmiş ve çalışma solüsyonu olarak kullanılmıştır.

2.2.4. ISSR-PCR analizleri

Bitki örneklerinden izole edilmiş DNA'lar ile özel olarak üretilen laboratuarlardan hazır halde satın alınacak primerler kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'nın amplifikasyonu PCR metodu ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesinde şu formül kullanılmıştır:

$$(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}$$

ISSR tekniği, 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak PCR reaksiyonunda kullanılmasını, PCR ürünlerinin elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir (Zietkiewicz ve ark., 1994). Primer olarak 2 ile 4 arasında değişen farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen, basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılır. Bir reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı kombinasyonları primer olarak aynı reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA zincirlerinin sayısını arttırılır. Dolayısıyla da bir tek jel üzerinde üretilebilecek bant ya da markır sayısı arttırılır. Bu, diğer DNA markırlarının üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar (Fang ve ark., 1997). RAPD markırlarında olduğu gibi, genellikle dominant markırlar verir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Amplifikasyonda 10 adet ISSR markörü kullanılmıştır. Bu primerlerle ilgili ayrıntılı PCR reaksiyonları Progene ve Techne TC-5000 gradient termal döngü aleti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.1. Amplifikasyonda kullanılan ISSR primerleri ile ilgili ayrıntılı bilgiler

Primerin adı	Primerin dizisi (5'.....3')	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Primer uzunluğu (bç)	G/C (%)
GAG-(CAA) ₅	gAg CAA CAA CAA CAA CAA	50	18	38.89
VHV-(GT) ₇ G	VHV gTg TgT gTg TgT gTg	54	18	44.44
(GT) ₈ YC	gTg TgT gTg TgT gTg TYC	54	18	50.00
(AG) ₈ T	AgA gAg AgA gAg AgA gT	50	17	47.06
(AG) ₈ C	AgA gAg AgA gAg AgA gC	52	17	52.94
(AC) ₈ C	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52	17	52.94
(AGC) ₆ G	AgC AgC AgC AgC AgC AgC g	64	19	68.42
(AGC) ₆ C	AgC AgC AgC AgC AgC AgC C	64	19	68.42
BDB-(ACA) ₅	BDB ACA ACA ACA ACA ACA	52	18	27.78
DD-(CGA) ₅	DDC gAC gAC gAC gAC gA	54	17	58.82

Y= (C,T) B= (C,G,T) D= (A,G,T) V= (A,G,T)

Hazırlanan PCR mix için uygulanan PCR protokolü şöyledir;

Çizelge 2.2. Uygulanan PCR Protokolü

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94 °C	4 dk	1
Denatürasyon	94 °C	45 sn	45
Bağlanma	50-64 °C	45 sn	
Uzatma	72 °C	90 sn	
Son uzatma	72 °C	7 dk	1
	4	Bekleme	

2.2.5. Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Yürütme

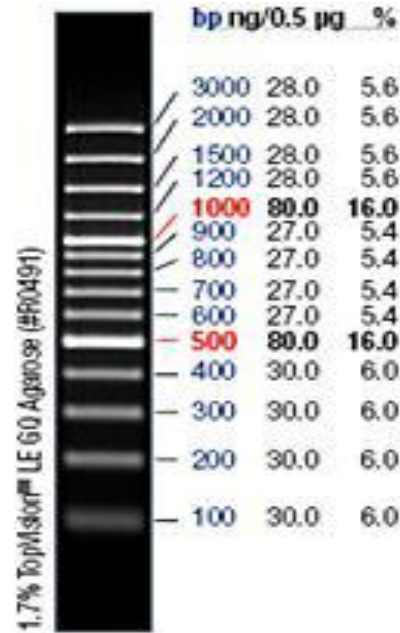
DNA ve PCR ürünleri yatay jel elektrofrez kiti (Thermo Ltd.) kullanılarak agaroz jel üzerinde ayrıştırılmıştır. İzole ettiğimiz DNA'ların ayrımı için %0,8'lik, PCR ürünlerimizin ayrımı için %1,2'lük agaroz jeller kullanılmıştır.

Agaroz jeller 5X TBE tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. 0.5X TBE tamponu içinde kaynatılan agaroz katılaşmadan önce DNA'ların ayırımında 2 µl PCR ürünlerimizin ayırımı için ise 4 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırılıp ve jel tablasına döküldükten sonra, 0.5X TBE tamponu elektroforez tankında tampon solüsyonu olarak kullanılmıştır.

PCR ürünlerini jelde yürütmek için her bir örnekten 6 µl alınmış ve 1 µl yükleme tamponu ilave edilerek kuyucuklara yüklenmiştir. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla jele 100 bç markörleri de yüklendikten sonra %1,2' lik jel 90V'da 80 dakika yürütülmüştür.

2.2.6. DNA bantlarının görüntülenmesi ve değerlendirilmesi

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra oluşan bant profilleri UV transilüminatörü altında gözlemlenmiş ve Uvitec marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Amplifikasyon sonucu oluşan ISSR bantlarının büyüklükleri DNA markırlarındaki bantların büyüklükleri ile kıyaslanarak yapılmıştır.



Şekil 2.1. Fermentas GeneRuler 100 bç DNA Ladder Plus

Ayrıca her bir primerden elde edilen bantların Gel Pro Analyzer 4.0 programı kullanılarak moleküler ağırlıkları ayrıntılı olarak tek tek hesaplanmıştır. Gel Pro

Analyzer 4.0 programında her bir primer için elde edilen analiz sayıları ile jel fotoğrafları karşılaştırılarak bantların her bireyde var (1) ya da yok (0) şeklinde sayılmasıyla ikili matris oluşturulmuştur. Genetik çeşitlilik seviyeleri polimorfik bant yüzdesi (PPB), gözlenen allel sayısı (n_a), etkili allel sayısı (n_e), toplam heterozigotluk (H_i), Shannon indeks değerleri (I) ve Nei genetik çeşitlilik (h) POPGENE-Version 1.32 (Population Genetic Analysis) bilgisayar paket programı ile analiz edilmiştir. Genetik uzaklık değerleri (Nei, 1978) UPGMA tekniğiyle dendogram oluşturmada kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu

Doğadaki canlıların tümüne yakın kısmında genetik materyal DNA'dır. Bu nedenle genetik materyalle yapılacak çeşitli çalışmalarda moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanabilmesi için öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. Yaptığımız bu çalışmada *Petrorhagia* cinsine ait 9 takson ve her taksondan 5'er birey olacak şekilde toplam 45 bireye ait bitkilerin her birinin ayrı ayrı genç yapraklarından alınan örnekler sıvı azot içinde, porselen havan ve tokmak yardımıyla öğütülmüş, pudra haline getirilmiştir. 2XCTAB yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra öğütülen bu materyallerden laboratuvarımızda rutin olarak kullanılan 2XCTAB (setil three metil amonyum bromid) (Doyle ve Doyle, 1987) yöntemiyle genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.1.1. DNA Miktar ve Saflık Tayini

Nükleik asitlerin nanogram veya mikrogram düzeyindeki miktarlarının belirlenmesi, moleküler biyoloji alanında çalışan araştırmacılar için temel noktalardan biridir. Genellikle izole edilen kromozomal ve/veya kromozom dışı DNA'ların miktar tayininde absorpsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Toplam 45 bitki örneğinden izole edilmiş DNA'ların miktarları Nanodrop Spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre 2XCTAB yöntemi kullanılarak 200-500 mg arası bitki örneği öğütülmüş materyallerden en düşük 95.0 ng/μl ve en yüksek 3854,8 ng/μl arasında miktarlarda genomik DNA elde edilmiştir. 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri DNA ve RNA'yı birbirinden tam olarak ayırt edememektedir. Bununla beraber 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı (temizliği) hakkında bilgi vermektedir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık olarak 1.8-2.0 arasında olmalıdır. Eğer ortamdan fenol ya da protein gibi kirleticiler yeterli düzeyde uzaklaştırılmamışsa bu değer beklenenden daha düşük olarak gözlemlenecektir. Bu çalışma kapsamında elde

edilen her bireye ait saflık değerleri 1.86 - 2.30 arasında değişmektedir. 2.0' ın üzerinde olan saflık değeri ilgili DNA örneklerinde fenol ve kloroform varlığını işaret etmektedir. Fakat elde edilen DNA'lar PCR analizinde başarı ile çalıştıklarından o örneklerden yeniden DNA izolasyonu yapmaya gerek kalmamıştır. *Petrorrhagia* (Ser.) Link cinsinin elimizdeki taksonlara ait toplam 45 bireyin DNA miktar ve saflık değerleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR analizi için izole edilen örneklerin DNA miktar ve saflık değerleri

	Taksonlara ait bireyler	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
<i>P. alpina</i> <i>subsp.</i> <i>alpina</i>	1	1400.8	2.23
	2	522.4	2.05
	3	3406.4	2.30
	4	1.111	2.11
	5	3854.8	2.10
<i>P. alpina</i> <i>subsp.</i> <i>olympica</i>	6	238.4	1.95
	7	171.4	1.90
	8	210.4	2.08
	9	213.6	1.86
	10	196.2	1.86
<i>P. cretica</i>	11	420.5	1.85
	12	216.9	1.87
	13	252.9	1.90
	14	1463.7	2.07
	15	498.1	2.01
<i>P. dubia</i>	16	390.0	2.06
	17	396.3	2.12
	18	467.3	2.04
	19	466.7	1.93
	20	504.0	1.89

Çizelge 3.1. (Devam) PCR analizi için izole edilen örneklerin DNA miktar ve saflık değerleri

	Taksonlara ait bireyler	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
<i>P. lycica</i>	21	153.7	2.01
	22	352.6	1.98
	23	172.6	1.89
	24	416.9	2.12
	25	3410.6	2.12
<i>P. peroninii</i>	26	485.9	1.96
	27	342.9	1.90
	28	1779.9	1.97
	29	414.1	2.0
	30	1726.9	2.13
<i>P. pamphylca</i>	31	263.3	2.03
	32	264.2	2.08
	33	459.3	2.01
	34	113.8	2.09
	35	395.5	2.20
<i>P. prolifera</i>	36	262.0	1.90
	37	95.0	1.82
	38	197.9	1.91
	39	226.4	1.83
	40	208.1	1.95
<i>P. saxifraga</i>	41	404.6	2.19
	42	867.7	2.03
	43	836.2	2.07
	44	399.6	1.97
	45	385.5	2.34

3.2. ISSR-PCR Optimizasyonu

Elde edilen genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan parametreler reaksiyon koşullarına karşı duyarlı olduğundan her bir parametrenin miktar ya da sıcaklığının optimize edilmiş olması gerekmektedir. Kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, primer, MgCl₂ konsantrasyonu, bağlanma (annealing)

sıcaklığı ve çevresel faktörler DNA amplifikasyonunu etkilemektedir. Reaksiyon bileşeni olan her bir parametre için çeşitli reaksiyonlar kurularak optimum miktarlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu sayede optimum çalışma protokolü elde edilmiştir.

3.2.1. Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu

Bu tezde çalışılan taksonlardan ilk önce her taksondan bir birey seçilerek toplam 24 ISSR primeri test edilmiştir. Her bir primer için 100 µM 'lık stok solüsyondan 2.5 µM' lık çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan çalışma solüsyonlarından ilk önce birkaç örnek seçilerek 1.5, 2, 3 ve 4 µl kullanılarak reaksiyonlar test edilmiştir. Elde edilen ürünler agaroz jel ile kontrol edilmiş ve çalışan primerlerde en iyi sonuçlar 1.5 ve 2 µl'de alınmıştır. İyi sonuç veren ISSR primerlerinden 10 tanesi bunların arasından tercih edilmiştir.

3.2.2. MgCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu

Magnezyum, *Taq* DNA polimeraz enziminin etkinliğini belirleyen önemli bir reaksiyon bileşenidir. Eğer reaksiyon karışımı içerisinde yeterli oranda magnezyum olmadığında *Taq* DNA polimeraz enziminin etkinliği azalır ve buna bağlı olarak amplifikasyon ya gerçekleşmez ya da çok zayıf sonuç verir. Tam tersi durumda yani ortamda fazla magnezyum varlığında ise enzimin spesifikliği azalır ve istenmeyen ürün oluşumu söz konusu olur. Genellikle optimum Mg⁺² konsantrasyonu 0.5-5.0 mM'lık değerler arasındadır.

Mg konsantrasyonunu reaksiyonun spesifikliğini ve özellikle ürün kalitesini etkileyen bir faktördür. Bundan dolayı her bir primer için optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyonda 1.5 ve 2 µl olacak şekilde Mg⁺² kullanılmış ve en iyi sonuçlar primerlere göre değişkenlik göstermekler beraber 1.5 ve 2 µl'lik konsantrasyonlardan elde edilmiştir. Sonuç olarak yapılan tüm protokollerde her bir primer için belirlenen en uygun Mg⁺² konsantrasyonu 1.5 ve 2 µl olacak şekilde kullanılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmalarında Mg⁺² konsantrasyonunun elde edilen bantların parlaklığını ve sayısını etkilediği sonucuna varılmıştır. Yüksek Mg⁺² konsantrasyonunda elde edilen bantlar daha

parlak olmasına karşın, spesifik olmayan amplifikasyon ürünü oluşumu meydana gelmiştir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonunda ise bant oluşumu daha silik ve zayıf olurken, ürün oluşumu da nispeten daha azdır.

