



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**SELEKSİYON VE MELEZLEME ISLAHI İLE ELDE  
EDİLEN YENİ SÜSEN (*IRIS L.*) VARYETE ADAYLARININ  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Berk BAŞTUĞ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Botanik Programı**

**Danışman**

**Doç. Dr. Tamer ÖZCAN**

**2.Danışman**

**Dr. Özge KARAKAŞ METİN**

**Mayıs, 2013**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**SELEKSİYON VE MELEZLEME ISLAHI İLE ELDE  
EDİLEN YENİ SÜSEN (*IRIS L.*) VARYETE ADAYLARININ  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Berk BAŞTUĞ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Botanik Programı**

**Danışman**

**Doç. Dr. Tamer ÖZCAN**

**2. Danışman**

**Dr. Özge KARAKAŞ METİN**

**Mayıs, 2013**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 20/06/ 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından . Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Doç. Dr. Tamer Özcan  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Gül Cevahir Öz  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Orhan Küçüker  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Celal Yarcı  
Marmara Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Gülriz Bayçu Kahyaoğlu  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Bu tez alışması, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvarı'nda yürütülmekte olan TÜBİTAK KAMAG tarafından desteklenen TARAL 1007 – 110G007 numaralı proje ve İstanbul Üniversitesi BAP birimi tarafından 26617 no' lu tez projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni destekleyen ve yönlendiren birinci tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Tamer ÖZCAN'a ve çalışmanın TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmesini sağlayan, bilgi ve tecrübeleri ile her aşamada yanımda olan, değerli yardım ve katkılarıyla bana yol gösteren ikinci tez danışmanım değerli hocam Dr. Özge KARAKAŞ METİN'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmemde benden bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı çalışanlarından Dr. Semra HASANÇEBİ'ye, Dr. Fahriye ERTUĞRUL'a, Dr. Tijen OĞRAŞ'a, Dr. Mine TÜRKTAKAŞ'a ve çalışmamı kolaylaştıran teknisyenler Rahmi BÜYÜKKESKİN'e, Konca BULUT'a teşekkür ederim.

Çalışmalarında kullandığım süsen bitkilerini bana temin eden Yalova Atatürk Bahçe Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden Erdal KAYA'ya ve Kamil ERKEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında uzun deney saatleri boyunca yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Hayriye GENİŞEL, Deniz KÖM, Tülin TAŞÇIOĞLU, Ayşegül ÇELENK, Yahya Emin DEMİRCİ, Emel AKGÜN hepimize çok teşekkür ederim.

Her alanda tercihlerime güvenip, bana sonsuz destek veren aileme minnettarlığımı sunarım.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvarı'nda yürütülmekte olan TÜBİTAK KAMAG tarafından TARAL 1007 – 110G007 numaralı proje ve İstanbul Üniversitesi BAP birimi tarafından 26617 no' lu tez projesi ile desteklenmiştir. Destekleri için TÜBİTAK'a ve İstanbul Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

**Mayıs, 2013**

**Berk BAŞTUĞ**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	v
TABLO LİSTESİ .....	vii
SEMBOL LİSTESİ .....	viii
KISALTMALAR .....	ix
ÖZET .....	xi
SUMMARY .....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>3</b>
2.1 SÜS BİTKİSİ SEKTÖRÜNDE GEOFİTLERİN YERİ VE ÖNEMİ .....	4
2.2 IRIDACEAE FAMILYASININ GENEL ÖZELLİKLERİ .....	6
2.3 <i>IRIS</i> L. CİNSİNİN SİSTEMATİKTEKİ YERİ .....	7
2.4 <i>IRIS</i> L. CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ .....	8
2.5 MARKÖRLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ .....	10
2.5.1 Morfolojik Markörler .....	10
2.5.2 Biyokimyasal Markörler .....	10
2.5.3 Moleküler Markörler .....	10
2.5.3.1 Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markörler .....	11
2.5.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 'na Dayalı Moleküler Markörler .....	11
2.6 AFLP (ÇOĞALTILMIŞ PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ) MARKÖR TEKNİĞİ .....	14
2.7 KLOROPLAST GENOMU, <i>TRML</i> İNTRON VE <i>TRML-F</i> BÖLGESİ .....	16
2.8 AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİ .....	20

2.8.1 Agaroz Jel Elektroforezi.....	20
2.8.2 Kapiler Jel Elektroforezi ve Floresan Temelli Görüntüleme .....	20
2.9 DNA DİZİ ANALİZİ .....	22
2.9.1 Floresan Temelli Otomatik Dizi Analiz Sistemleri .....	23
2.10 FİLOGENETİK AĞAÇ VE AĞAÇ OLUŞTURULMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER .....	25
2.10.1 MP (Maximum Parsimony) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi .....	26
2.10.2 ML (Maximum Likelihood) En Yüksek İhtimal Yöntemi .....	26
2.10.3 Uzaklık (Distance) Yöntemi.....	27
2.10.3.1 Komşu (Neighbour Joining) Birleştirme Yöntemi .....	27
2.10.3.1 UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Yöntemi.....	27
2.10.4 Bootstrap (Seç-Bağla) Analizi .....	28
2.11 FİLOGENETİK AĞAÇ OLUŞTURMADA KULLANILAN PROGRAMLAR .....	28
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>30</b>
3.1 BİTKİ MATERYALİ.....	28
3.2 DNA İZOLASYONU .....	36
3.3 AFLP ANALİZLERİ .....	39
3.4 KLOOROPLAST DNA'SININ TRML-F BÖLGESİ ANALİZLERİ.....	45
3.5 VERİ ANALİZİ .....	49
3.5.1 Verilerin Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'ne Yüklenmesi .....	49
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>51</b>
4.1 DNA İZOLASYONU .....	52
4.2 AFLP ANALİZİ SONUCU ELDE EDİLEN VERİLER.....	52
4.2.1 AFLP Analizi Kapsamında Gerçekleştirilen Önçoğaltım PZR'ı .....	52
4.2.2 AFLP Analizi Kapsamında Gerçekleştirilen Seçici Çoğaltım PZR'ı.....	54
4.3 KLOOROPLAST DNA'SINA AİT TRML-F BÖLGESİ AMPLİFİKASYONLARI.....	56
4.3.1 c-d ve e-f primerleri kullanılarak Gerçekleştirilen PZR Analizleri.....	56
4.3.2 Floresan Boyalarla İşaretli ddNTP'ler Kullanılarak Gerçekleştirilen PZR Analizleri.....	57

4.4 BİYOİNFORMATİK PROGRAMLAR KULLANILARAK VERİLERİN ANALİZ EDİLMESİ .....	59
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>72</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>84</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>91</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>107</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1- Dünya’da süs bitkileri üretim değerleri içinde ürün gruplarının payları .....	4
Şekil 2.2- Türkiye’deki süs bitkileri ürün gruplarının payları .....	5
Şekil 2.3- <i>Iris</i> L. cinsinin alt taksonları .....	9
Şekil 2.4- Polimeraz Zincir Reaksiyonun şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.5- AFLP’nin şematik gösterimi .....	16
Şekil 2.6- Kloroplast genomu .....	18
Şekil 2.7- <i>trnT-trnF</i> bölgesine özgü primerler ile çoğaltılabilen DNA fragmentinin (a-b, a-d, c-d, c-f, e-f) şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.8- Agaroz Jel Elektroforezi.....	20
Şekil 2.9- AFLP analizlerinde floresan görüntülemenin şematize edilmesi.....	21
Şekil 2.10- GeXP Genetik Analiz Sistemi.....	24
Şekil 2.11- DNA dizilemesi sonucu oluşan piklerin görüntüsü.....	24
Şekil 3.1- Bitki örneklerinin alındığı Yalova Atatürk Bahçe Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Seraları .....	30
Şekil 3.2- ICA 1 - <i>Iris reticulata</i> .....	31
Şekil 3.3- ICA 2 - <i>Iris histrio</i> .....	31
Şekil 3.4- ICA 3 - <i>Iris iberica subsp. elegantissima</i> .....	31
Şekil 3.5- ICA 4 - <i>Iris kirkwoodii</i> .....	31
Şekil 3.6- ICA 5 - <i>Iris sari</i> .....	31
Şekil 3.7- ICA 6 - <i>Iris Xanthospuria</i> .....	31
Şekil 3.8- ICA 7 - <i>Iris lazica</i> .....	32
Şekil 3.9- ICA 8 - <i>Iris barnumae f. barnumae</i> .....	32
Şekil 3.10- ICA 9 - <i>Iris barnumae f. urumiensis</i> .....	32
Şekil 3.11- ICA 16 - <i>Iris sintenisii</i> .....	32
Şekil 3.12- ICA 17 - <i>Iris stenophylla</i> .....	32
Şekil 3.13- ICA 18 - <i>Iris suaveolens</i> .....	32
Şekil 3.14- ICA 23 - <i>Iris purpureobracteata</i> (Kolşisin Mutantı).....	33
Şekil 3.15- ICA 25 - <i>Iris sari</i> (Doğal melez).....	33
Şekil 3.16- Bitki örneklerinin “Retsh MM 301” model homojenizatör cihazı ile parçalanması .....	36
Şekil 3.17- DNA izolasyonun çeşitli aşamalarında örneklerin durumu.....	37
Şekil 3.18- NanoDrop (ND1000) ile DNA’nın konsantrasyonunun belirlenmesi.....	38
Şekil 3.19- İzolasyonu yapılan DNA’nın agaroz jele yüklenmesi ve kullanılan görüntüleme cihazı (DNr Bio-Imaging System MiniBIS Pro).....	38
Şekil 3.20- AFLP ön çoğaltım aşaması için kullanılan PZR programı.....	42
Şekil 3.21- AFLP seçici çoğaltım aşaması için kullanılan PZR programı .....	44
Şekil 3.22- GeXP Analiz Sistemi (Beckman Coulter GenomeLab) ve 96 kuyuluk örnek plağı .....	45
Şekil 3.23- <i>trnL-F</i> bölgesi analizlerinde gerçekleştirilen ilk PZR uygulamasının programı .....	46
Şekil 3.24- UV ışık altında hedef bölgenin bantlar halinde görüntülenmesi ve istenilen bantların agaroz jelden kesilmesi.....	47
Şekil 3.25- <i>trnL-F</i> bölgesi analizlerinde gerçekleştirilen ikinci PZR uygulamasının programı .....	48
Şekil 3.26- DNA dizi veri girişi için NCBI tarafından istenen dosyaların görünümü.....	50