3.2.3. Kalıp DNA konsantrasyonunun optimizasyonu

Kullanılan kalıp DNA polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) en kritik parametrelerinden birisidir. Reaksiyon koşullarının optimizasyonunda kalıp DNA miktarının da mutlaka optimize edilmesi gerekmektedir. İzole edilen DNA'nın saflığı ve kalitesi amplifikasyonun başarısını belirler. İzolasyon sırasında yeterli kadar ortamdaki uzaklaştırılmayan fenol, protein, tuz gibi inhibitörler DNA'nın saflığını olumsuz yönde etkilemektedir. Kalıp DNA miktarının fazla olması amplifikasyonun başarısız olmasına yani hedef DNA'ya primerin bağlanmasına engel olabilir. Ayrıca reaksiyon içindeki kalıp DNA'nın azlığı ya da fazlalığı elde edilen amplifikasyon ürün sayısını, netliğini etkilemektedir. İzole ettiğimiz DNA'lardan μl 'de 2 ng olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Bu solüsyonlardan 2, 3, 4 ve 5 μl DNA kullanılarak reaksiyonlar yapılmıştır. En iyi sonuçlar 1.5 ve 2 mikrolitrede elde edilmiş ve gerçekleştirilen tüm reaksiyonlarda 2 μl yani 4 ng kalıp DNA kullanılmıştır.

3.2.4. Primer bağlanma ısısı optimizasyonu

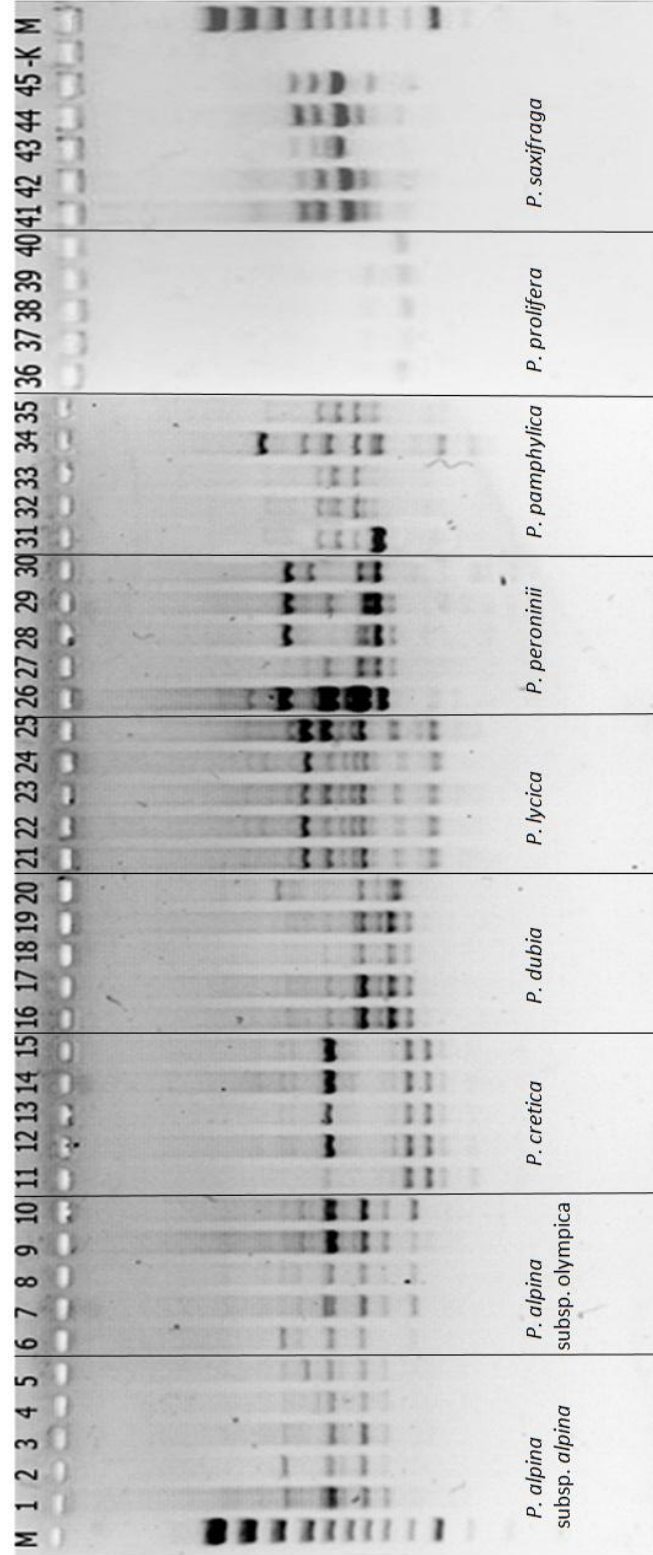
Bu tez kapsamında çalışılan *Petrorhagia* cinsine ait taksonlar için denenen ISSR primerlerinden en iyi sonuç veren 10 ISSR primeri tercih edilmiştir. Amplifikasyona başlamadan önce 10 primerin her birinin bağlanma (annealing) sıcaklığı belirlenmiştir. Bunun için öncelikle her bir primerin bağlanma sıcaklıkları parantez içinde verilen formül yardımıyla tespit edilmiştir:

$$[(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}]$$

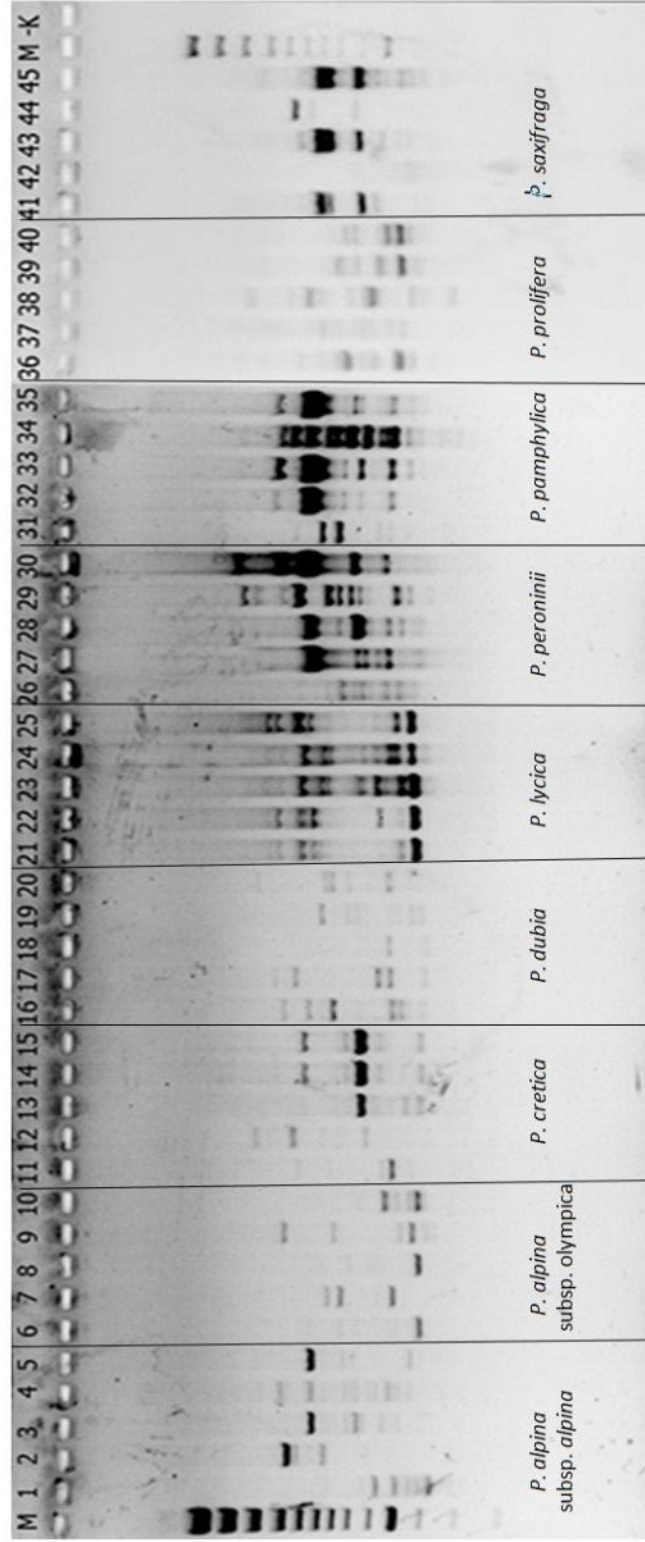
Belirlenen bu değerlerin -4 ve +4 $^\circ\text{C}$ aralıkları Techne TC-5000 gradient termal döngü aleti kullanılarak denenmiş ve her bir primerin en iyi çalıştığı bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerlerin optimizasyon değerleri

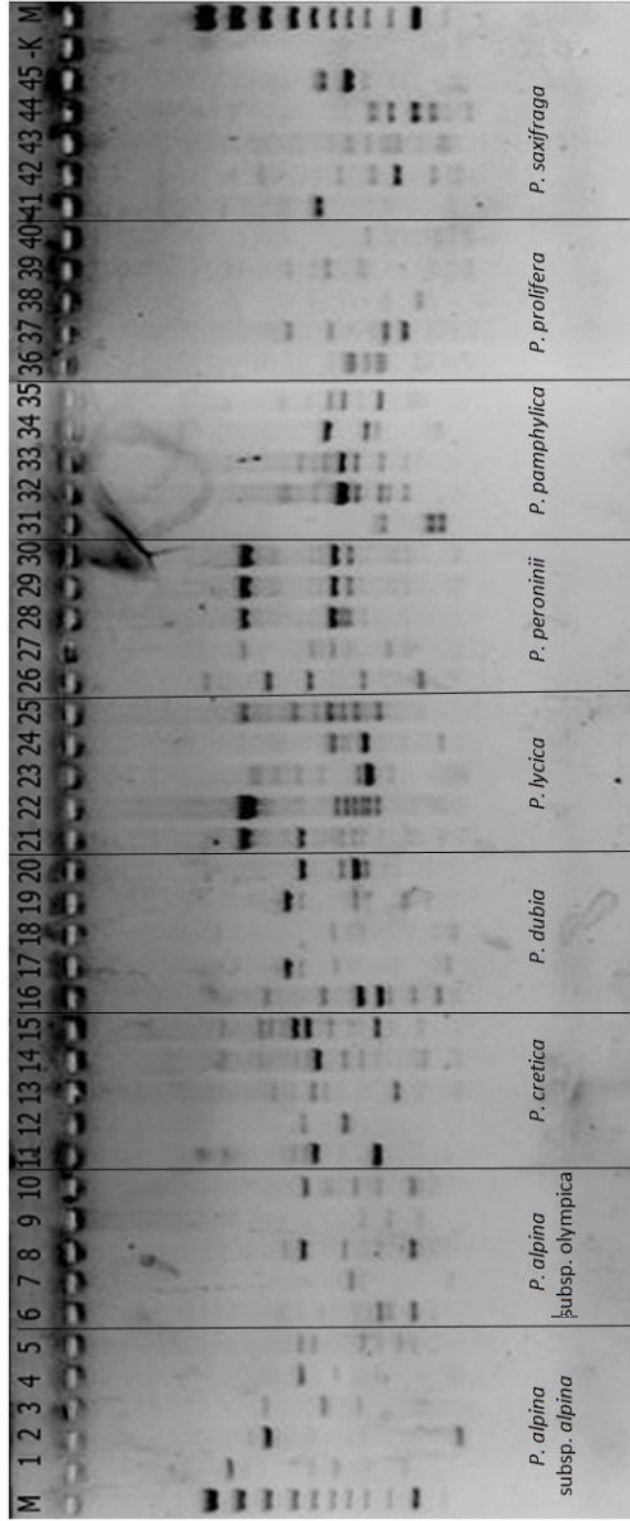
Primer Adı	TEST EDİLEN DEĞERLER				OPTİMUM DEĞERLER			
	T _a (°C)	MgC ₂ (mM)	Primer (mM)	Kalıp DNA(ng)	T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	Primer (mM)	Kalıp DNA (ng)
GAG-(CAA) ₅	50	2	1.5-2-3	4-8	50	2	1.5	4
VHV-(GT) ₇ G	54-55	2	2-3	4-8	54	2	2	4
(GT) ₈ YC	50-54-55	2	2-3	4-8	54	2	2	4
(AG) ₈ T	50	2	2	4-8	50	2	1.5	4
(AG) ₈ C	49-50-51-52	1.5-2	1.5-2	4-8-10	52	2	2	4
(AC) ₈ C	52	1.5-2	1.5-2	4-10	52	2	2	4
(AGC) ₆ G	64	1.5-2	1.5-2-3	4-8	64	2	1.5	4
(AGC) ₆ C	64	1.5-2	1.5-2-3	4-8	64	2	1.5	4
BDB-(ACA) ₅	49.5-50-52	1.5-2	1.5-2-3	4-8	52	2	1.5	4
DD-(CGA) ₅	54-55	2	2-3	4-8	54	2	2	4



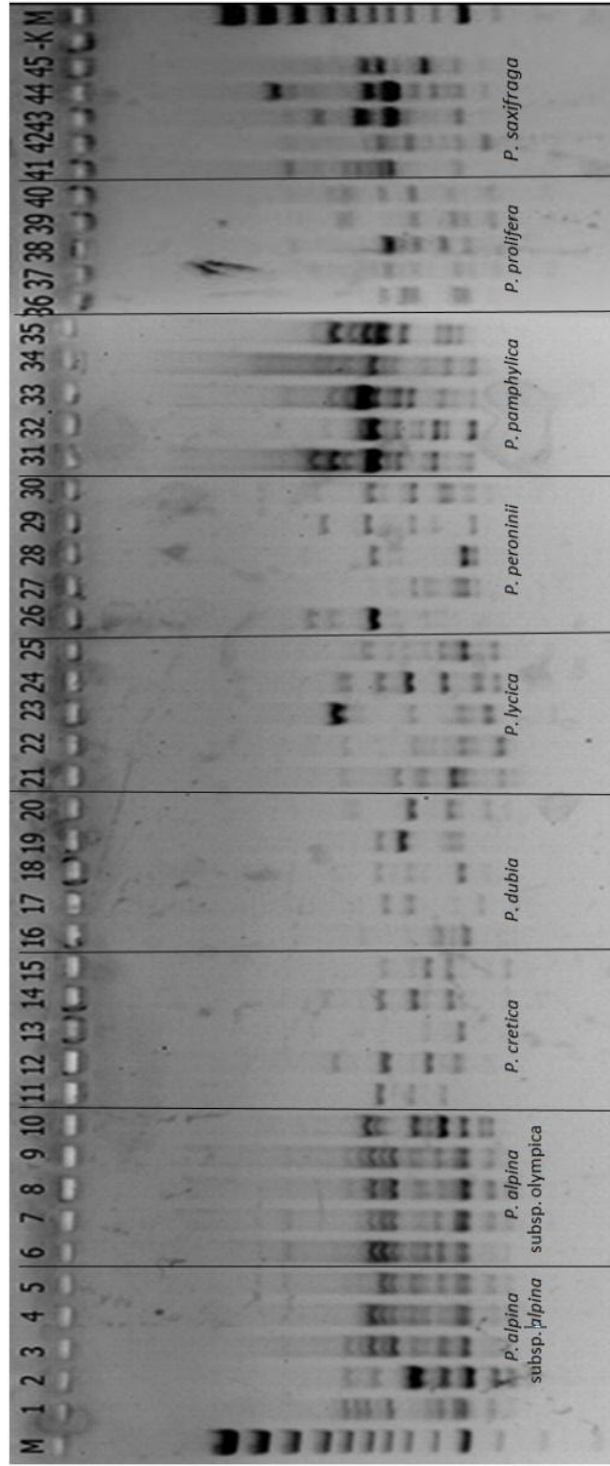
Şekil 3.1. GAG-(CAA)₅ primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



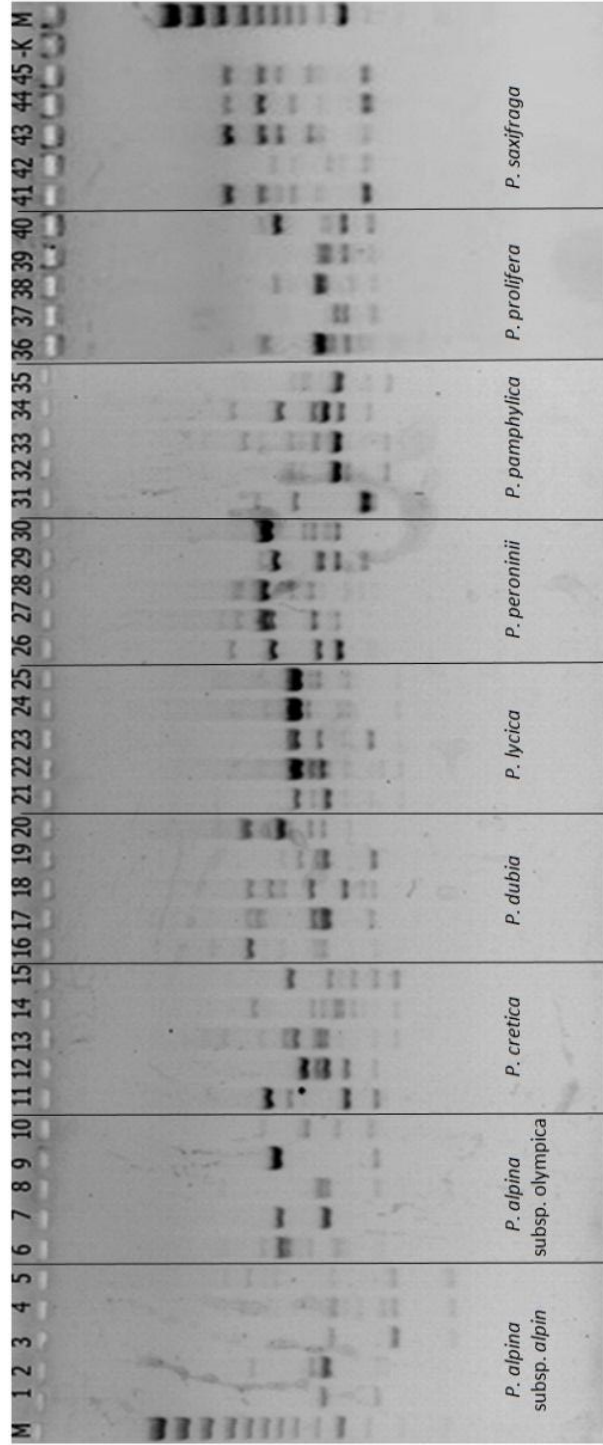
Şekil 3.2. VHV-(GT)₇G primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



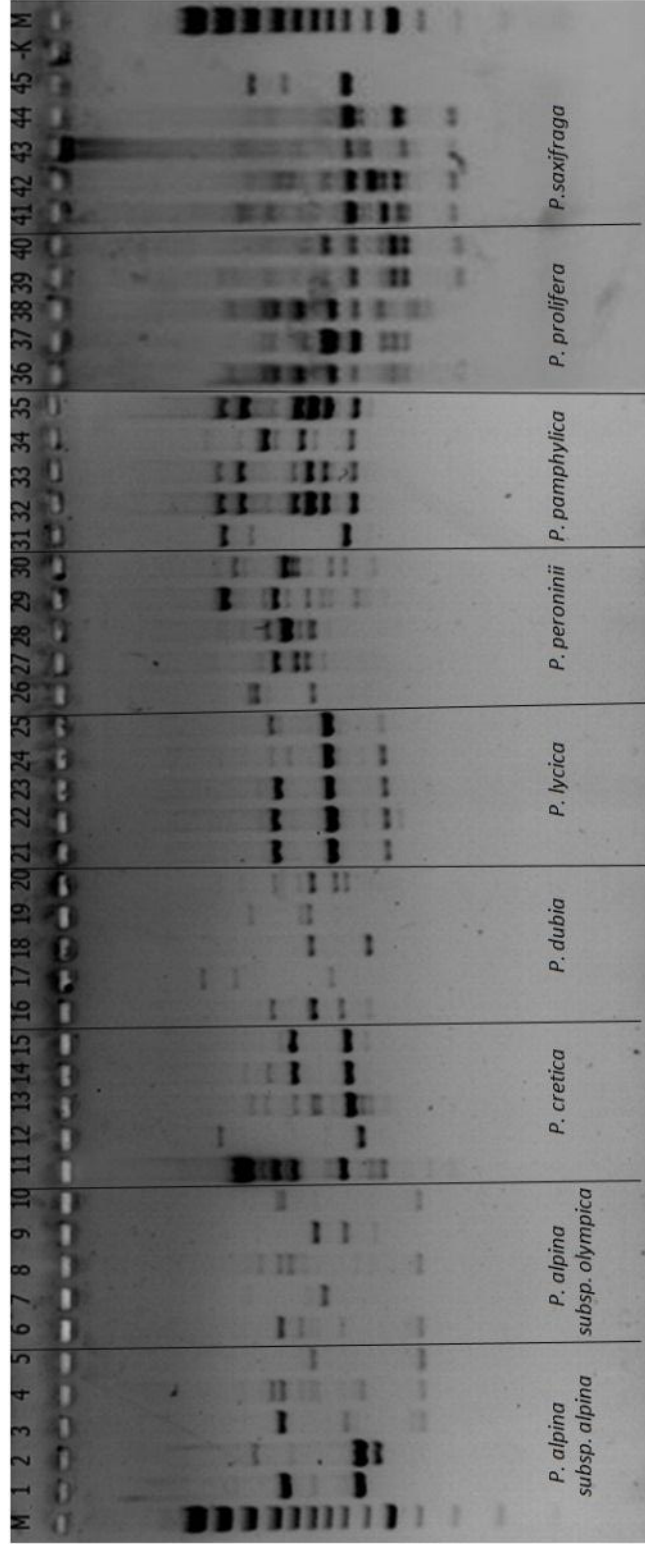
Şekil 3.3. (GT)₈YC primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



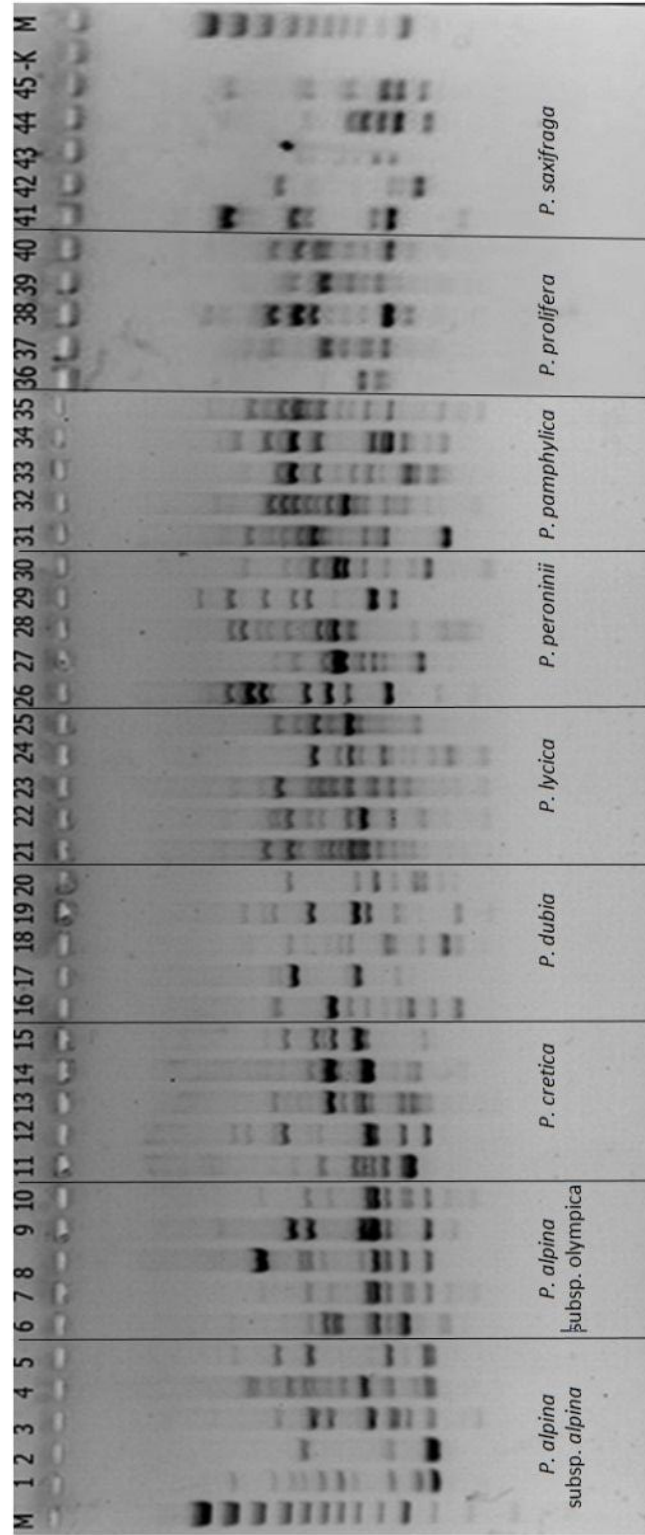
Şekil 3.4. (AG)₈T primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



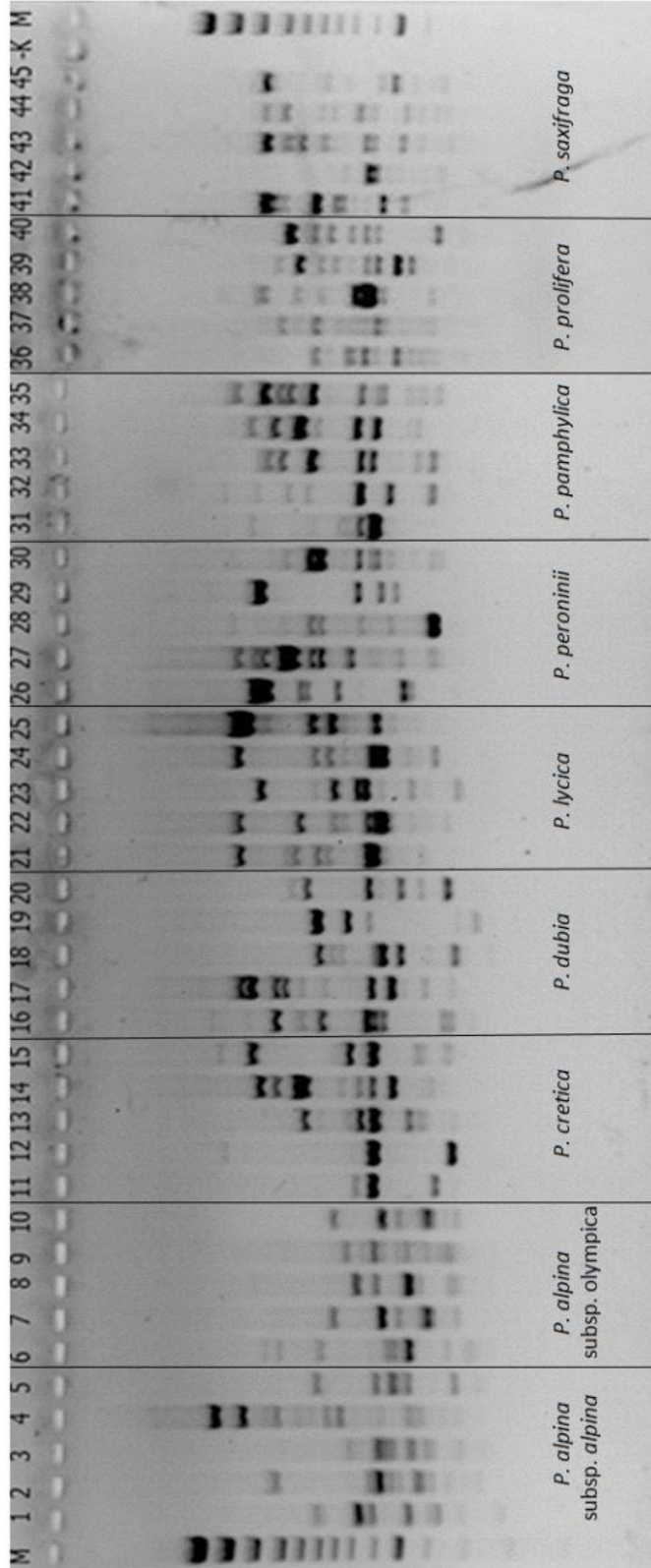
Şekil 3.5. (AG)8C primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