<b>Şekil 3.27-</b> NCBI internet sitesinde <i>Iris reticulata</i> (ICA 1)'ya ait dizi bilgilerinin görünümü .....	<b>50</b>
<b>Şekil 4.1-</b> Tez çalışmasında izlenen tüm aşamaların şematik gösterimi .....	<b>51</b>
<b>Şekil 4.2-</b> DNA izolasyonu sonrası örneklerin jel görüntüsü .....	<b>52</b>
<b>Şekil 4.3-</b> ICA 1-15 örneklerinin AFLP ön çoğaltım PZR'ı sonrası jel görüntüsü .....	<b>53</b>
<b>Şekil 4.4-</b> ICA 16-26 örneklerinin AFLP ön çoğaltım PZR'ı sonrası jel görüntüsü .....	<b>53</b>
<b>Şekil 4.5-</b> AFLP analizi yapılan ICA 15 DNA'sından elde edilen floresan işaretli fragmentlerin kapiler elektroforez sisteminde yürütülmesi ile elde edilen grafik .....	<b>54</b>
<b>Şekil 4.6-</b> GeXP Genetik Analiz sistemine ait programda skorlamaların görüntüsü.....	<b>55</b>
<b>Şekil 4.7-</b> ICA 1-26 kodlu örneklerin, <i>trnL</i> intron bölgesine özgü evrensel c ve d primerleri ile yapılan PZR sonrası jel görüntüsü .....	<b>56</b>
<b>Şekil 4.8-</b> ICA 1-26 örneklerinin <i>trnL</i> -F bölgesine özgü evrensel e ve f primerleri ile yapılan PZR sonrası jel görüntüsü .....	<b>57</b>
<b>Şekil 4.9-</b> Okuma sonrası GeXP Genetik Analiz Sistemine ait programda ICA 18-f kodlu örneğe ait ham verinin görüntüsü.....	<b>58</b>
<b>Şekil 4.10-</b> Okuma sonrası GeXP Genetik Analiz Sistemine ait programda ICA18-f kodlu örneğe ait analiz edilmiş veri .....	<b>58</b>
<b>Şekil 4.11-</b> <i>Iris</i> bitki örneklerinde (ICA) AFLP analizi sonucu elde edilen Neighbour Joining ağacı .....	<b>60</b>
<b>Şekil 4.12-</b> <i>Iris</i> bitki örneklerinde (ICA) AFLP analizi sonucu elde edilen Maksimum Parsimoni ağacı.....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.13-</b> ICA 26 kodlu bitki DNA'sına ait; kloroplast <i>trnL</i> intron bölgesine özgü "c" ve "d" primerleri kullanılarak yapılan dizi analizinin "DNA Baser" programında birleştirilme işleminin görüntüsü.....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.14-</b> Örneklerin MEGA programında hizalanmış 0-170 blokları arası <i>trnL</i> intron ve <i>trnL-trnF</i> bölgelerine ait nükleotid dizileri.....	<b>63</b>
<b>Şekil 4.15-</b> Örneklerin MEGA programında hizalanmış 170-280 blokları arası <i>trnL</i> intron ve <i>trnL-trnF</i> bölgelerine ait nükleotid dizileri .....	<b>64</b>
<b>Şekil 4.16-</b> Örneklerin MEGA programında hizalanmış 280-420 blokları arası <i>trnL</i> intron ve <i>trnL-trnF</i> bölgelerine ait nükleotid dizileri .....	<b>65</b>
<b>Şekil 4.17-</b> Örneklerin MEGA programında hizalanmış 420-560 blokları arası <i>trnL</i> intron ve <i>trnL-trnF</i> bölgelerine ait nükleotid dizileri .....	<b>66</b>
<b>Şekil 4.18-</b> Örneklerin MEGA programında hizalanmış 560-700 blokları arası <i>trnL</i> intron ve <i>trnL-trnF</i> bölgelerine ait nükleotid dizileri .....	<b>67</b>
<b>Şekil 4.19-</b> Örneklerin MEGA programında hizalanmış 700-840 blokları arası <i>trnL</i> intron ve <i>trnL-trnF</i> bölgelerine ait nükleotid dizileri.....	<b>68</b>
<b>Şekil 4.20-</b> Örneklerin MEGA programında hizalanmış 840-919 blokları arası <i>trnL</i> intron ve <i>trnL-trnF</i> bölgelerine ait nükleotid dizileri .....	<b>69</b>
<b>Şekil 4.21-</b> <i>Iris</i> bitki örneklerinde (ICA) cpDNA dizi analizi sonucu elde edilen Neighbour Joining ağacı .....	<b>70</b>
<b>Şekil 4.22-</b> <i>Iris</i> bitki örneklerinde (ICA) cpDNA dizi analizi sonucu elde edilen Maksimum Parsimoni ağacı.....	<b>71</b>
<b>Şekil 5.1-</b> Seleksiyon genotipleri arasındaki örnek baz farklılığı.....	<b>78</b>
<b>Şekil 5.2-</b> <i>Iris germanica</i> x <i>Iris albicans</i> melezine ait 4 genotip olan ICA 11, ICA 12, ICA 19 ve ICA 25 kodlu genotiplerin dizileri arasındaki örnek baz farklılığı .....	<b>79</b>
<b>Şekil 5.3-</b> ICA 14- 15 ve ICA 24-25 genotipleri arasındaki 2 baz çiftlik farklılık.....	<b>79</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1-</b> <i>Iris L.</i> cinsinin sistematikteki yeri .....	<b>8</b>
<b>Tablo 3.1-</b> Tez çalışması kapsamında incelenen bitki materyalleri .....	<b>34</b>
<b>Tablo 3.2-</b> DNA izolasyonunda kullanılacak stok çözeltiler .....	<b>37</b>
<b>Tablo 3.3-</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler .....	<b>39</b>
<b>Tablo 3.4-</b> <i>EcoRI</i> ve <i>MseI</i> restriksiyon endonükleazlarına özgün adaptör dizileri .....	<b>39</b>
<b>Tablo 3.5-</b> <i>EcoRI</i> ve <i>MseI</i> restriksiyon endonükleazlarının çift iplikli DNA'yı kestığı bölgeler.....	<b>40</b>
<b>Tablo 3.6-</b> Restriksiyon ve ligasyon reaksiyonunda kullanılan enzim karışımının bileşenleri .....	<b>40</b>
<b>Tablo 3.7-</b> Restriksiyon ve ligasyon reaksiyonunun bileşenleri.....	<b>40</b>
<b>Tablo 3.8-</b> AFLP analizlerinde ön çoğaltım PZR aşamasında kullanılan primerler .....	<b>41</b>
<b>Tablo 3.9-</b> AFLP analizlerinde selektif PZR aşamasında kullanılan primerler .....	<b>43</b>
<b>Tablo 3.10-</b> Gen anlatım analizinde kullanılan örnek yükleme çözeltisi bileşenleri .....	<b>45</b>
<b>Tablo 3.11-</b> <i>trnL-F</i> bölgesi analizlerinde kullanılan primerler .....	<b>45</b>
<b>Tablo 3.12-</b> Sekans PZR'ı sonrası ürünleri temizlemede kullanılan “durdurma çözeltisi” bileşenleri .....	<b>48</b>
<b>Tablo 4.1-</b> AFLP primer kombinasyonları ile oluşturulan bantların istatistiksel verileri .....	<b>55</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<b><math>\mu\text{l}</math></b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	: Mikrometre
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	: Mikromolar
<b>bç/bp</b>	: Baz çifti (Baze pair)
<b>dk</b>	: Dakika
<b>HCl</b>	: Hidroklorik Asit
<b>M</b>	: Molar
<b>mg</b>	: Miligram
<b>Mg</b>	: Magnezyum
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum Klorür
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>pmol</b>	: Pikomol
<b>rpm</b>	: Dakikada Döngü Sayısı (Revolutions Per Minute)
<b>U</b>	: Ünite (Unit)
<b>sn</b>	: Saniye
<b>°C</b>	: Derece Santigrat