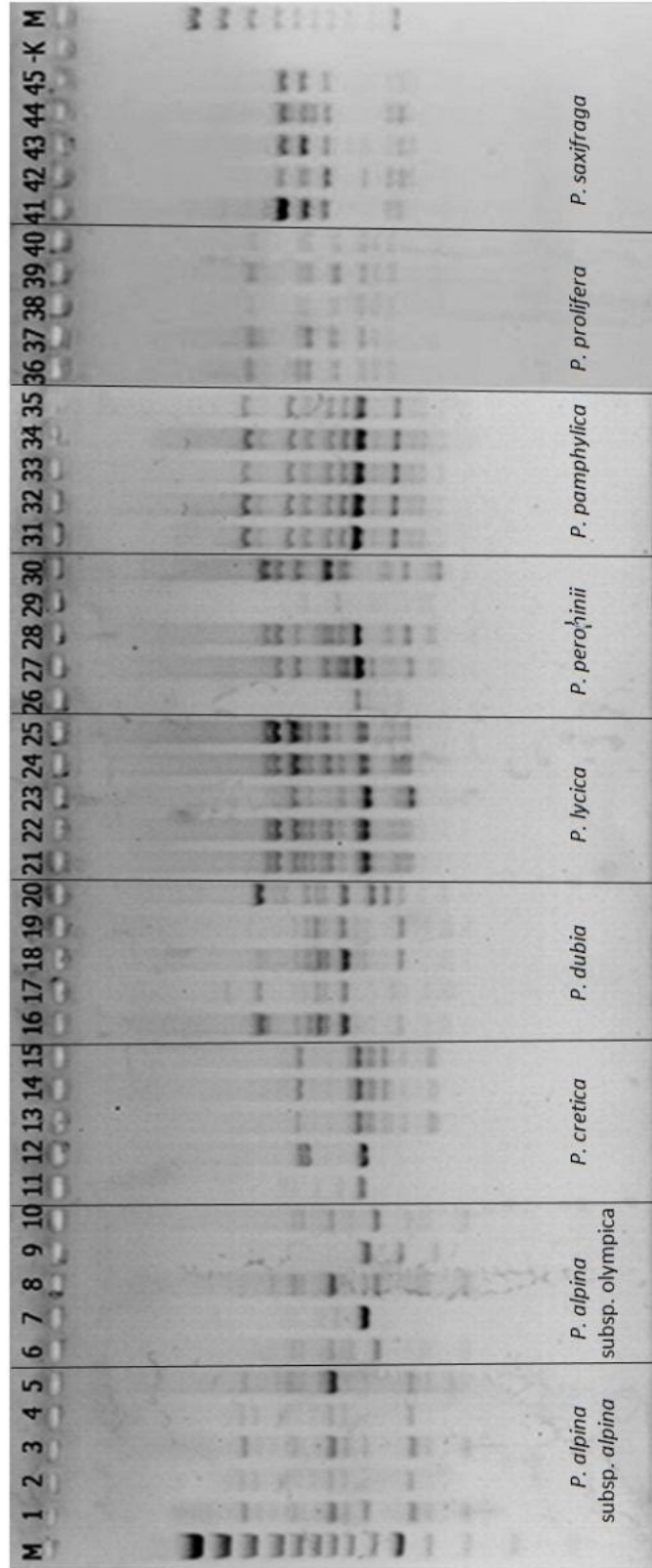
Şekil 3.6. (AC)₈C primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



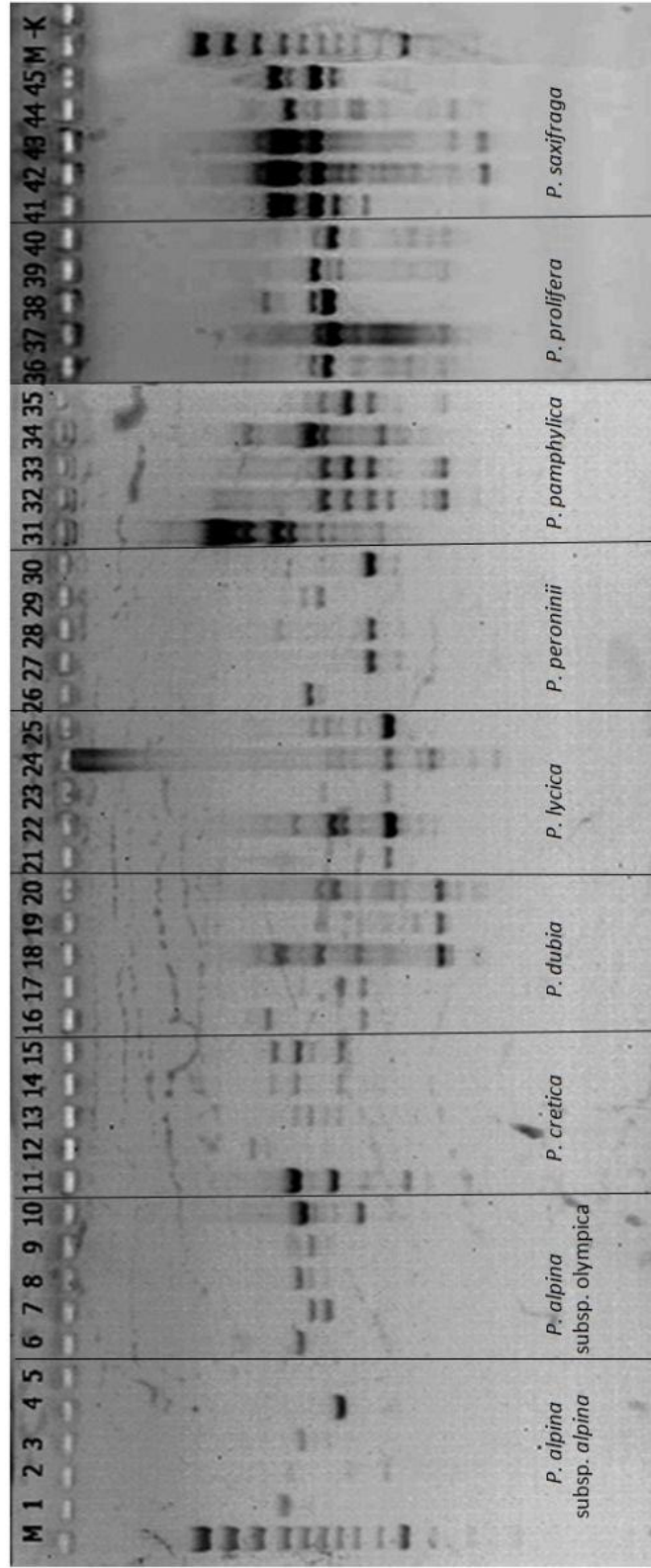
Şekil 3.7. (AGC)₆G primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



Şekil 3.8. (AGC)₆C primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



Şekil 3.9. BDB-(ACA)₅ primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri



Şekil 3.10. DD-(CGA)₅ primeri ile *Petrorhagia* bireylerinde oluşan bant profilleri

3.3. ISSR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada 10 adet ISSR primeri kullanılmış ve toplam 409 adet ISSR bantı oluşturmuştur. Daha sonra bantlar her bireyde var (1) ya da yok (0) şeklinde sayılmasıyla ikili matris oluşturulmuştur. DNA bantlarının değerlendirilirken türler arasındaki genetik mesafe POPGENE32 versiyon 1.32 (Population Genetic Analysis) bilgisayar paket programı ile analiz edilmiştir. Primerlerin oluşturduğu bant sayıları 25 ile 64 arasında değişmekte olup, ortalama bant sayısı 41,1'dir. Bantların büyüklükleri 200 bç ile 2500 bç arasında değişmektedir. Fakat bantlar en çok 500 ile 1500 bç arasında bulunmaktadır. En küçük bant büyüklüğü (AG)₈T primerinde 200 bç olarak, en büyük bant ise (AGC)₆C primerinde 2500 bç olarak saptanmıştır. Primerlere göre bant sayıları ve büyüklükleri ayrıntılı olarak çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. ISSR primerlerinin oluşturdukları bant sayıları ve büyüklükleri

Primer Adı	Bant sayısı	En küçük bant (bç)	En büyük bant (bç)
GAG-(CAA) ₅	37	450	2000
VHV-(GT) ₇ G	34	295	1885
(GT) ₈ YC	43	329	1955
(AG) ₈ T	25	200	1440
(AG) ₈ C	29	359	1864
(AC) ₈ C	38	446	1792
(AGC) ₆ G	54	261	2143
(AGC) ₆ C	64	220	2500
BDB-(ACA) ₅	36	300	2000
DD-(CGA) ₅	49	250	2417

Çalışılan primerlerin tamamı polimorfik özellik göstermiştir. 10 ISSR primeri toplam 409 bant oluşturmuş olup türler arasında değerlendirildiğinde bu bantların hepsi polimorfiktir. En az bant veren (AG)₈T primeri 25 bant, en çok bant veren (AGC)₆C primeri 64 bant vermiştir. Böylece primerlerin oluşturduğu bantlar türler arası değerlendirildiğinde polimorfizm oranı % 100' dür. Fakat bazı primerlerin tür içi çeşitliliği belirlemede daha güçlü sonuçlar verdiği ve monomorfik bant sayısının tür içi açısından değerlendirildiğinde ise yüksek derecede ayırım sağlandığı gözlenmiştir. Kullanılan ISSR primerlerinin *Petrorhagia* taksonlarında alttür ve tür içi oluşturdukları monomorfik bant durumları çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. ISSR primerlerinin *Petrorhagia* taksonlarında tür içi oluşturdukları monomorfik bant sayıları

	GAG - (CA A) ₅	VHV - (GT) 7G	(GT) ₈ YC	(AG) 8T	(AG) 8C	(AC) 8C	(AGC) 6G	(AGC) 6C	BDB - (AC A) ₅	DD- (CG A) ₅
<i>P. alpina subsp. alpina</i>	3	-	-	-	3	-	-	-	3	-
<i>P. alpina subsp. olympica</i>	3	-	-	-	6	-	3	-	-	-
<i>P. cretica</i>	4	-	-	1	-	-	-	1	-	1
<i>P. dubia</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	3	1
<i>P. lycica</i>	5	1	-	2	-	2	1	-	6	3
<i>P. peronini</i>	3	-	1	-	-	-	-	1	-	-
<i>P. pamphylia</i>	1	1	-	-	1	-	-	1	7	3
<i>P. proliferata</i>	1	-	1	2	1	2	1	3	7	3
<i>P. saxifraga</i>	1	-	1	1	3	1	1	1	5	4

Tür içi ve türler arası genetik çeşitlilik analizi POPGENE 1.32 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gözlemlenen allel sayısı (n_a), etkili allel sayısı (n_e), Shannon'un indeks değerleri (I) ve Nei genetik çeşitlilik (h) parametreleri genetik çeşitlilik seviyesinin tahmin edilebilmesi için POPGENE 1.32 (Yeh ve Yang, 1999) ile hesaplanmıştır.

Çalışılan 9 takson için tür içerisindeki polimorfik lokus sayısı 96 ile 149 arasında değişirken, Polimorfik bant yüzdesi (PPB) değerleri %23.36 - 36.25 arasındadır.

Çizelge 3.5. *Petrorhagia* türlerinin 9 taksonu için polimorfik lokus sayı ve yüzdeleri

<i>P. alpina</i> <i>subsp.</i> <i>alpina</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	124 30.17
<i>P. alpina</i> <i>subsp.</i> <i>olympica</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	107 26.03
<i>P. cretica</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	120 29.20
<i>P. dubia</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	135 32.85
<i>P. lycica</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	123 29.93
<i>P. peroninii</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	149 36.25
<i>P. pamphylica</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	146 35.22
<i>P. prolifera</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	96 23.36
<i>P. saxifraga</i>	Polimorfik lokus sayısı Polimorfik bant yüzdesi	114 27.74

Allel sayısı 1.2603 ile 1.3625 arasında değişmektedir. Etkili allel sayısı (n_e), Nei genetik çeşitlilik (h) ve Shannon's indeks değerleri (I) *P. pamphylica*'da en yüksek (n_e : 1.1707, h : 0.1073; I : 0.1135), en düşük değerlerin *P. alpina subsp. olympica* etkili allel sayısı (n_e ; 1.1189) ve *P. prolifera*' da (h : 0.0736; I : 0,3673) olduğu görülmüştür. Her bir takson için, Nei genetik çeşitliliği (h) 0.0736 ile 0.1073 arasında bulunmuştur.

Çizelge 3.6. *Petrorhagia* türlerinin 9 taksonu için genetik parametre değerleri

Takson	PPB (%)	n_a (ss*)	n_e (ss*)	h (ss*)	I (ss*)
<i>P. alpina</i> subsp. <i>alpina</i>	30.17	1.3017 (0.4596)	1.1400 (0.2584)	0.0893 (0.1503)	0.1401 (0.2260)
<i>P. alpina</i> subsp. <i>olympica</i>	26.03	1.2603 (0.4394)	1.1189 (0.2446)	0.0758 (0.1417)	0.1193 (0.2134)
<i>P. cretica</i>	29.20	1.2920 (0.4552)	1.1338 (0.2583)	0.0849 (0.1479)	0.1335 (0.2219)
<i>P. dubia</i>	32.85	1.3285 (0.4702)	1.1408 (0.2527)	0.0915 (0.1469)	0.1456 (0.2224)
<i>P. lycica</i>	29.93	1.2993 (0.4585)	1.1462 (0.2735)	0.0911 (0.1551)	0.1417 (0.2308)
<i>P. peroninii</i>	36.25	1.3625 (0.4813)	1.1645 (0.2725)	0.1053 (0.1567)	0.1657 (0.2351)
<i>P. pamphylica</i>	35.52	1.3552 (0.4792)	1.1707 (0.2839)	0.1073 (0.1615)	0.1673 (0.2406)
<i>P. prolifera</i>	23.36	1.2336 (0.4236)	1.1199 (0.2600)	0.0736 (0.1465)	0.1135 (0.2173)
<i>P. saxifraga</i>	27.74	1.2774 (0.4482)	1.1322 (0.2625)	0.0828 (0.1490)	0.1293 (0.2224)

*ss: standart sapma

Dendogram oluşturulurken, genetik uzaklık değerleri hesaplanması sırasında *Petrorhagia* taksonlarında braktelerin kaliksi örtmesi ya da örtmemiş olması durumlarına göre 2 farklı grup oluşturulup analiz edilmiş ve 2 dendogram elde edilmiştir. Birinci grup -braktelerin kaliksi örtmüş durumuna göre- 5 tür (*P. dubia*, *P. peroninii*, *P. pamphylica*, *P. prolifera* ve *P. saxifraga*), ikinci grup ise -braktelerin kaliksi örtmemiş durumuna göre 4 türü içine almakla beraber *P. alpina* subsp. *alpina*, *P. alpina* subsp. *olympica*, *P. cretica* ve *P. lycica* türlerini içermektedir. Ayrıca 9 taksonu bir arada değerlendiren temel bir dendogram daha oluşturulmuş ve aralarındaki genetik mesafeler bulunmuştur.

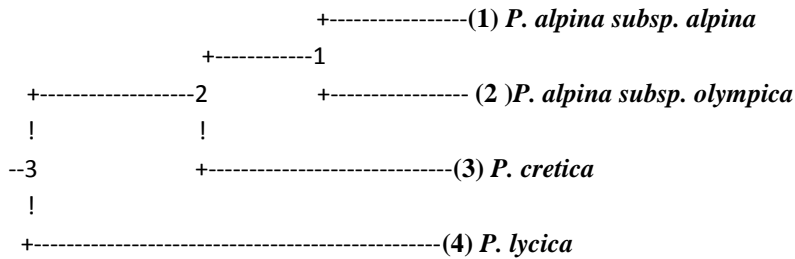
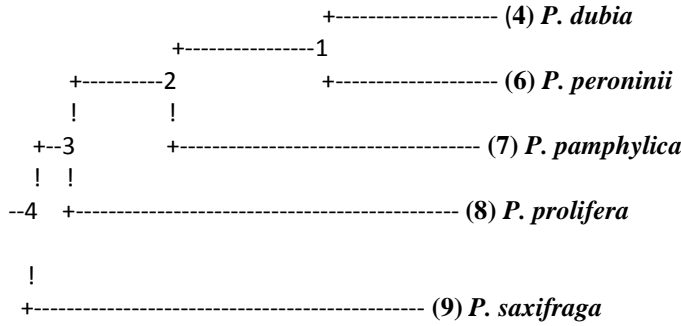
Çizelge 3.7. *Petrorhagia* taksonları birinci grup (braktelerin kaliksi örtmüş) için Nei (1978) genetik benzerlik (üst üçgen matris) ve genetik uzaklık (alt üçgen matris) ölçümleri

Takson	4	6	7	8	9
4	****	0.9638	0.9335	0.9309	0.9315
6	0.0369	****	0.9374	0.9198	0.9202
7	0.0688	0.0647	****	0.9026	0.8998
8	0.0716	0.0837	0.1025	****	0.9176
9	0.0710	0.0832	0.1056	0.0860	****

Çizelge 3.8. *Petrorhagia* taksonları ikinci grup (braktelerin kaliksi örtmemiş) için Nei (1978) genetik benzerlik (üst üçgen matris) ve genetik uzaklık (alt üçgen matris) ölçümleri

Takson	1	2	3	5
1	****	0.9723	0.9487	0.9091
2	0.0281	****	0.9424	0.9005
3	0.0527	0.0593	****	0.9099
5	0.0954	0.1048	0.0944	****

Şekil 3.11. UPGMA tekniği ile *Petrorhagia* taksonları genetik uzaklık dendrogramları

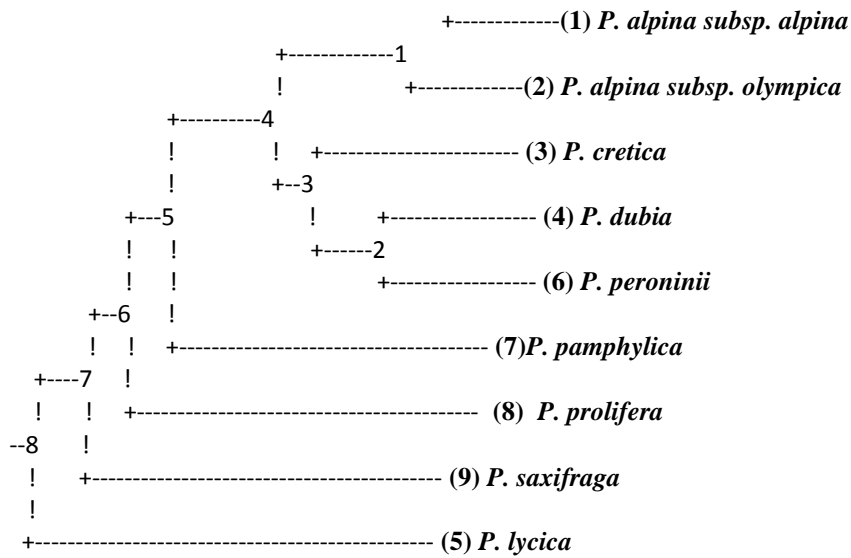


Nei (1978)'yi temel alan genetik benzerlik ile genetik uzaklık matrisi çizelge 3.9' da verilmiştir. Buna göre çalışılan taksonlar arasında genetik uzaklık değerleri 0.0382 ve 0.1198 arasında değişmektedir. Birbirine genetik olarak en yakın

taksonlar *P. alpina subsp. alpina* ve *P. alpina subsp. olympica* (genetik uzaklığı 0.0382)' dir. Tür olarak ele aldığımızda birbirine en yakın türler *P. dubia* ve *P. peroninii* (0.0491) en uzak türler ise *P. lycica* ve *P. saxifraga* (0.1198)'dir.

Çizelge 3.9. *Petrorhagia* taksonları için Nei (1978) genetik benzerlik (üst üçgen matris) ve genetik uzaklık (alt üçgen matris) ölçümleri

Takson	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	****	0.9626	0.9386	0.9380	0.8990	0.9380	0.9054	0.9061	0.9044
2	0.0382	****	0.9333	0.9324	0.8914	0.9337	0.9027	0.9087	0.9049
3	0.0634	0.0691	****	0.9392	0.9002	0.9410	0.9159	0.9157	0.9046
4	0.0640	0.0700	0.0628	****	0.9091	0.9521	0.9221	0.9216	0.9216
5	0.1064	0.1150	0.1052	0.0952	****	0.9016	0.8878	0.8924	0.8871
6	0.0640	0.0686	0.0608	0.0491	0.1035	****	0.9250	0.9097	0.9096
7	0.0993	0.1024	0.0879	0.0811	0.1190	0.0780	****	0.8926	0.8893
8	0.0987	0.0957	0.0880	0.0817	0.1139	0.0947	0.1136	****	0.9089
9	0.1005	0.1000	0.1002	0.0816	0.1198	0.0948	0.1174	0.0955	****



Şekil. 3.12. UPGMA tekniği ile *Petrorhagia* taksonlarının genetik uzaklık dendrogramı



ISSR verileri kullanılarak POPGENE 1.32 (Yeh ve Yang, 1999) paket programında Nei (1972) genetik uzaklıklarına göre yapılan UPGMA kümeleme analizinde 9 *Petrorhagia* taksonu için oluşturulan dendogramda iki ana grup karşımıza çıkmaktadır. İlk grup sadece *P. lycica* türünü içermektedir. 2. Grup ise 4 alt gruba ayrılmakta *P. saxifraga*, *P. prolifera* ve *P. pamphylica* her biri bir alt grubu oluşturmaktadır. En büyük alt kümeyi de *P. alpina subsp. alpina*, *P. alpina subsp. olympica*, *P. cretica*, *P. dubia* ve *P. peroninii* taksonlarını içermektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye'nin değişik yerlerinden toplanmış *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) cinsinde bulunan 9 taksonun her birinden 5 birey kullanılarak toplam 45 bireyle çalışılmış ve PCR tabanlı teknik olan ISSR belirteçleriyle genetik akrabalık seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu taksonlar *P. dubia* (Rafin.) G. López & Romo (Syn. *P. velutina*), *P. prolifera* (L.) Ball & Heywood, *P. pamphylica* (Boiss. & Ball) Ball & Heywood, *P. peroninii* (Boiss.) Ball & Heywood, *P. saxifraga* (L.) Link, *P. cretica* (L.) Ball & Heywood, *P. alpina* subsp. *alpina* (Habl.) Ball & Heywood, *P. alpina* subsp. *olympica* (Boiss.) Ball & Heywood, *P. lycica* (Davis) Ball & Heywood' tur. Yapılan literatür çalışmaları sırasında Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren *Petrorhagia* tasonları için yapılmış moleküler düzeyde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkemizde şu ana kadar *Petrorhagia* taksonlarıyla ilgili yapılmış en kapsamlı çalışma Aktaş (2006) tarafından yapılmış olan morfolojik, anatomik, palinolojik ve sitolojik verilerin ortaya konduğu "Türkiye'nin *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) Cinsi Türleri Üzerinde Taksonomik Bir Çalışma" adlı doktora tezi çalışmasıdır. *Petrorhagia* cinsi Dünyada Yunanistan'dan sonra en fazla türle ülkemizde temsil ediliyor olması ve endemizm oranının % 33 olup Ekim ve ark. (2000)'nin hazırladığı "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabına göre *P. hispidula*, *P. lycica* ve *P. pamphylica*: Zarar Görebilir (VU-Vulnerable), *P. peroninii*: Az Tehdit Altında (lower risk). *P. armerioides* ve *P. syriaca* Veri Yetersiz (Data deficient) kategorisinde bulunması bakımından çalışmamızı önemli kılmaktadır. Daha sonra yapılan revizyon çalışmalarında (Ataşlar, 2008) bizim çalıştığımız taksonlardan *P. pamphylica*, *P. lycica* ve *P. peroninii*' nin CR (Critically Endangered - Çok Tehlikede) kategorisine dahil edilmesi çalışmanın önemini daha da vurgulamaktadır.

Türkiye florasında *Petrorhagia* cinsinin 12 taksonla temsil edildiği bildirilmektedir. Bununla birlikte, gerek daha önce başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar (Aktaş, 2006; Ataşlar 2008) gerekse de bizim yaptığımız arazi çalışmaları sırasında *P. armerioides* ve *P. syriaca* türlerine ulaşılamamıştır. *P. hispidula* türüne de Isparta ve Antalya çevresinde vejetasyon döneminde gerçekleştirilen arazi çalışmalarına rağmen ulaşılamamıştır. Dolayısıyla bu



çalışmada ülkemizde 12 taksonla temsil edilen cinsin 9 taksonu kullanılmıştır. Her taksondan 5 birey kullanılarak bireysel varyasyonların sonuçlarımızı olumsuz etkileme olasılığı en aza indirilmesi hedeflenmiş ve elde edilecek istatistikî verilerin daha sağlıklı bir şekilde ortaya konması amaçlanmıştır.