## KISALTMALAR

<b>AFLP</b>	: oğaltılmış Para Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
<b>APG III System</b>	: Evrimsel Kapalı Tohumlu Gelişimi Topluluğu III Sistemi (Angiosperm Phylogeny Group III System)
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat (Adenosine triphosphate)
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>CAPS</b>	: Kesilip oğaltılmış Polimorfik DNA Dizileri (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
<b>cpDNA</b>	: Kloroplast DNA
<b>CTAB</b>	: Cetyldimethylethyl Ammonium Bromide
<b>ddNTP</b>	: Dideoksiribonkleosid Trifosfat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonkleik Asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonkleosid Trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik Asit
<b>ESTs</b>	: İşaretili İfade Edilen Diziler (Expressed Sequence Tag)
<b>gDNA</b>	: Genomik DNA
<b>ICA</b>	: <i>Iris</i> L. eşit Adayı
<b>ISSR</b>	: Basit İ Dizi Tekrarları (Inter Simple Sequence Repeat)
<b>MEGA</b>	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<b>ML</b>	: Maximum Likelihood (En Yüksek İhtimal Yöntemi)
<b>MP</b>	: Maximum Parsimony (Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi)
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
<b>PHYLIP</b>	: The Phylogeny Inference Package
<b>PVP</b>	: Polyvinylpolypyrrolidone
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RAPD</b>	: Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon Para Uzunluk Polimorfizmi
<b>RNA</b>	: Ribonkleik Asit
<b>RNAse</b>	: Ribonkleaz (Ribonuclease)

<b>SCARs</b>	: Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (Sequence Characterized Amplified Regions)
<b>SSR</b>	: Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeat)
<b>STS</b>	: Dizisi Etiketlenmiş Alanlar (Sequence Tagged Site)
<b>Taq</b>	: <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	: Tris / Borate / EDTA
<b>UPGMA</b>	: Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu (Unweighted Pair-Group Metod of Arithmetic Avarage)
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## ÖZET

### SELEKSİYON VE MELEZLEME ISLAHI İLE ELDE EDİLEN YENİ SÜSEN (*IRIS L.*) VARYETE ADAYLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Dünyada önemli biyoçeşitlilik merkezlerinden olan Türkiye, bulunduğu iklim kuşağında yaklaşık 12 000 takson ve %35'lik endemizm oranı ile oldukça zengin ve ilginç floraya sahip ülkelerden biridir. Bu çeşitlilik, ihraç edilmek üzere doğadan toplanan ve/veya kültür koşullarında üretimi yapılan soğanlı, yumrulu ve rizomlu bitki türlerini kapsayan geofitlerde de görülmektedir. Böylesine yoğun gen kaynağına sahip olmamıza rağmen, Türkiye'de ıslah edilmiş standart süs bitkisi çeşidi bulunmamakta, doğal bitki ticareti de yok denecek kadar az gerçekleştirilebilmektedir. İhraç edilen geofitler arasında özellikle Süsenler (*Iris L.*), parlaklıkları, renkleri, hızlı çiçek açmaları ve çabuk büyümeleri nedeniyle önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmada, Türkiye'de yayılış gösteren *Iris L.* cinsine ait doğal seleksiyon ile oluşan 14 adet *Iris* türünden ve melezleme ıslahı ile elde edilmiş 11 adet melez *Iris* çeşit adayından oluşan 25 genotipin moleküler sistematik analizi yapılmıştır.

Çalışma kapsamında, AFLP moleküler markör sistemine ait floresan ile işaretlenmiş 7 primer kombinasyonu ve kloroplast genomuna özgü *trnL-F* bölgesine ait 4 evrensel primer kullanılarak moleküler analizler gerçekleştirilmiştir. AFLP primerleri ile gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilen ürünler, GeXP Genetik Analiz Sistemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen veriler PHYLIP programı kullanılarak incelenmiş ve bu yolla türler arası akrabalık ilişkilerini ortaya koyan ağaçlar elde edilmiştir.

*trnL-F* bölgesine ait primerler ile gerçekleştirilen PZR sonucu elde edilen ürünlerin GeXP Genetik Analiz Sisteminde dizi analizleri yapılmış, her örnek için *trnL-F* bölgesi baz dizileri belirlenmiştir. Dizilerin işlenmesinde DNA Baser ve MEGA programı birlikte kullanılmıştır. Elde edilen ve işlenen diziler MEGA programı dahilinde Clustal W ile hizalanmış ve filogenetik ilişkileri ortaya koyan ağaçlar elde edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, Türkiye'de yayılış gösteren *Iris* genotiplerinin filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Moleküler markörlerin kullanımından elde edilen sonuçlar, *Iris* genotiplerinin taksonomik ayırımında ve kimliklendirilmesinde etkin olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Çalışma kapsamındaki veriler, istenilen özellikleri taşıyan yeni melezlerin oluşturulma sürecine katkı sağlanması amacıyla ıslah programlarının kullanımına sunulmuştur.

## SUMMARY

### MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NEW IRIS (*IRIS* L.) VARIETY CANDIDATES OBTAINED BY SELECTION AND HYBRIDIZATION BREEDING TECHNIQUES

As one of the most important biological diversity center in the world; Turkey has got approximately 12.000 taxa, and with the ratio of 35% endemism, it has really generous and interesting flora in its regional climate zone. This diversity is also seen among the geophytes that involves alliaceous, tuber and rhizomatous plants, which are collected from nature and/or produced at cultural conditions for the purpose of export. Despite having such intense gene resources, there is no cultivated ornamental plant species in Turkey and there is little if any natural plant trade. Among the exported geophytes, *Iris* (*Iris* L.) holds an important position thanks to the radiances, colors, rapid blooming and fast growth capabilities.

In this study, the molecular systematic analysis of 25 genotypes, which are composed of 14 *Iris* species of *Iris* L. genus emerged through natural selection that spread through Turkey and 11 hybrid *Iris* candidate varieties obtained by hybridization breeding have been conducted.

In the frame of this study, molecular analyses have been performed by using 7 primer combinations that are marked by the fluorescent belonging to AFLP molecular marker system and 4 universal primers which are indigenous to chloroplast genome belonging to *trnL-F* region. The products that are obtained through analyses by AFLP primers were analyzed using GeXP Genetic Analysis System. The resulted data of the analysis were examined by using PHYLIP program and by this way the phylogenetic trees that indicates the relationships among the species were obtained.

Sequence analysis of the products derived from PCR by primers belonging to *trnL-F* region are made at the GeXP Genetic Analysis System and *trnL-F* region based sequence have been identified for each sample. DNA Baser and MEGA softwares were used together through the processing of sequence data. The obtained and processed sequences were aligned via Clustal W within the MEGA software and pedigrees that present phylogenetic relations were obtained.

Within the scope of the thesis study, phylogenetic relations of *Iris* genotypes spreading across Turkey were revealed. It was also proved that the results obtained from the usage of molecular markers can be evaluated in taxonomical delimitation and identification of *Iris* genotypes effectively. The results from molecular markers were put into service of breeding programs with the purpose of contributing to the process of producing new hybrids having desired features.



## 1. GİRİŞ

Süsengiller (*Iridaceae*) familyasına ait bir cins olan süsen (*Iris L.*) rizomlu veya soğanlı yer altı gövdelerine sahip çok yıllık otsu bitkilerdir. Dünyada kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde 300'den fazla türü bulunan *Iris L.* cinsinden 37 türe ait toplam 43 takson, ülkemizin hemen tüm bölgelerinde ve çeşitli habitat koşullarında doğal olarak yayılış göstermekte olup, 14 türe ait toplam 16 takson da Türkiye florası için endemiktir (Mathew, 1984). Süs bitkileri arasında önemli bir yere sahip olan Süsen (*Iris L.*), parlaklıkları, renkleri, hızlı çiçek açmaları ve çabuk büyümeleri nedeniyle park, bahçe ve balkonlarda diğer süs bitkilerine göre daha çok tercih edilirler. Bunun yanında ilaç ve kozmetik sanayinde de kullanılmaları, bitkinin ekonomik değer ve önemini arttırmakta ve böylece bitkinin ıslah çalışmaları hızlanmaktadır. Islah çalışmaları sonucunda, ebeveynlerinden daha hızlı büyüyen, daha göz alıcı renklere sahip çeşitlerin ortaya çıkması mevcut pazarın büyümesini sağlamakta ve dolayısıyla bu tarz çeşitlerin geliştirilmesinin önemi her geçen gün artmaktadır.

Uzun yıllardır, tür içi ve türler arası biyoçeşitliliğin belirlenmesinde, türlerin sınıflandırılmasında ve akrabalık ilişkilerinin incelenmesinde morfolojik ve biyokimyasal karakterlerden yararlanılmaktaydı. Fakat bu karakterlerin çevresel ve iklimsel koşullardan etkilenmesi nedeniyle teşhis ve tanımlamalarda yanıltıcı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Son yıllarda taksonların sınırlandırılması, karakterizasyonu ve populasyon analizlerinde moleküler yöntemlerin gelişmesi, daha kesin ve güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlamıştır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri olan moleküler markör sistemlerinin çevresel ve iklimsel faktörlerden etkilenmemesi, organizmanın gelişme evrelerinin her aşamasında kullanılabilmesi ve daha güvenilir bilgi vermesi, morfolojik ve biyokimyasal karakterler yerine ilgili araştırmalarda yaygın olarak kullanılmasına sebep olmuştur.

Dünyada çeşitli *Iris L.* türlerinin fenolojik, morfolojik ve fitofarmasotik özellikleri hakkındaki çalışmaların yanısıra; çeşitli moleküler markörlerin kullanıldığı genetik

analiz çalışmaları mevcuttur (Burke ve diğ., 1999; Makarevitch, 2003). Buna karşın Türkiye’de yayılış gösteren taksonlar ve melez genotipler ile ilgili moleküler karakterizasyon çalışması bulunmamaktadır.

Sunulan tez çalışmasında, Türkiye florasında kayıtlı taksonlardan arazi çalışmaları sonucu toplanan bazı süsen (*Iris L.*) türleri ve bu türlerin melezlenmesi sonucu ortaya çıkan çeşit adaylarının karakterizasyonunda floresan temelli AFLP (oğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) moleküler markör tekniği ve kloroplast genomuna özgü markörler kullanılarak yapılacak dizi analizleri ile filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, akrabalık derecelerinin saptanması, türler arası polimorfizm ile genetik varyasyonların ortaya koyulması ve olası çeşit adaylarının ilgili sektörlere kazandırılması amaçlanmaktadır.

Bu tez alışması, TBTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvarı’nda yürütülmekte olan TBTAK KAMAG tarafından TARAL 1007 – 110G007 numaralı proje ve İstanbul Üniversitesi BAP birimi tarafından 26617 no’ lu tez projesi ile desteklenmektedir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar *Iris L.* cinsinin moleküler kimliklendirmesi ve taksonomik analizine katkı sağlanması yanında ekonomik değeri dikkate alındığında, çeşitli zirai ıslah çalışmalarından değerli genotiplerin seleksiyonu için genetik tabanın aydınlatılması açısından önem taşımaktadır.

## 2. GENEL KISIMLAR

Türkiye, mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça zengin bir floraya sahiptir. Bu zenginlik; üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya floraları arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun köken ve farklılaşma merkezlerinin Anadolu'da bulunması, habitat çeşitliliği ile ekolojik ve fitocoğrafik özelliklerinden dolayı tür endemizminin yüksek olmasından ileri gelmektedir. Türkiye florasında bulunan yaklaşık 10.000 civarında çiçekli bitki türünün 3500 kadarı ülkemiz florasına özgü endemik türler olup, başka ülkelerde doğal yayılışları bulunmamaktadır. Florada bulunan çiçekli bitki türlerinden yaklaşık 818 kadarı ise geofittir (Koyuncu, 2007; [www.turkiyegeofitleri.com](http://www.turkiyegeofitleri.com)).

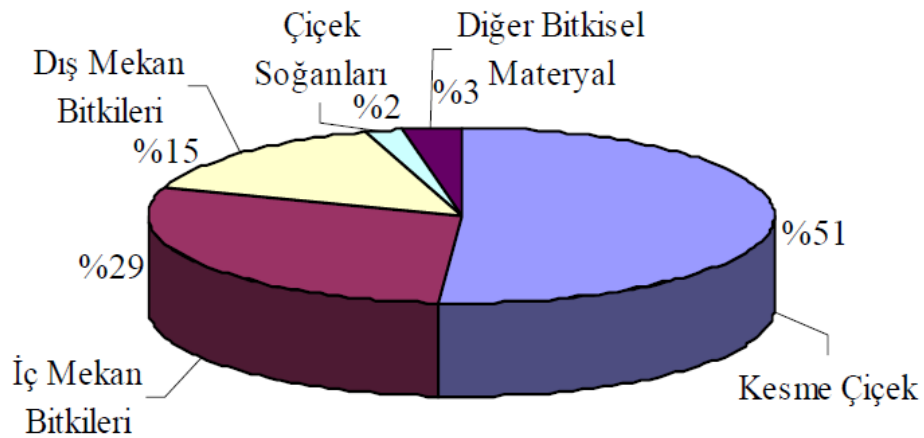
Türkiye' de yayılış gösteren 72 geofit taksonundan; *Colchicum* (Acı Çiğdem), *Fritillaria* (Ters Lale), *Hyacinthus* (Sümbül), *Iris* (Süsen), *Lilium* (Zambak), *Nectaroscordum* (Ballı Sarımsak), *Polygonatum* (Mührüsüleyman), *Tulipa* (Lale) gibi taksonlar ekonomik değeri olanlardan bazılarıdır (Irmak ve Yılmaz, 2011). Geofitlerin tüm dünyada süs bitkisi olarak kullanımı yaygın olup çiçek ihracatında büyük bir pazar oluşturmaktadır. Türkiye'de ise geofitler; başta Hollanda olmak üzere Almanya, İngiltere gibi Avrupa ülkelerine, A.B.D.'ye satılmakta ve karşılığında ülkemize her yıl yaklaşık 2-2.5 milyon \$ döviz kazandırmaktadır. Ancak ekonomiye sağlanan bu katkı üretim yerine, daha çok doğadan toplanan yabani çiçek soğanına dayalı olduğundan flora çeşitliliği ve ekonomik katkının geleceği için bir tehdit oluşturmaktadır. Bu durum da genetik tabanının aydınlatılması ve türlerin kültüre alınması gerekliliğinin önemini arttırmaktadır (Karagüzel ve diğ, 2007).

## 2.1 SÜS BİTKİSİ SEKTÖRÜNDE GEOFİTLERİN YERİ VE ÖNEMİ

Süs bitkiler sektörü, ekonomiye büyük katkı sağlayan bitkisel üretim içinde önemli bir yere sahip bir sektör olarak kabul edilmektedir. Kesme çiçekler, iç mekan (saksılı) süs bitkileri, dış mekan (tasarım) süs bitkileri, ve çiçek soğanları (geofitler) bu sektörün ilgi alanına girmektedir.

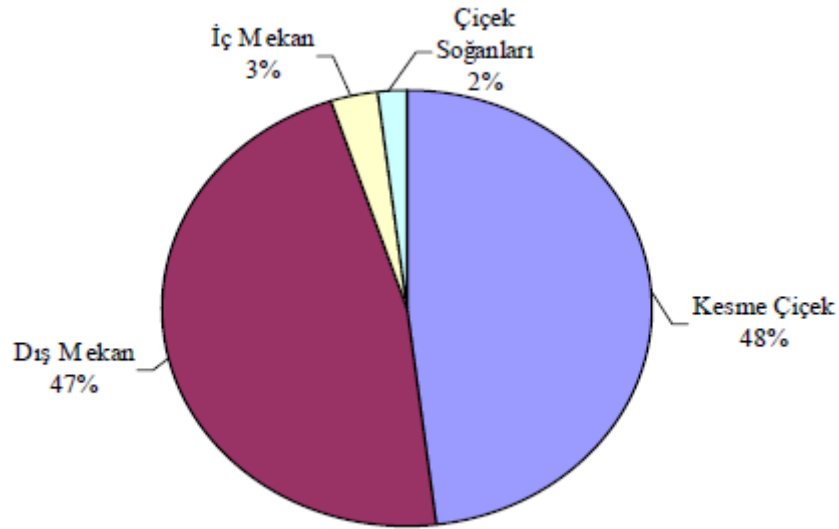
Geofitler, ihraç edilmek üzere doğadan toplanan ve/veya kültür koşullarında üretimi yapılan doğal soğanlı, yumrulu ve rizomlu bitki türlerini kapsamaktadır. Bu bitkiler ekonomiye sağladıkları katkı bakımından dünyada ve Türkiye’de süs bitkileri içerisinde ayrı bir öneme sahiptir. Ülkemiz sahip olduğu çeşitli ekolojik bölgeler ile bir çok bitkinin gen kaynağı merkezidir. Özellikle geofitler bakımından da oldukça zengin olup 800’den fazla soğanlı, yumrulu ve rizomlu türün anavatanıdır. Uzun yıllardan beri doğadan sökülen çiçek soğanları, park ve bahçe süs bitkisi, ıslah materyali veya tıbbi bitki olarak değerlendirmek üzere çeşitli ülkelere ihraç edilmektedir (Ekim ve diğ., 1991). Türkiye dışarıya çiçek soğanı ihraç eden tek ülke olmamakla birlikte dünya doğal çiçek soğanı ihracatında ilk sıralarda yer almaktadır (Karagüzel ve diğ., 2007).

Çiçek soğanlarının süs bitkileri sektörü içerisindeki toplam üretimden aldığı pay, diğer üretim kollarına kıyasla az görünmesine rağmen; lale, süsen, çiğdem ve zambak gibi geofitlerin dünyada kesme çiçek olarak kullanımları oldukça yaygındır. Dünya’da süs bitkileri üretim değerleri içinde ürün gruplarının payları Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1- Dünya’da süs bitkileri üretim değerleri içinde ürün gruplarının payları (Karagüzel ve diğ., 2007).

Dünya süs bitkileri sektöründe ilk sıralarda yer alan Hollanda, doğal çiçek soğanlarını ithal edip, bunlara doğrudan veya basit ıslah işlemleri uyguladıktan sonra ihraç ederek bu sektörden önemli gelir elde etmektedir (Titiz ve diğ., 2000). Önceleri botanik bahçelerini zenginleştirmek için toplanan örnekler daha sonra yerini geniş çapta sökümlere ve sonunda bu işin ticaretine bırakmıştır. Ülkemiz, uzun bir süreden beri 20 civarında doğal geofit türünün yurtdışına satılmasından dolayı dünya çiçek soğanı ihracatında ilk sıralara yerleşmiştir. Fakat bu ihraç edilen ürünün büyük bir kısmının doğadan toplanması sebebiyle doğamız uzun yıllar boyunca tahrip edilmiştir (Baştuğ ve Ünal, 1997). Türkiye'deki süs bitkileri ürün gruplarının payları Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2- Türkiye'deki süs bitkileri ürün gruplarının payları (Karagüzel ve diğ., 2007).