Zietkiewicz ve ark (1994) tarafından geliştirilen ISSR yöntemi dominant bir belirteç tekniğidir ve bugüne kadar çok sayıda bitki türünde genetik çeşitlilik ve genetik akrabalık çalışmalarında sıklıkla kullanılmıştır (Zhiyuan ve ark., 2010; Verma ve ark., 2009; Gaiero ve ark., 2011; Martin ve ark., 2000; Haisheng ve Guizhu, 2008). Bu çalışmada başlangıçta 24 ISSR primeri test edilmiş ve optimizasyon sonrasında 10 tanesinin daha belirgin ve güvenilir bantlar oluşturduğu tespit edilmiştir. ISSR primer optimizasyonu çalışılacak her farklı bitki materyali için tekrar edilmesi gereken bir prosedürdür. Çünkü aynı primerlerle farklı türlerde çalışılmış olsa da o bitki türünde kullanılan PCR şartları bizim çalışmak istediğimiz türde cevap vermeyebilir. Dolayısıyla gerek ISSR gerekse RAPD primerleri ile genetik çeşitlilik gibi kapsamlı bir çalışmaya başlanmadan önce kullanılması planlanan primerler için kalıp DNA, magnezyum, primer ve dNTP konsantrasyonları ile primer bağlanma ısı parametreleri üzerinde optimizasyon yapılır. Hatta literatürde sadece ISSR PCR optimizasyonuna yönelik yayınlanmış makaleler dahi bulunmaktadır (Guo ve ark., 2009; Wang, 2010; Dje ve ark., 2010; Huang ve ark., 2011). Gülşen ve Mutlu, (2005) ISSR analizlerinde kullanılan primerlerde tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici nükleotidlerin farklı kombinasyonlarının kullanılmasının DNA dizilerinin sayılarının dolayısıyla da jel üzerinde yürütülecek bant veya belirteç sayısının arttırılmasına neden olduğunu vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda da kullanılan 10 ISSR primerinden 4'ü 2'li gruplar halinde aynı diziye sahip fakat farklı sabitleştirici nükleotidler taşımaktadır. Sabitleştirici nükleotidi "T" olan (AG)₈T 25 tane bant oluşturmuş, aynı primerin sabitleyicisi "C" olan tipi ise 29 tane bant meydana getirmiştir. Diğer grupta ise sabitleştirici nükleotidi "G" olan (AGC)₆G primeri 54 bant oluşturmuş, aynı primerin sabitleyicisi "C" olan tipi de 64 adet bant üretmiştir. Dolayısıyla aynı primer dizisinin farklı sabitleyici nükleotide sahip olmasıyla farklı büyüklüklerde daha fazla sayıda bant elde edilmiştir.

ISSR tekniği, yüksek oranda polimorfizm sağlaması nedeniyle avantajlı bir yöntemdir. Bu çalışmada kullandığımız 10 adet ISSR primerinden toplam 409 bant elde edilmiştir. ISSR primerleri türler arası polimorfizm oranı bakımından değerlendirildiğinde hepsinde polimorfizm oranını % 100 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, Hui-Zong ve ark. (2009) *Dendrobium* cinsine ait 31 türün genetik akrabalık seviyelerini ortaya koymak için 17 ISSR primeri kullanmışlardır. Toplam 2368 bant elde etmişlerdir ve primerlerin hepsi % 100 polimorfik sonuç vermiştir. Wang ve ark. (2009) ISSR tekniğiyle 50 adet *C. goeringii* kültürünün genetik çeşitlilik derecelerini incelemişlerdir. 25 ISSR primeri ile 224 ISSR bantı elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 93,75 olarak bulunmuştur. *C. goeringii* kültürleri genetik akrabalık ve çeşitliliklerinin tespitinde ISSR tekniğinin güçlü bir yöntem olduğunu orataya koymuşlardır. Wu ve ark. (2005) *Houttuynia* cinsine ait 53'ü doğal ortamlarda yetişen 68 aksesyon arasındaki genetik akrabalık seviyelerini ISSR ve RAPD teknikleri kullanarak incelemişlerdir. Bu cinste de polimorfizm oranı yüksek bulunmuştur. Kullanılan 22 ISSR primeri hepsi (% 100) polimorfik 354 bant, 34 RAPD primeri ise 199 bant vermiştir ve polimorfik bant yüzdesi RAPD primerleri için % 92,9'dur. Liu ve ark. (2010) Yunnan çay bitkisinin 8 türüne ait 134 aksesyonu, 18 ISSR primeri kullanarak genetik akrabalık ve genetik çeşitlilik durumlarını incelemişlerdir. 470'i polimorfik toplam 475 bant elde etmişlerdir.

Diğer taraftan çalışılan primerlerle her takson için oluşturulan lokus sayısı ve polimorfik bant yüzdeleri (PBB) farklıdır. *P. alpina* subsp. *alpina* için 124 (% 30.17), *P. alpina* subsp. *olympica* için 107 (% 26.03), *P. cretica* için 120 (% 29.20), *P. dubia* için 135 (% 32.85), *P. lycica* için 123 (% 29.93), *P. peroninii* için 149 (% 36.25), *P. pamphylica* için 146 (% 35.22), *P. prolifera* için 96 (% 23.36), *P. saxifraga* için 114 (% 27.74) olarak bulunmuştur. Bu durum bize *Petrorhagia* taksonlarının kendi içinde en yüksek genetik çeşitliliğinin *P. pamphylica* ve *P. peroninii*'de, en düşük genetik çeşitliliğin de *P. prolifera* ve *P. alpina* subsp. *olympica* taksonlarında bulunduğunu ortaya koymaktadır. Genetik çeşitlilik bir tür için düşük ise, bu tür gittikçe artan oranda risk altına girmektedir. Genetik çeşitlilik kaybı genellikle doğal popülasyonların hayatta kalmasını tehdit

etmektedir ve türlerin evrimsel potansiyelleri üzerinde çarpıcı etkilere sahiptir (Reed ve Frankham, 2003). Bir bitki türünde belirlenen yüksek genetik çeşitlilik seviyesi ise onun çevresel değişikliklere daha iyi adapte olmasını sağlar ve evrimsel kapasitesini belirler (Hamrick ve ark. 1991; Frankham, 1995; Hamrick ve Godt, 1996). Türlerin uzun süre hayatta kalması ve evrimi populasyon içi ve populasyonlar arası yeterli genetik çeşitliliğin belirlenmesine bağlıdır (Barrett ve Kohn, 1991). Bitki türlerinde belirlenen genetik çeşitlilik, türlerin karakteristik özellikleri ve uzun süreli evrimsel tarihleri gibi genetik sapma, gen akışı, çoğalma modeli ve çiftleşme sistemini de içine alan birçok süreçten etkilenmektedir (Hamrick ve Godt, 1989). Dış döllen popülasyonlar arasında genellikle yüksek genetik çeşitlilik ve düşük genetik farklılaşma gözlemlenmektedir (Hamrick ve Godt, 1996b). Genetik çeşitlilik, bir popülasyondaki heterozigotluk seviyesi, her bir lokustaki allel sayısı ya da polimorfik lokus yüzdesi ile tahmin edilebilir. Çalışmamızda ki veriler sadece 5 bireyden elde edilmiştir, daha fazla birey sayısı kullanılarak sadece tür bazında yapılacak çalışmalarla bu rakamlar daha da netleştirilebilir. Sudupak (2004) 6 ISSR primeri kullanılarak *Cicer* cinsine ait 2'si çok yıllık 8 tür arasındaki akrabalık derecelerini ortaya koymuştur. Bunlardan türlerden 6'sı için verilen polimorfik bant yüzdeleri şöyledir; *C. anatolicum* % 5.33, *C. pinnatifidum* % 43.3, *C. bijugum* % 8.67, *C. echinospermum* % 16.0, *C. reticulatum* % 25.3, *C. arietinum* % 2.0. Çok yıllık *C. incisum* türünü tek yıllık olup kendi içlerinde grup oluşturan *C. pinnatifidum*, *C. bijugum* ve *C. judaicum* türleriyle yakın bulmuştur. 2. Grupta da *C. reticulatum* türüne en yakın olarak *C. arietinum* bu ikisini de yakın olarak *C. echinospermum* türünü yakın olarak bildirmiştir.

ISSR tekniği tür ve varyete ayırımında da kullanılmaktadır. Aynı primerle bir türün bireylerinden elde edilen fakat diğer türde bulunmayan bantlar ayırt edici özelliğe sahiptir. Çalıştığımız primerleri her bir takson için ayrı ayrı değerlendirildiğimizde monomorfizm oranı yüksek olan primerler bulunmaktadır (Çizelge 3.4). Bunlar arasında taksonların birbirinden en iyi ayırımının GAG-(CAA)₅ ve BDB-(ACA)₅ primerleri ile gözlendiği net olarak ortadadır. Şekil 3.1 ve Şekil 3.9' a bakıldığında bu iki primerin oluşturduğu bant profillerinin her taksonun 5 bireyinin kendi içinde çok sayıda monomorfik bant oluşturduğu ve

taksonların bant profillerinin 5'li gruplar halinde ayrıldığı görülmektedir. GAG-(CAA)₅ primerinin oluşturduğu 536 bç ve 610 bç büyüklüğündeki bantlar sadece *P. cretica*'da, 591 bç büyüklüğündeki bant sadece *P. alpina* subsp. *olympica*'da, 622 bç büyüklüğündeki bant sadece *P. prolifera*'da, 690 bç büyüklüğündeki bant sadece *P. dubia*'da, 713 bç ve 829 bç büyüklüğündeki bantlar *P. alpina* subsp. *alpina* ve *P. alpina* subsp. *olympica*'da, 1450 bç büyüklüğündeki bant sadece *P. P. peroninii*'de, 1025 bç, 1250 bç ve 2077 bç büyüklüğündeki bantlar ise sadece *P. lycica*'da spesifik bantlar vermişlerdir. BDB-(ACA)₅ primeri de yine aynı şekilde türe spesifik bantlar vermiştir ve bu primerde GAG-(CAA)₅ primerine göre *P. alpina* subsp. *alpina* ve *P. alpina* subsp. *olympica* taksonlarının birbirinden daha iyi ayrıldığı görülmektedir (Şekil 3.9.). Benzer şekilde, Wang (2010), *Rhubarb* türlerinin birey varyasyonlarının kontrolü ve etkili bir şekilde doğrulanması için her bir tür için kullandığı 5 bireyde de var olan bantları seçmiştir. Kullandıkları UBC807 ve UBC811 primerleri her tür için spesifik bantlar vermiştir. Sadece *R. officinale* için UBC807 primeri 400 bç, UBC811 primeri ise 248 bç büyüklüğünde bantlar vermiştir. UBC807 primeri ayrıca *R. palmetum* ve *R. tanguticum* için 520 bç büyüklüğünde, UBC816 primeri ise *R. palmetum* ve *R. officinale* için 620 bç büyüklüğünde spesifik bantlar vermiştir. Böylece UBC807, UBC811 ve UBC816 primerlerinin kombinasyonlar oluşturarak *Rhubarb* türlerini ayırt etme amacıyla kullanıldığını belirtmiştir. Chaveerach ve ark. (2011) önemli süs bitkileri olan *Nymphaea* türlerinde doğal populasyonlar ve kültürler arasında ki farklılıkları belirlemek için ISSR primerleriyle çalışmışlardır. ISSR analizleri sonucunda oluşan dendogramda doğal türlerin *N. cyanea*, *N. nouchali* ve *N. capensis* ayrı bir grup oluşturmuş, dışta bir grup olarak da *N. mexicana* ve kültür türler olacak şekilde oluşmuştur. ISSR bantlarının oluşturduğu veri ve dendogram yabancı bir tür olan *N. capensis*' in farklı kültürler üretmede etkili olabileceğini göstermiştir. Böylece ISSR belirteçleriyle bitki tanımlama çalışmalarından sonra DNA işaretleyicilerinin türe spesifik belirteçler sağlayarak hızlı ve daha doğru bir şekilde bitki tanımlamada kullanılabilmesini açıklamışlardır. Pharmawati ve ark. (2005) ISSR belirteçlerinin *Leucadendron* varyetelerinin belirlenmesi ve moleküler sınıflandırılması için güçlü bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Arnau ve

ark., (2003) ISSR metodunun çilek varyetelerinin belirlenmesinde yararlı bir araç olduğunu da göstermişlerdir.

Çalışmamızda taksonları birbirinden ayırdeden primerlerden farklı olarak monomorfizm açısından oldukça düşük değerler veren diğer deyişle takson içinde yüksek polimorfizm gösteren (GT)₈YC, (AGC)₆G, (AGC)₆C primerleri ilerde yapılabilecek olan populasyon içi genetik çeşitlilik çalışmalarında oldukça güvenilir sonuçlar vereceklerdir. Bu primerler oluşturdukları bant sayısı bakımından da sırasıyla 43, 54 ve 64 bant ile en yüksek sayıya sahip olması öngörümüzü desteklemektedir.

Türler arasında ISSR verileri kullanılarak Nei (1972)' ye göre hesaplanan genetik uzaklık değerlerine göre *Petrorhagia* türleri arasındaki genetik uzaklık katsayısı 0.0382 ve 0.1198 arasında değişmektedir (Çizelge 3. 10). Buna göre birbirine genetik olarak en yakın taksonlar *P. alpina subsp. alpina* ve *P. alpina subsp. olympica* (0.0382), tür olarak ele aldığımızda da birbirine en yakın türler *P. peroninii* ve *P. dubia* (0.0491), en uzak türler ise *P. lycica* ve *P. saxifraga* (0.1198)'dir.