Ülkemizde sektör, her ne kadar büyük oranda doğadan toplamaya bağlı olsa da, son yıllarda doğal geofitlerin kültüre alınıp üretilmeleri önem kazanmaya başlamıştır. Bu üretim hem ekonomik katkının devamı hem de doğanın ve doğal genotiplerin korunması için önemlidir. Bu konuda *Lilium*, *Leucojum*, *Fritillaria*, *Stenbergia* ve *Iris* gibi türler kültür arazilerinde üretilebilirken, Türkiye'nin önemli ihraç türlerini oluşturan *Galanthus*, *Eranthis*, *Anemone* ve *Cyclamen* doğal ortamlarında üretilebilmektedir (Karagüzel ve diğ., 2007).

Türkiye gibi geofit bakımından zengin gen kaynağına sahip ülkelerde, doğadan sökümlerin hızla azaltılması ve önümüzde yıllar içerisinde tamamen yasaklanması

gerekmektedir. Geofitlerle çalışılan sektörlerin de üretim çalışmaları doğaya bağımlı kalmamak kaydıyla devam etmelidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, yer seçimi iyi yapıldığı sürece geofitlerin sürdürülebilir üretiminin kolaylıkla yapılacağını kanıtlamıştır (Karagüzel ve diğ., 2007).

## 2.2 IRIDACEAE FAMILYASININ GENEL ÖZELLİKLERİ

Iridaceae familyası 80 kadar cinsiyle geniş ve oldukça çeşitlilik içeren bir familyadır. Familyanın başlıca merkezi güney yarım küredeki kıtalardır. Familya tipik olarak izobilateral yapraklar, epigin çiçek durumu ve üç stamenli çiçekler ile karakterize edilmektedir (Rudall, 1994; Akyol, 2012).

Kozmopolit olarak yayılış gösteren Iridaceae familyası güney yarım kürede Antarktika-Avustralasya kıtalarında geç kratese döneminde yaklaşık 82 milyon yıl kadar önce köken almıştır. Başta Akdeniz bölgesi olmak üzere güney Afrika ve güney Amerika dahil yeryüzünün bütün bölgelerinde yayılmış 80 cins ve 1655 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye’de ise Iridaceae, *Iris*, *Gyandriris*, *Romulea*, *Gladiolus*, *Hermodactylus* ve *Crocus* olmak üzere 6 cins ve yaklaşık 86 tür ile Asparagales ordosunun ekonomik ve tıbbi bakımdan değeri olan önemli familyalarından birisidir. Bu familyanın, Asparagales ordosuna ait diğer familyalardan farklılığı bir andrekeum halkasının körelmiş olmasıdır (Selvi, 2005).

Iridaceae familyası üyeleri; rizomlu, soğanlı, kormuslu çok yıllık otsu bitkiler, nadiren çalılardır. Sıklıkla skapoz gövdelidir. Familya, genellikle kaidede ve çok sayıda, basit ve bileşik yaprağa sahiptir. Yaprak dizilişleri; distik equitant, alternat; yaprak şekilleri linear veya ensiformdur. Çiçek rasemoz ya da panikula durumunda yada bazen uçta tek bulunur. Çiçekler aktinomorf veya zigomorfik simetrlili hermafrodit durumundadır. Genellikle geniş ve gösterişli spatula (genişleşmiş brakte) tarafından sarılmıştır (Rudall, 1991).

Perigon, petale benzer ve 6 parçalıdır. Her bir parça tepal olarak isimlendirilir. Tepaller iki daire içinde dizilmiş benzer ya da farklı olabilir, genellikle kaidede birleşmiş ve çeşitli renkelere sahip perigon tûpünü oluşturlar (Zomlefer, 1994; Selvi, 2005).


Familyanın tipik çiçek formülü  $P_{(3+3)}A_3G_{(3)}$ 'dür. Sayıları 3 olan ve tepallere bakan stamenler karşılıklı ve sıklıkla dıştaki tepallere bakan yöndedir (ekstrors), ve anter yarıkları genelde boyuna açılır. Dişi organlar 1 pistilli, 3 karpelli, 3 gözlü (lokulus), ovaryum alt durumludur. Ovuller anatrop tiptedir, az veya çok sayıda olabilir. Plesentasyon eksenseldir; eğer 1 gözlü ise plesentasyon parietal olur. Meyva lokulusit kapsuladır. Iridaceae familyası çoğunlukla saponinler ve çeşitli terpenoid bileşikler içerir. İçerdikleri kimyasal bileşiklerden dolayı tıbbi ve ekonomik değerleri vardır (Selvi, 2005).

Iridaceae familyası dünyada en çok Güney Afrika'nın farklı ülkelerinde Doğu Akdeniz Bölgesi'nde ve Tropikal Amerika'da yayılış göstermektedir. En fazla türe sahip olan başlıca cinsler: *Iris* (300spp), *Gladiolus* (180-300spp), *Moraea* (100-111spp) ve *Sisyrinchium* (200spp) cinsleridir (Selvi, 2005).

### **2.3 IRIS L. CİNSİNİN SİSTEMATİKTEKİ YERİ**

*Iris* L. cinsinin, moleküler filogenetik ve moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak belirlenmiş ve 2009'da yenilenmiş "Evrimsel Kapalı Tohumlu Gelişimi Topluluğu III Sistemi (Angiosperm Phylogeny Group III system)"ndeki yeri Tablo 2.1'de verilmiştir. (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>)

Tablo2.1- *Iris* L. cinsinin sistematikteki yeri.

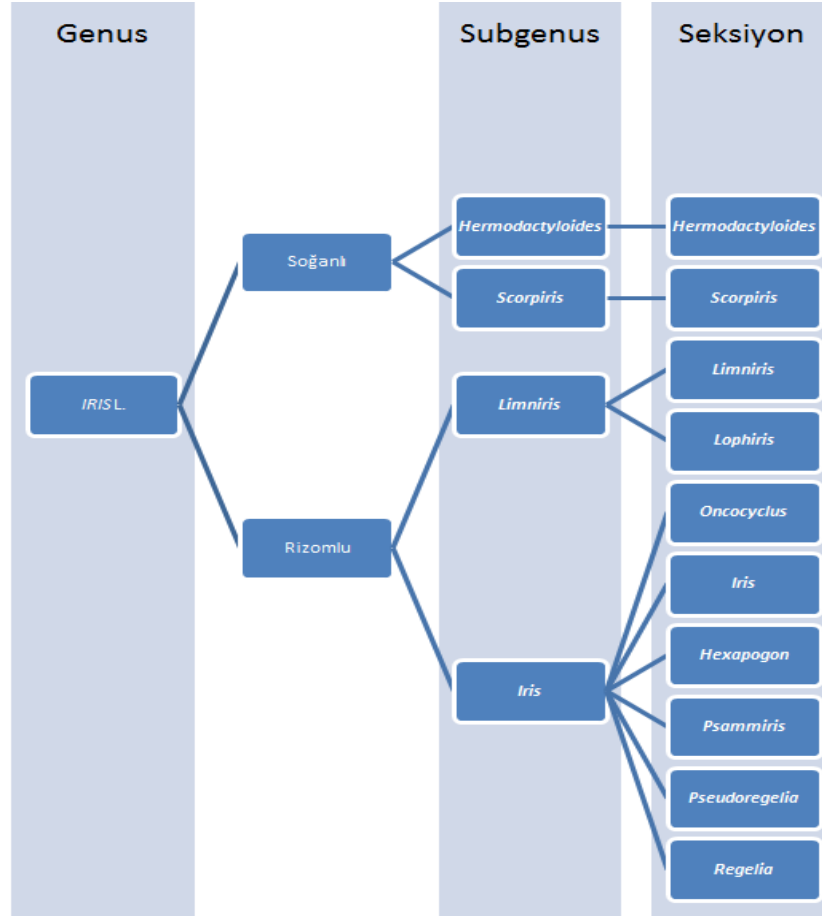
Alem	: Plantae	
Bölüm	: Spermatophyta	
Alt Bölüm	: Angiospermeae	
Sınıf	: Monocotyledoneae / Liliopsida	
Takım	: Asparagales	
Familya	: Iridaceae	
Alt familya	: Iridoideae	
Oymak	: Iridae	
Cins	: <i>Iris</i> L.	

## 2.4 IRIS L. CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Tohumlu bitkiler (*Spermatophyta*) bölümü, kapalı tohumlu bitkiler (*Angiospermae*) alt bölümü, tek çenekliler (*Monocotyledoneae*) sınıfı, *Asparagales* takımı, Süsengiller (*Iridaceae*) familyasına ait olan *Iris* L. cinsi kuzey yarımkürede 300'den fazla türle temsil edilmektedir (Rodionenko,1987; Makarevitch, 2003). Ülkemizde yayılış gösteren 43 taksondan 14 tür ile alt tür ve varyeteleri de kapsayan toplam 16 takson endemiktir (Mathew, 1984). *Iris* L. türleri rizomlu veya soğanlı yeraltı gövdelerine sahip çok yıllık otsu bitkilerden oluşur. Yaprakları yassı, çoğunlukla tabandan çıkan, düz ve uzun şerit şeklinde; çiçekleri sapsız veya kısa bir sap üzerinde tek veya birkaç tanesi bir arada kimoza çiçek durumuna sahip, başak dizilişli olup Mayıs başından kış başlangıcına kadar açan çeşitleri bulunur. (Doyle ve Doyle, 1990). Perigon segmentleri 6 parçalı ve tabanda birleşik olup iyi gelişmiş bir tüp oluştururlar. Dıştaki segmentler açık ve üç parçalı, yayık ve sarkık konumlu, iç segmentler dik veya aşağı doğru sarkık durumlu, iyi gelişmiş ve dış segmentlerle eşit boyutlardadır. Stamenler üç adet, dış segmentlere karşı konumludur ve dışa doğru açılır (extrorsus). Stilus 3 dallı ve petaloid formdadır. (Mathew, 1984; Johnston ve diğ., 2000). Çok sayıda ve bazen arilat yapıda tohumları mevcuttur. *Iris*'lerin güç tohum bağlaması, tohumdan elde edilen bitkilerin geç çiçek



açması sebebiyle üretimi rizom aracılığı ile gerçekleştirilir. Ancak yeni çeşitler meydana getirmek için tohum kullanılır (www.turkiyegeofitler.com). *Iris* L. cinsinin alt taksonları Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3- *Iris* L. cinsinin alt taksonları.

Bu bitkiler dekorasyon ve ilaç sanayinde kullanılmaya başlandığından beri ekonomik bir değer kazanmıştır (Kandemir ve Engin, 2000). Süs bitkileri arasında en bilineni olarak *Iris* L. (Süsen) park, bahçe ve balkonlarda göze çarpmaktadır. Parlak, renkli ve güzel çiçekleri, diğer süs bitkilerine göre daha çabuk çiçeklenmeleri ve büyümeleri yüzünden tercih edilmektedir. Bazı türlerin çaprazlanması sonucu melez türlerin elde edilmesi, elde edilen türlerin daha çarpıcı renklere sahip olması ve anaç bireylerden daha hızlı büyümeleri sebebiyle günümüz çiçekçiliğinde büyük bir öneme sahiptirler (Johnston ve diğ., 2001; Burke ve Arnold, 1999). Ayrıca bu türlerin rizomlarından elde edilen bileşikler anti ülser, antioksidan ve anti kanser etkileri sebebiyle ilaç yapımında da kullanılmaktadır. Menekşeye benzer kokuları yüzünden kozmetik endüstrisinde

parfüm yapımında kullanılmakta; ayrıca bitkinin çiçekleri kırsal bölgelerde yiyecek olarak da tüketilmektedir (Orhan ve diğ., 2002).

## **2.5 MARKÖRLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ**

Ekonomik değere sahip bitkilerin ıslahı, çeşitli stres koşullarına dayanıklı ve verimi yüksek bitki varyetelerinin oluşturulması; uzun zamandır çalışılan önemli bir alandır. Uzun süreli ve yoğun emeğe dayalı ıslah tekniklerinin yanında, moleküler tekniklerin gelişmesi ıslah çalışmalarını hızlandırmış ve özel varyetelerin elde edilmesini kolaylaştırmıştır. Moleküler markör (belirteç) teknikleri, uzun uğraşlar sonucu elde edilen varyetelerin ayırt edilmesi ve korunması, ıslah çalışmalarında kullanılacak değerli genotiplerin seleksiyonu için genetik yapının aydınlatılması gibi durumlarda kullanılan morfolojik ve biyokimyasal belirteçlerin yanında çok daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Bitkilerin akrabalık derecelerinin incelenmesi ve ıslah çalışmalarının yürütülmesinde önemli yararlar sağlayan markörler; morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olmak üzere 3'e ayrılırlar.

### **2.5.1 Morfolojik Markörler**

Tek lokus ile idare edilen, çevre şartları ile değişebilen fenotipe dayalı markörler morfolojik markörler olarak adlandırılır (Yaşa, 2005). Bir bitki popülasyonu içinde, bir bitkiyi ya da bir grubu diğerlerinden ayıran gözle görülebilir seçici bir özelliği ifade eder. Meyve kabuğu, yaprağın şekli, çiçeğin rengi, bitki ağaç özellikleri bu grup markörleri oluşturur (Gülşen ve Mutlu, 2005).

### **2.5.2 Biyokimyasal Markörler**

Doğrudan gen ürünleri olan biyokimyasal markörler, morfolojik markörlerin çevre koşulları ile değişmesi sonucu oluşan aksaklıkları ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir. Sekonder metabolitler, alkaloidler, yağ asitleri, tohum kabuğu proteinleri, izoenzimler, bu gruba girerler (Gülşen ve Mutlu, 2005; Altıncut Uncuoğlu, 2009; Özcan 2013). Protein markörler enzim proteinleri ve depo proteinleri olarak ikiye ayrılırlar (Yıldırım ve Kandemir, 2001). En yaygın kullanılan biyokimyasal markörler izoenzimler ve tohum proteinleridir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

### **2.5.3 Moleküler Markörler**

Moleküler markör (belirteç) ile genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili biyolojik etkisi olmayan ve sonraki nesillere aktarılan DNA parçası temsil edilmektedir. Moleküler markör yöntemleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanır. Moleküler markörler, görünür özelliklere dayanan morfolojik markörlerden ve genlerin ürünü olan proteinlere dayanan biyokimyasal markörlerden farklı olarak; DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından dolayı DNA markörleri adı altında da bilinirler. Çevresel faktörlerden etkilenmez ve stabildirler. Temelde DNA markörleri elektroforez (agaroz veya florasan temelli kapiller elektroforez) ve çeşitli boyama teknikleri veya radyoaktif/kolorimetrik proplar ile genetik farklılıkları görsel olarak ortaya koyarlar. DNA markörleri aynı veya farklı türlere ait bireyler arasındaki farklılıkları ortaya koyabildikleri gibi (polimorfik DNA markörü), genotipler arasındaki farklılıkları ayırt edemediklerinde monomorfik DNA markörleri olarak adlandırılırlar (Altunkut Uncuoğlu, 2010).

İyi bir moleküler markör şu özelliklere sahip olmalıdır.

- Mendel kalıtımı göstermeli
- Polimorfik olmalı
- Kodomominant karakterleri de ayırt edebilmeli
- Epistatik özellik göstermemeli
- Çevre şartlarından etkilenmemeli
- Genomda frekansı yüksek ve tüm genoma dağılmış olmalı
- Tekrar edilebilirliği yüksek olmalı
- Laboratuvarlar arası kolay veri alışverişine olanak tanımalı

#### *2.5.3.1 Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markörler*

Çeşitli şekillerde etiketlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA), araştırılan DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA ile hibridizasyonunu, ardından kesilen DNA parçacıklarının jel elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmasını ve bu parçacıkların bir nitroselüloz membrana emdirilmesi sonucunda prob DNA hibridizasyonu aşamalarını içermektedir (Altunkut Uncuoğlu, 2009). En yaygın kullanılan hibridizasyona dayalı moleküler markör RFLP (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi)'dir.

#### *2.5.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'na Dayalı Moleküler Markörler*

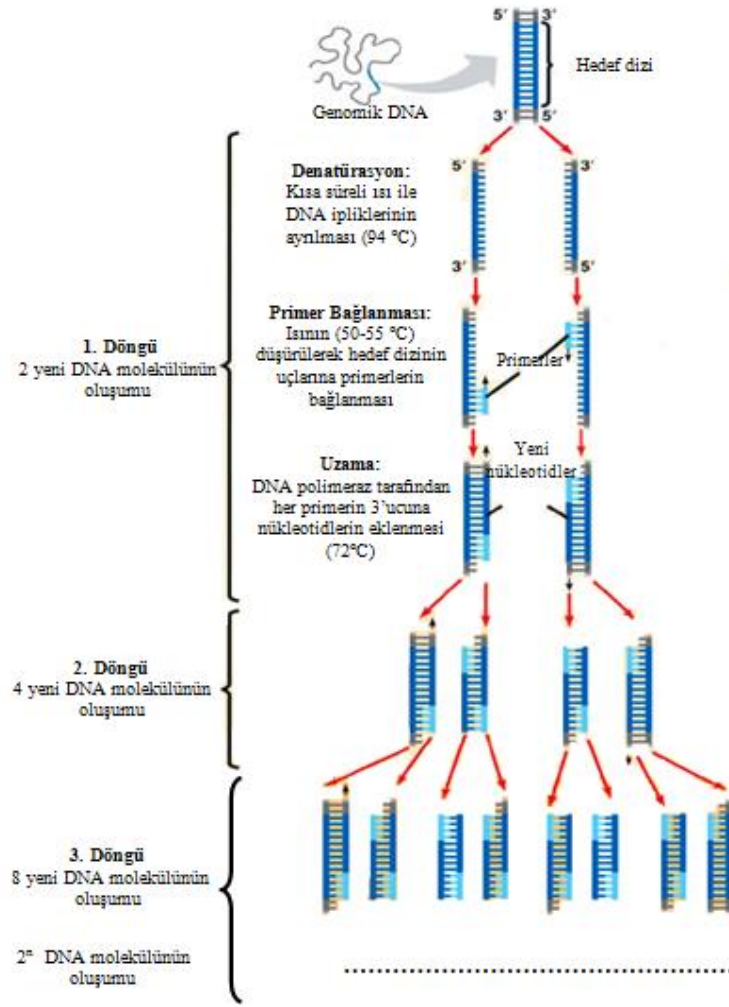
1983 yılında K. Mullis ve arkadaşları tarafından PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'ın bulunmasıyla moleküler biyoloji ve moleküler tıp yenilenmiştir. PZR bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında bulunan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir tekniktir. Başlangıçta belirli bir genin sadece küçük bir parçası elde edilebilirken, günümüzde PZR kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen kopyasından milyonlarca kopya çoğaltılabilmektedir (Tez, 2011).

PZR hücre içinde (*in vivo*) DNA'nın kendini eşlemesi mekanizmasına dayanır. Çift zincirli DNA, tek zincirli DNA biçimine çözülür, kopyalanarak çoğaltılır ve tekrar bağlanır. Bu teknik;

- Çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta çözülerek tek sarmal haline gelmesi: denatürasyon,
  - Primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması: primer eşleşmesi,
  - $Mg^{+2}$  iyonlarının varlığında, katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin uzaması: primer uzaması,
- İşlem döngülerinin çok sayıda tekrarından oluşur (Querci ve diğ., 2006).