Çizelge 4.1. *Petrorhagia* taksonları kromozom sayıları ve önemli morfolojik özellikleri (Davis, 1967; Aktaş, 2005; Böcher ve ark., 1953; Löve 1978; Runemark, 1996; Çelebioğlu ve Favarger, 1993' den uyarlanmıştır)

Takson	Tek/Çok yıllık	Kromozom sayıları (2n)	Endemizm	Brakte kaliks durumu
<i>P. alpina subsp. alpina</i>	Tek	-	-	Örtmemiş
<i>P. alpina subsp. olympica</i>	Tek	30	-	Örtmemiş
<i>P. cretica</i>	Tek	26	-	Örtmemiş
<i>P. dubia</i>	Tek	30	-	Örtmüş
<i>P. peroninii</i>	Tek		Endemik (CR)	Örtmüş
<i>P. pamphylica</i>	Tek	30	Endemik (CR)	Örtmüş
<i>P. prolifera</i>	Tek	30 ve 60	-	Örtmüş
<i>P. saxifraga</i>	Çok	30 ve 60	-	Örtmüş
<i>P. lycica</i>	Çok	60	Endemik (CR)	Örtmemiş

Çizelge 4.1. (Devam). *Petrorhagia* taksonları kromozom sayıları ve önemli morfolojik özellikleri (Davis, 1967; Aktaş, 2005; Böcher ve ark., 1953; Löve 1978; Runemark, 1996; Çelebioğlu ve Favarger, 1993' den uyarlanmıştır)

Takson	Petal rengi	Kaburga damar sayısı	Yaprakların damar sayısı	Brakte genişliği	Tohum büyüklüğü
<i>P. alpina subsp. alpina</i>	Beyaz	1	1, dikdörtgens ters mızrak	-	0,7-1,1X 0,4-0,7 mm
<i>P. alpina subsp. olympica</i>	Beyaz	1	1, şeritsi ters mızrak	-	0,7-1,3X 0,4-0,7 mm
<i>P. cretica</i>	Beyaz	3	3, dikdörtgen ters mızrak	-	2-2,8X 1,3-1,9 mm
<i>P. dubia</i>	Pembe ya da morumsu koyudamarlı	-	Tabanda 5 Ortada 3 Uca doğru 1	En büyük brakte en az 3 mm	1-1,3X 0,7-0,9 mm
<i>P. peroninii</i>	Beyaz bariz mor damarlı	3	3	En büyük brakte 3 mm den az	1,1-1,2X 0,7-0,9 mm
<i>P. pamphylica</i>	Soluk (açık) pembe	5-7	3-5, şeritsi sivri uçlu	En büyük brakte 3 mm den az	1,3-1,6X 0,6-0,8 mm
<i>P. prolifera</i>	Pembe ya da morumsu	5	3, şeritsi Şeritsi-diktörtgen	En büyük brakte en az 3 mm	1-1,9X 0,8-1,1 mm
<i>P. saxifraga</i>	Beyaz ya da pembe	-	1, şeritsi ters mızrak	En büyük brakte 3 mm den az	0,9-1,6X 0,6-1,1 mm
<i>P. lycica</i>	Mor damarlı beyaz	3	-	-	1,5-2X 0,4-0,5 mm

ISSR verileri kullanılarak POPGENE 1.32 (Yeh ve Yang, 1999) paket programında Nei (1972)'ye göre yapılan UPGMA kümeleme analizinde 9 *Petrorhagia* taksonu için oluşturulan dendogramda iki ana grup karşımıza çıkmaktadır. İlk grup sadece *P. lycica* türünü içermektedir. 2. Grup ise 4 alt gruba ayrılmakta *P. saxifraga*, *P. prolifera* ve *P. pamphylica* her biri bir alt grubu oluşturmaktadır. En büyük alt küme de *P. alpina subsp. alpina*, *P. alpina subsp. olympica*, *P. cretica*, *P. dubia* ve *P. peroninii* taksonlarını içermektedir.

Dendograma bakıldığında (Şekil. 3.12.) çalışılan türler arasında en farklı gözükten *P. lycica*' dir. Bu aslında beklenmeyen bir durum değildir. Çünkü *P. lycica* kromozom sayısı ve bazı morfolojik karakterleri bakımından diğer türlerden açıkça farklılık göstermektedir (Çizelge 4.1.). Aktaş ve ark. (2010a) *Petrorhagia* taksonlarının ekolojik özelliklerini incelediği çalışmada *P. lycica*' nın

killi topraklarda yetiştiğini, *P. prolifera* ve *P. hispidula*'nın tınlı, diğer bütün taksonlarında killi-tınlı topraklarda yetiştiğini belirtmişlerdir. *P. lycica* bu özelliğiyle de diğer türlerden ayrılmaktadır. Ayrıca ilk kez Aktaş (2005) tarafından kromozom sayısının $2n=60$ olduğu bildirilmiştir. *P. lycica*'nın diğer *Petrorhagia* taksonlarından uzak ve lokal endemik olarak (Babadağ, Fethiye) bulunması ve çok yıllık bir bitki olması nedeniyle kendi içinde genetik çeşitlilik biriktirip poliploidi gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Dendograma göre *P. alpina* subsp. *alpina* ve *P. alpina* subsp. *olympica* birbirine en yakın taksonlar olarak bulunmuşlardır. Bu iki takson arasındaki genetik uzaklık değeri diğer taksonlara kıyasla çok düşüktür (0.0382). Aynı türün 2 alttürü olan bu taksonlar morfolojik olarak da oldukça benzer olup yaprak özellikleri ve çiçek durumlarının yoğun ya da gevşek olması durumlarına göre birbirlerinden ayrılmaktadır. Ayrıca Aktaş ve ark. (2010a)'nın yaptığı çalışmada yükseklik bakımından en geniş toleransa bu iki taksonun sahip olduğu, vejetasyon dönemleri, çiçek ve meyve oluşturma dönemlerinin aynı olduğu ve nemli gölge yerleri tercih ettikleri belirtilmiştir. Öte yandan Aktaş ve ark. (2010b) tarafından yapılan çalışmada polen çapı, ekzin kalınlığı ve por sayısının bu iki taksonda aynı olduğu vurgulanmıştır. Tüm bu özellikler değerlendirildiğinde bu iki taksonun bir alt grupta birlikte bulunmaları bu çalışmanın güvenilirliğini göstermektedir.

Dendogramda *P. cretica*, *P. alpina* subsp. *alpina* ve *P. alpina* subsp. *olympica*'ya en yakın pozisyondadır. Morfolojik özellikleri bakımından braktenin kaliksi örtmemiş olması, petal renginin beyaz olup petalin tam olması ve yaprak damarlarının benzer ve şeklinin dikdörtgensel ters mızrak olması durumlarıyla *P. cretica*, *P. alpina* taksonlarına en yakın taksondur. Kromozom sayısının $2n=26$ (Favarger, 1966; Çelebioğlu ve Favarger, 1993; Aktaş, 2005), tohumlarının açık şekilde büyük olması, kaliks kaburgasının 3 damarlı olması ile de *P. alpina* taksonlarından ayrılmaktadır. Bulduğumuz sonuç bunları destekler niteliktedir. Bu alt grupta kendi içlerinde bir grup oluşturan *P. dubia* ve *P. peroninii* türleri *P. cretica*'ya en yakın türler olarak gözükmektedir. Dendogramda bu örneklerle beraber tayin anahtarında birincil ayırım noktası olarak belirtilen 'braktelerin kaliksi örtmüş' olması durumuna geçilmiş olmaktadır. Bu durum dendogram

sonuçlarını güçlü bir şekilde desteklemektedir. *P. dubia* ve *P. peroninii* birbirine en yakın olan türler olarak bulunmuştur (0.0491). Brakte sayıları, brakte genişliği ve tohum büyüklükleri bakımından *P. alpina* subsp. *alpina* ve *P. alpina* subsp. *olympica*' dan sonra en yakın olan iki takson *P. dubia* ve *P. peroninii*' dir. Bu da moleküler analiz sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Dendogramda *P. pamphylica* taksonu diğer yukarıda belirtilen 5 taksondan ayrı dallanmıştır. Yukarıda belirtilen taksonlardan *P. dubia*' nın petal rengi pembe ya da morumsu koyu damarlı, diğer taksonlar ise beyaz petal rengine sahiptir. *P. pamphylica* bu taksonlardan soluk pembe petal rengi, kaliks kaburgasının 5-7 damarlı olması ve yapraklarının 3-5 damarlı şeritsi sivri uçlu olmasıyla ayrılmaktadır. Nei (1978) genetik uzaklık değerlerine bakıldığında *P. saxifraga*' ya en yakın takson olarak *P. peroninii* (0.1198) gözükmektedir. Türkiye florasında (Davis, 1967) bu iki tür birine benzer ve akdeniz elementleri oldukları vurgulanmıştır. Ayrıca *P. pamphylica* ve *P. peroninii*' nin brakte genişlikleri ve yaprak damar sayılarıyla benzerlikleri belirtilmiştir. Öte yandan Aktaş ve ark. (2010a)' nin yaptığı çalışmada *P. pamphylica* ve *P. peroninii* diğer taksonlara kıyasla düşük yüksekliklerde (0-100 m) yetiştikleri belirtilmiştir. Tayin anahtarında ise kaliks kaburgaları damar sayısı ve tohum büyüklükleri ile birbirinden ayrıldıkları görülmektedir (Davis, 1967; Aktaş, 2005).

Dendogramda yine tek başına *P. prolifera* türü diğer taksonlardan ayrılmış gözükmektedir. Nei (1978) genetik uzaklık değerlerine baktığımızda *P. prolifera*' ya en yakın tür *P. dubia* olarak gözükmektedir. Türkiye florasında (Davis, 1967) *P. prolifera*' dan gövdesinde ortadaki internodların tüylü olmasıyla, yaprak kımının boyunun genişliğinden 2 veya daha fazla kat olmasıyla, üst yaprakların yumuşak kenarlarıyla, tohumların 1 – 1.3 x 0.7 – 0.8 ebatlarında olmasıyla ayrıldığı belirtilmiş geri kalan özelliklerin de tamamen aynı olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca Aktaş (2005) bu iki tür için yapılan ölçümlerde bitki uzunluğu, yaprak eni, brakte boyu ve kapsül uzunluğunun ve ortalama petal enlerinin aynı olduğunu vurgulamaktadır. Aktaş ve ark. (2010a) bu taksonun diğer taksonlardan farklı olarak tınlı toprakları tercih ettiğini belirtmişlerdir. Bu veriler bizim sonucumuzla uyumluluk göstermektedir.

Dendogramda *P. saxifraga* da ayrı bir şekilde dallanmıştır. Nei (1978) genetik uzaklık değerlerine göre *P. saxifraga*' ya en yakın tür olarak *P. dubia* (0.0816) en uzak ise *P. lycica* (0.1198)'dır. *P. dubia* ile yakınlığı tayin anahtarından da anlaşıldığı gibi braktelerin kaliksi örtmesi durumundan aynı grupta bulunmalarıyla açıklanabilir. *P. lycica*' ya olan genetik uzaklığı da hem brakte-kaliks durumuna göre bakıldığında farklı grupta bulunmaları hem de *P. lycica*' nın doğu akdeniz elementi (Lokalite: Fethiye, Muğla), *P. saxifraga*' nın ise Avrupa-sibirya elementi (Lokalite: Ladik, Samsun) olması durumlarıyla farklılıkları açık ve çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir. Dendogramda iki türünde diğer türlerden bağımsız konumlanması çok yıllık olmaları ve bunun sonucunda her iki türün, tür içi genetik çeşitlilik birikimlerinin fazla olduğu ve poliploidi oluşturmuş olabilecekleri düşünülmektedir.

Bu çalışma Türkiye'de yayılış gösteren *Petrorhagia* taksonlarına yönelik yapılan ilk moleküler çalışmadır. *Petrorhagia* taksonlarının genetik akrabalık seviyelerinin ortaya konduğu bu çalışmada 10 adet ISSR primeri kullanılmıştır. Tamamı polimorfik olan 409 adet bant elde edilmiştir. Elde edilen moleküler sonuçlar daha önceden taksonlar üzerinde yapılan morfolojik, karyotip ve ekolojik çalışmalarla karşılaştırılabilir niteliktedir. Sonuç olarak ISSR tekniği *Petrorhagia* türleri arasındaki genetik akrabalığı çalışmada uygun bir belirteç yöntemidir. Özellikle endemik ve çok tehlikede olan *Petrorhagia* taksonları için ileride yapılabilecek olan çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aka-Kaçar, Y. (2001), Türkiye’de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kod No: 640, Adana.
- Aktaş, K. (2006), “Türkiye’nin *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) Cinsi Türleri Üzerinde Taksonomik Bir Çalışma”, Doktora tezi, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Manisa, 1-232.
- Aktaş K., Özdemir C., Altan Y., Baran P., Özkan, M. (2010a), Türkiye’de Yayılış Gösteren *Petrorhagia* (Ser.) Link (*Caryophyllaceae*) Taksonlarının Bazı Ekolojik Özellikleri, *Tubav Bilim Dergisi*, Cilt: 3, Sayı: 1, Sayfa: 79-93.
- Aktaş K., Özdemir C., Altan Y., Baran P., Teresa, G. (2010b), Comparative Pollen Morphology of Turkish Species of *Petrorhagia* (*Caryophyllaceae*) and Its Systematic Implications, *Institute of Botany, Slovak Academy of Science*, **65/3**: 444-450.
- Anonim, (2005), Protocols For The Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Approach. <http://oak.cats.ohiou.edu/~ballardh/molsyst/issrs.doc>
- Anonim, (2011), National Biological Information Infrastructure, Introduction to Genetic Diversity. U.S. Geological Survey., Retrieved 3/6/2011, <http://www.nbi.gov/portal/server.pt?open=512&objID=405&PageID=0&cached=true&mode=2&userID=2>
- Arnau, G., J. Lallemand and M. Bourgoïn, (2003), Fast and reliable strawberry variety identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica*, **129**: 69–79.
- Ataşlar, E. (2008), Türkiye *Petrorhagia* (Ser.) Link., *Velezia* L., ve *Saponaria* L. Cinsleri Üzerinde Taksonomik, Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar. Araştırma Projesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Proje No: 200319054, Eskişehir.