Genellikle kısa zincirlerden oluşan oligonükleotidler, birbirlerinden dizin olarak farklıdır. Primerlerin dizisi çoğaltılacak hedef DNA'ya komşu tanımlama bölgelerine eşittir. Denatürasyon, primer bağlanması ve primer uzaması PZR metodunda bir döngüyü oluşturur (Querci ve diğ., 2006).

Her döngünün sonunda yeni sentezlenen DNA zincirleri, bir sonraki döngü için hedef zincir olabilir. Reaksiyonun ana ürünü, sonu oligonükleotid primerlerin 5' ucu olan ve uzunluğu primerler arası uzaklıkla tanımlanan tek zincirli bir DNA parçasıdır. Başarılı bir amplifikasyonun ilk döngüsünün ürünleri, iki primerin bağlanma bölgeleri arasındaki uzaklıktan daha fazla uzunluğa sahip, farklı boyutlarda DNA molekülleridir. İkinci döngüde, istenen uzunluktaki DNA zincirleri oluşur. Bu ürünün miktarı diğer amplifikasyon döngülerinde doğrusal olarak çoğalır ve reaksiyonun temel çıktısını oluşturur (Şekil 2.4) (Querci ve diğ., 2006; Tez, 2011).



Şekil 2.4- Polimeraz Zincir Reaksiyonun şematik gösterimi

PZR işleminin otomatik hale gelmesinde iki temel gelişmenin etkisi vardır. Birincisi; termofilik *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen yüksek sıcaklıkta aktivitesini koruyan DNA polimerazlarının ticari olarak kullanılmaya başlanması ile reaksiyonun başlangıcında eklenen ticari polimeraz sayısız işlem döngüsü boyunca aynı aktiviteyi göstermesidir. İkincisi; sıcaklığın programlı olarak hızlı bir şekilde düşürülüp yükseltilebildiği döngüsel ısı cihazlarının geliştirilmesidir. Bu cihazlar; PZR cihazları ya da ısısal döngü cihazları olarak da bilinirler (Querci ve diğ., 2006).

PZR tekniği; genetik hastalıkların teşhisinde, DNA dizi analizi ve DNA haritalamasında, DNA parmak izi çalışmalarında, analık-babalık testinde, genetik yapısı değiştirilmiş bitki veya mikroorganizmaların saptanmasında, adli tıpta kimlik belirlenmesinde türler arasındaki polimorfizmin hesaplanmasında, mutagenез ve gen

ifadelerinin karşılaştırılmasında, moleküler klonlamada (DNA klonlanması) kullanılmaktadır.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), STS (Sequence Tagged Site), ESTs (Expressed Sequence Tag)'lerden köken alan EST-SSR markörleri, SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markörleri en önemli markör çeşitleridir (Semagn ve diğ., 2006).

## **2.6 AFLP (ÇOĞALTILMIŞ PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ) MARKÖR TEKNİĞİ**

Bu çalışmada kullanılan yöntemlerden biri olan floresan temelli AFLP tekniği; restriksiyon enzimleriyle kesilmiş DNA'nın seçici çoğaltımına dayanır (Şekil 2). Zabeau ve Vos tarafından 1993' de geliştirilen bir tekniktir. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği RAPD tekniğinin olumsuz yönlerini gidermek için geliştirilmiştir (Şahin, 2011). Genomik DNA'nın restriksiyon endonükleazları ile kesimi, kesilen uçlara uygun adaptörlerin bağlanması, adaptör bağlanmış parçaların adaptörlere homolog olan ve rastgele kısa nükleotidler içeren primerlerle çoğaltılması, floresan boyalı primerler ile ikinci defa çoğaltılması ve görüntülenmesi gibi aşamaları içermektedir (Aggarwal, 2002).

Bu çalışmadaki AFLP tekniği; floresan boyalar ile kapiler jel elektroforezi kullanıldığı için 5 basamaktan oluşmaktadır:

1. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve oligonükleotit adaptörlerle birleştirilmesi
2. Restriksiyon parçalarının PZR ile ön çoğaltımı.
3. Çoğaltılan parçaların agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi (Parçaların varlığının tespiti).

4. Floresanlı primerler kullanılarak, PZR ile parçaların seçici çoğaltımı ve işaretlenmesi
5. Kapiler Jel Elektforezi tekniği ve ileri algoritmik yazılımlar kullanan “Otomatik Genetik Analiz Sistemleri” sayesinde parçaların analizi.

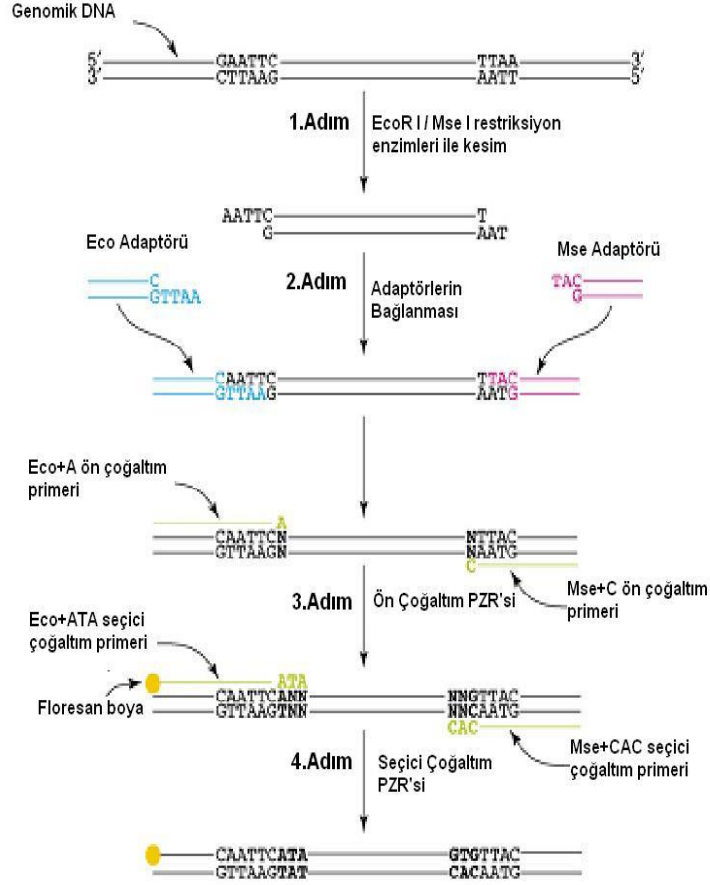
Restriksiyon parçalarının PZR’la çoğaltımı adaptör ve restriksiyon bölgesi dizilerinin (sekanslarının) primerlerin bağlanması için hedef bölgeler olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Oluşan DNA parçaları floresan boya ile işaretli farklı primer kombinasyonlar kullanılarak gerçekleştirilen seçici çoğaltım PZR’ı ile çoğaltılır. Kapiler jel elektforezi ile ayrılan ve büyüklükleri belirlenen işaretli parçalar; yazılım tarafından örnekte varlık/ yokluk ifade eden 1/0 numaraları ile skorlanır. Polimorfik ve monomorfik bantlar analiz edilir (Vos ve diğ., 1995).

Bu çalışmada kullanılan AFLP markör tekniği ile elde edilen DNA parçaları birbirlerine yakın baz sayılarına sahip olabilir. Bu durum DNA parçalarının agaroz jel elektforezi ile ayrılmasını mümkün kılmaz. Önceleri bu amaçla yüksek ayırıştırma gücüne sahip Poliakrilamid Jel Elektforez (PAGE) yöntemi kullanılırdı. Günümüzde ise AFLP analizinin ikinci PZR (seçici çoğaltım PZR’si) aşamasında ortama katılan floresan boyalı primerler ile işaretli DNA parçaları elde edilmekte ve bu PZR ürünlerinin analizi çeşitli genetik analiz sistemleri ile yapılmaktadır.

Tez kapsamında kullanılan GeXP (Genome Lab GeXP Genetik Analiz Sistemi, Beckman Coulter) donanım, yazılım ve kimyasal olmak üzere 3 temel bileşen üzerine kurulmuştur. Donanım elektforez işlemini otomatik olarak gerçekleştirebilecek bir kapiler jel elektforez platformu ile infra-red lazer/floresan eksitasyon yoluyla gerçekleşen optik okuma sisteminin bütünleşmiş halidir. GeXP sistemi; çoğaltma süreci içinde dizi ve fragment analizleri için floresan işaretli primer kullanılması nedeniyle doğru ve etkin sonuçlar vermektedir (Kibaroglu, 2009).

AFLP’nin üstünlükleri; yüksek oranda polimorfizm sağlaması, RFLP’ye göre daha hızlı bir yöntem olması, az sayıda primer kombinasyonu kullanılarak çok sayıda markör oluşturması, parmak izi analizleri için oldukça uygun bir yöntem olmasıdır. Tekniğin olumsuzlukları ise; saf ve yüksek moleküler ağırlıkta DNA’ya gereksinim duyulması, dominant markörler olması nedeniyle heterozigot genotipleri ayırt etmeye

olanak verememesidir (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Meudt ve Clarke, 2007). Şekil 2.5'te AFLP tekniğinin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.5- AFLP'nin şematik gösterimi.