- Atalmış, F., (2007), Ege Bölgesi'nde Yetişen Kavun Çeşitlerinin Morfolojik VE ISSR DNA Markörleri Kullanılarak Tanımlanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Kod No: 640, Adana.
- Ball P.W., Heywood V.H. (1964), A revision of the genus *Petrorhagi*, *Bull. Bri. Mus.(Nat. Hist.) Botany* No **3**, 121-172.
- Bali, P.W., Heywood, V.H. (1964), A revision of the genus *Petrorhagia*. *Bull. Bri. Mus. (Nat. Hist.) Botany*, **3**:121-172, London.
- Bateman, G. (1978), *Flowering Plants of the World*, Oxford University press, London.
- Bostein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. (1980), Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **32**: 314–331.
- Böcher, T. W., Larsen, K., Rahn, K. (1953), Experimental and cytological studies on plant species. i. *Kohlrauschia prolifera* and *Plantago coronopus*. *Hereditas*, 39:289-304.
- Boissier, E. (1867), *Flora Orientalis*, Vol. **1**, p: 516-523, Geiag. Ser. 1, Nr:8, p:60-64. Paris.
- Bötter, S., Melzig, M. F. (2010), Triterpanoid Saponins of the Caryophyllaceae and Ilcebracea Family, *Photochemistry Letters*, 160, 1-10.
- Büyükünal Bal, E.B. (2003), Arpa Mikrosatellitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6 (2): 34-40.
- Chaveerach, A., Tanee, T., Sudmoon, R. (2011), Molecular identification and barcodes for the genus *Nymphaea*, *Acta Biol Hung.*,62(3):328-40.
- Çağlar, E. (2010), Mikrosatellit Temelli Markörlerle *Centaurea nivea*'daki Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi, Eskişehir. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Çelebioglu, T. & Favarger, C. (1993), In Kamari, G. & al.(eds.) *Mediterranean chromosome number reports-3*. *Flora Mediterranea*, **3**:323-373.

- Corazza-Nunes M. J., Machado, M. A., Nunes W. M. C., Cristofani, M., Targon M., (2002), Asswssment of genetic variability in grapefruits (*C. paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima*) (Burm.) Merr.) using RAPD and SSRs markers, *Euphytica*, **126**:169-76
- Damboldt, J., Phitos, D. (1972), Beitrage zur Flora Ionica IV. Studien in der Gattung *Petrorhagia* (*Caryophyllaceae*). *Candollea*, **27/1**:27-40.
- Davis, P., H. (1967), “*Flora of Turkey and East Aegean Islands*” Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, Cilt **2**, 131-135.
- Davis, P., H., Milli, R.R., ve Tan, K. (1988), “*Flora of Turkey and East Aegean Islands*” Edinburgh Univ. Press, Cilt 10 (Supplement), Edinburgh.
- Dayanandhan, S., Bawa, K.S., and Kesseli, R. (1997), Conservation of microsatellite among tropical trees (leguminosae), *Am. J. Bot.* **84**: 1658–1663.
- Doyle, J. J. and Doyle, J.L. (1987), Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, **12**, 13-15.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N. (2000), Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Egrelti ve Tohumlu Bitkiler), Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
- Ellstrand, N.C., Elam, D. R., (1993), Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **24**:217-242
- Eröz Poyraz, İ. (2008), Türkiye Velezia L. (*Caryophyllaceae*) Cinsi Revizyonu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir.
- Favarger, C. (1966), Contribution a la cytotaxinomie du genre *Petrorhagia* (*Tunica*). *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **76**:270-278, 1966.
- Fior, S., Karis, P.O., Casazza, G., Minuto, L., Sala, F. (2006), Molecular phylogeny of The *Caryophyllaceae* (*Caryophyllales*) inferred from chloroplast matK and nuclear rDNA its sequences, *American Journal of Botany* Cilt 93, No **3**, 399-411
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2004), *A Primer of Conservation Genetics*, University Press, Cambridge.

- Gabierslsen, T.M., Brochmann, C. (1998), Sex after all: High levels of diversity detected in theatric clonally plant saxifrage *cernua* using RAPD markers. *Mol. Ecol.*, **10**: 1701–1708.
- Gaiero, P., Mazzella, C., Agostini, G. Bertolazzi, S., Rossato, M. (2011), Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia Becc.* species based on ISSR *Plant Syst Evol*, **292**:105–116.
- Greuter, W. & P. Mouterde. (1970), *Petrorhagia syriaca (Caryophyllaceae):* une rehabilitation. *Candollea*, **25/2**:221-227, 1970.
- Gunderson, A. (1950), Families of Dicotyledons, 176, Published by Chnorica Botanica Company, U.S.A.
- Gupta, M., Chyi Y.S., Romero- Severson, J., Owen, J.L., (1994), Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor . Appl. Genet .*, **89**: 998 – 1006.
- Gülşen, O., Mutlu, N., (2005), Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları, *Alatarım*, 4 (2): 27-37.
- Güner, A. Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C. (2000), Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburgh University Pres, Edinburgh, 11 (Supplement): 44-53.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. (1996), "Conservation Genetics of Endemic Plant Species", In: Avise J.C. ve Hamrick J.L., (ed) Conservation Genetics: case histories from nature, 281-304, NY: Champan and Hall, New York.
- Haisheng, L., Guizhu, C., (2008), Genetic relationship among species in the genus *Sonneratia* in China as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**: 392-398.
- Hui Zhong. W., Shang, G. F., Jiang, J. L., Nong, N. S., Jun, J. L. (2009), Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *Scientia Horticulturae* 122, 440–447.
- Huber-Morath, A. (1967), *Gypsophila* L., *Ankyropetalum* Fenzl in Davis, P.H. (ed.). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, **2**: 147-171. Edinburgh University Press.

- Judd, W.S., Campbell, Ch.S., Kellog, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. (2002), Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Kanazawa, A., Watanabe, S., Nakamoto, T., Tsutsumi, N., Hirai, A. (1998), Phylogenetic relationships in the genus *Nelumbo* based on polymorphism and quantitative variations in mitochondrial DNA, *Genes Genet. Syst.*, **43**, 39–44.
- Khang, S., Spoor W., (2001), Use of molecular and morfolojik markers as a quality control in plant tissue culture, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **4(4)**:479-482.
- Kim, H., Song, M.J., Kim, K.J., Lee, C.W., Chang, W.G., Kang, K.H., (1998), Genetic variation analysis of Korean lotus (*Nelumbo nucifera*) using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, *Korean J. Plant Tax.*, **28**: 343–355.
- Knox, E.B., and Palmer, J.D. (1999), The chloroplast genome arrangement of *Lobelia thuliniana* (Lobiliaceae): Expression of inverted repeat in an ancestor of the companulales. *Plant Syst. Evol.*, **214**: 49–64.
- Korkmaz, M., (2007), Türkiye’de Yetisen Tek Yıllık *Gypsophila* L. (*Caryophyllaceae*) Taksonları Üzerinde Biyosistemik Çalışmalar, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Kresovich, S., Szewc-Mcfadden, A.K., Blick, S., Mcferson, J.R., (1995), Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.*, **91**: 206–211.
- Lavi, U., Cregan, P., Scchap, T. and Millel, J., (1994), Amplification and breeding of perennial fruit crops. In: Janick, J. (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley Sons, Inc: NY, 397-401.
- Lee, J. W., Kim Y., Jo, L. H. (2011), Development of an ISSR Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars, *Journal of Ginseng Research*, **35**: 52-59

- Liu, B. Y., Li. Y., Tang, Y. C., Wang, L. Y., Cheng H., Wang, P. S. (2010), Assessment of Genetic Diversity and Relationship of Tea Germplasm in Yunnan as Revealed by ISSR Markers, *Acta Agron Sin*, **36(3)**: 391–400.
- Löve, A., (1978), iopb chromosome number reports LXII., *Taxon*, 27(5/6):524.
- Martín, J. P., Sánchez-Yélamo, M. D., (2000), Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers, *Theor Appl Genet*, 101:1234–1241.
- Mouterde, P. ve Premier, T., (1966), *Nouvelle Flore Du Liban Et De La Syrie*, Beyrut, 516-517.
- Nei, M. (1978), Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics*, **89**, 583-590.
- Özcan, B. (2008), Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda Genetik Haritalama İçin Polimorfik Yöntem ve Primerlerin Belirlenmesi, Adana. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Peng, Y.L., Han, Y.C., Wang, L., Teng, C.Z., Zhou, M.Q., Hu, Z.L., Song, Y.C. (2004), Genetic diversity in lotus (*Nelumbo*) accessions revealed by AFLP technique. *Mol. Plant Breeding*, **2**: 823–827.
- Paterson, A.H., (1996), Mapping genes responsible for differences in phenotype, In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas., 41–54.
- Poyraz, İ. (2007), *Origanum onites* L.'de Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz (MAPKK) Enzim Ailesi Üyelerinden Birinin Klonlanması ve Enzimatik Olarak Tanımlanması, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir.
- Punt, W., Hoen, P.P. (1995), The Northwest European Pollen Flora 56: *Caryophyllaceae*. Review of Palaeobotany and Palynology, **88**:83-272, 1995.

- Runemark, H. (1996), In Kamari, G. & al. (eds.) Mediterranean chromosome number reports-6. *Flora Mediterranea*, **6**:223-243.
- Pharmawati, M., Yan, G., Finnegan, P.M. (2005), Molecular variation and fingerprinting of *Leucadendron* varieties (Proteaceae) by ISSR markers., *Ann. Bot.*, **95**: 1163–70.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H. (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**:487-91
- Sambrook. J, Fritsch. E.F., Maniatis. T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarioğlu, A. (2006), Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbarium’undaki (Ank) *Caryophyllaceae* Familyasının Revizyonu, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. (2004), Tohumlu Bitkiler Sistematigi, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Schweingruber, F. H. (2007), Stem anatomy of Caryophyllaceae, *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, Vol: **202**, 281-292.
- Sudupak, M. A., (2004), Inter and intra-species Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations in the genus *Cicer*, *Euphytica*, **135**: 229–238.
- Staub, J.E., Sequen, F.C., (1996), Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *Hort. Scien.*, **31(5)**: 729-7
- Strid, A., Tan, K. (1997), *Flora Hellenica*, Koeltz Scientific Books, Germany, **1**: 333-342.
- Simmons, M.P., Zhang, L.B., Webb, C.T., Müller, K. (2007), A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **42**, 528–542.
- Tamam, A. (2008), Bazı Avokado (*Persea americana Mill.*) Çeşitlerinin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.

- Tanksley, S.D., (1983), Molecular markers in plant breeding, *Plant Mol Biol, Rep*, 1: 3.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., Bonierbale, M.W. (1989), RFLP mapping in plant breeding: New tools for old science, *Biotechnology*, 7: 257.
- Tautz, D., (1989). Hypervariability of Simple Sequences as General Source for Polymorphic DNA Markers, *Nucleic acid research*, 17: 463-6471.
- Tian, H. İ, Xue, J. H., Wen J., Mitchell, G., Zhou, S: L., (2008), Genetic diversity and relationships of lotus (*Nelumbo*) cultivars based on allozyme and ISSR markers, *Scientia Horticulturae*, 116:421–429.
- Tsumura, Y.K., Ohba, K., and Strauss, S.H. (1996), Diversity and inheritance of inter-simple repeat polymorphism in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugi (*Crypromeria japonica*), *Theor. Appl. Genet.*, 92: 40–45.
- Täckholm, V. (1974), *Flora of Egypt*, s: 76-84, Cairo University, Beirut.
- Verma, P. C., Chakrabarty, D., Jena, S. T., Mishra, D. K., Singh, P. K., Sawant, S. V., Tuli, R. (2009), The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR, *industrial crops and products*, 29: 581–589.
- Vos, P., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995), AFLP: A new technique for DNA fingerprinting., *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407–4414.
- Walton, M. (1993), Molecular markers: which ones to use?, *Seed World*, July,23-29.
- Wang, X. M. (2010), Optimization of DNA isolation, ISSR-PCR system and primers screening of genuine species of rhubarb, an important herbal medicine in China *Journal of Medicinal Plants Research* Vol., 4(10), pp. 904-908.

- Wang, H.Z., Wu, Z.X., Lu, J.J., Shi, N.N., Zhao, Y., Zhang Z.T., Liu J.J. (2009), Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *Genetica*, **136**:391–399.
- Waugh, R., Powell, W. (1992), Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotech.*, **10**:186-191.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W. (1995), DNA fingerprinting in Plants.
- Williams, F.N. (1989), Revision of The Forms of The Genus *Gypsophila* L., *Journ Bot. Lond*, **27**: 321- 329.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990), DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res*, **18**: 6531–6535.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q.Y., and Kephart, S.R. (1998), Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat markers. *Mol. Ecol*. **7**:1107–1125.
- Wu, W., Zheng, Y.L., Chen, L., Wei, Y.M., Yang, R.W., Yan, Z.H. (2005), Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers, *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**:1141-1157.
- Xue, J.H., Zhuo, L.H., Zhou, S.L. (2006), Genetic diversity and its geographic pattern of wild lotus (*Nelumbo nucifera*) in Heilongjiang Province, *Chin. Sci. Bull*, **51**, 1–12.
- Yalçinkaya, Z. Ç. (2006), Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryum’undaki (Ank) *Caryophyllaceae* Familyasının Revizyonu, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Yalım, D. (2005), Türkiye’de Yetişen Arpa Çeşitlerinde Genetik Çeşitliliğin ISSR (Basit Dizilim Tekrarları) Moleküler Markör Tekniği ile Saptanması, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.

- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T. (1999), Popgene version 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Mol. Biol. Biotechnol. Ctr. Univ., Alberta, Edmonton, Alta, Canada.
- Yıldız, K Çırpıcı, A. (2000), Kuzey Anadolu *Caryophyllaceae* L. Taksonlari ile ilgili korolijik bir çalışma, M.Ü Fen Bilimleri Dergisi, Sayı:16, İstanbul.
- Yıldız, K. (2001), Pollen Morphology of *Caryophyllaceae* species from Turkey. Pak. J. Bot., **33(4)**:329-355, 2001.
- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. (2001), Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23. In: Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 112–159. ISBN 975-6652-05-5. Konya.
- Yu, K., Park, S.J., Poysa, V., (2000), Marker-assisted Selection of Common Beans for Resistance to Common Bacterial Blight: Efficacy and Economics, *Plant Breeding*, **119**: 411-415.
- Zhiyuan, L., Hongying ,D., Longdou, L.,Xiao, S. (2010), Genetic relationships of *Osmanthus* based on ISSR-PCR, **65/3**: 459—464.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176–183.