## 2.7 KLOROPLAST GENOMU, *trnL* İNTRON VE *trnL-F* BÖLGESİ

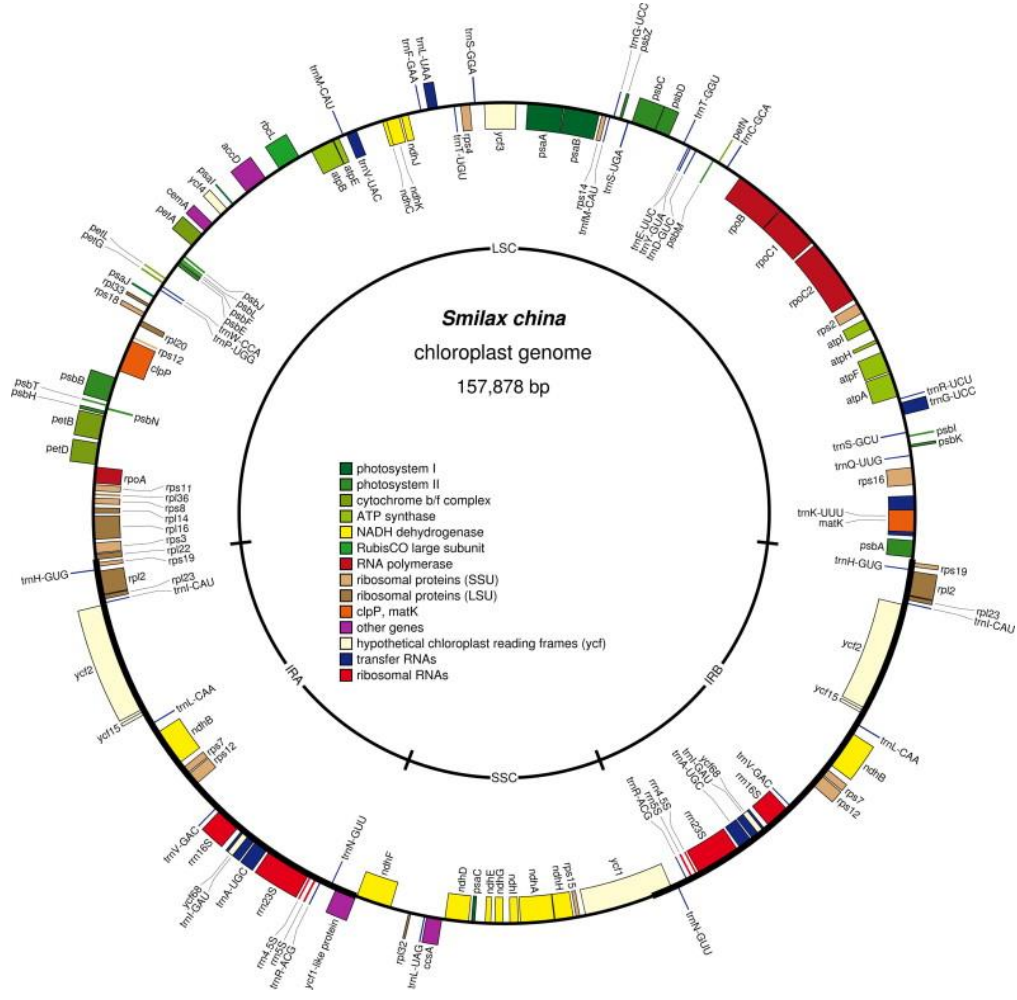
Kloroplast, bitkilerde fotosentezden sorumlu, yapı olarak prokaryotik hücre yapısına benzeyen bir organeldir. Kloroplast genomu; çift iplikli halkasal yapıda, yarı korunumlu ve kendine özgü protein sentezi yapılarına sahiptir (Şahin, 2011).

Kloroplast DNA'sı boyut olarak mitokondri DNA'sından daha büyüktür. Bu boyut farklılığı; kloroplastlarda mitokondrilere göre taşınan gen sayısının fazlalığı, genler arasında ve içinde oldukça uzun kodlama yapmayan nükleotid dizisini taşıması, DNA dizisindeki duplikasyonlu bölgeleri içermesi gibi özelliklerle açıklanabilir. Kloroplast genomu, nükleer genoma göre çok fazla kodlanmayan bölge içermediğinden daha



yavaş evrimleşir. Birçok türde genom birbirinden farklı kısa ve uzun dizi bölgeleri içerir ve bunlar bir çift ters tekrarlarla birbirinden ayrılmaktadır. (Makarevitch ve diğ., 2003).

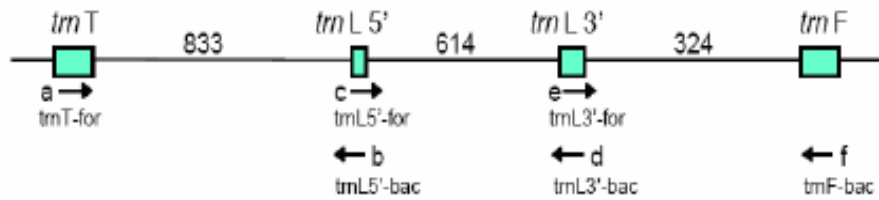
Kloroplast DNA'sının (cpDNA) kodladığı birçok gen ürünü organel içindeki protein sentezinde görev yapar. Bunun yanında düşük organizasyon seviyesindeki bitkilerden yüksek bitkilere kadar, kloroplast DNA'sı birbirinden farklı sayıda gen ürünlerini kodlayabilmektedir. Bu durum kloroplast içinde gelen bağımsız değişimin sonucudur. Kloroplast DNA'sı üzerinde bulunan genler, kloroplast ribozomlarında gerçekleşen protein sentezinin birçok ünitesinin sentezinden sorumludur. Kloroplasta ait ribozomların yapısı ve metabolik enzimleri de daha çok prokaryotlarinkine benzemektedir. Kloroplast ribozomal proteinlerinin çekirdek DNA'sı tarafından kodlanmasına karşın, bu proteinlerin çoğu sitoplazmik ribozomlarda bulunanlardan farklıdır (Sevindik, 2011). Kloroplast genomunda bulunan kodlama yapan bölgelerin arasında kalan, kodlama yapmayan bölgeler de nukleus genomunda olduğu gibi sistematik problemlerin çözümüne ışık tutmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6- Kloroplast genomu (www.sciencedirect.com).

Kloroplast genomu (cpDNA), haploid yapıda olması ve klonal evrimi nedeniyle markörlerin geliştirilmesi için iyi bir kaynaktır. Bitkilerde filogenetik ilişkilerin ortaya konmasında ve populasyon genetiği çalışmalarında son derece yaygın biçimde kullanılmaktadır. Kloroplast genomunda bulunan genlerin düzenlenişindeki korunmuşluk, filogenetik ve populasyon genetiği çalışmalarında kullanılabilir çok sayıda evrensel primerin tasarlanmasına olanak tanımıştır. Evolüsyoner süreçte cpDNA'nın kodlayıcı olmayan bölgeleri kodlayıcı dizilerden daha hızlı biçimde değişime uğramaktadır. Başka bir deyişle mutasyon frekansı kodlayıcı bölgelerden çok daha yüksektir. Bu bölgelerdeki insersiyon ve delesyon mutasyonlarının meydana gelme oranı birbirine yakın olduğundan nükleotid dizisinde hızlı bir değişim söz konusudur. (Curtis ve Clegg 1984; Wolfe ve diğ. 1987; Zurawski ve Clegg 1987;

Clegg ve Zurawski 1991). Düşük taksonomik düzeylerde, cpDNA'daki yüksek korunmuşluk gösteren bölgelere özgü primerlerin kullanımı ile bu bölgeler arasında kalan kodlama yapmayan bölgeler PZR ile çoğaltılıp analiz edilebilmektedir. *Nicotiana* L. (dikotil), *Oryza* L. (monokotil) ve *Marchantia* L. (kara yosunu)'nın cpDNA'sının tüm dizisi çıkarılmıştır ve çeşitli veribankalarında ulaşılabilir durumdadır. Bu durum bir çok farklı taksonomik gruptaki bitkiler için kullanılacak primerlerin tasarlanmasına olanak sağlamaktadır. Özellikle transfer RNA genleri (*trn*), cpDNA'sında çok sayıda bulunmaları (tütün cpDNA'sında 30 adet), tüm kloroplast genomuna yayılmış olmaları ve yüksek düzeyde korunmuşluk özellikleri sayesinde bu amaçla kullanılmaya son derece elverişlidir. Bunlardan biri olan cpDNA *trnT*-*F* bölgesi, ardı ardına dizilmiş ve kodlama yapmayan bölgelerle ayrılmış biçimde düzenlenim gösteren transfer RNA genlerinden [*trnT* (Treonin), *trnL* (Lösin) ve *trnF* (Feninalanin)] oluşmaktadır. Bu bölgeye ait, *trnL*-*trnF* bölgesi de tek kopyalı büyük bir bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.7). Genlerin yüksek düzeyde korunmuşluğu ve genlerin düzenlenimlerinde değişikliğin olmayışı evrensel primer tasarımını mümkün kılmaktadır (Taberlet ve diğ. 1991). Bu primerler ile gen içi ve genler arası bölgeler veya intronlar PZR ile çoğaltılmaktadır. Bu bölgelerde çeşitli mutasyonlar sonucu yüksek varyasyon meydana gelmesi nedeniyle, çoğaltılan PZR ürünlerinin nükleotid dizileri karşılaştırıldığında filogenetik akrabalıklar ortaya konabilmektedir. *trnL* intron ve *trnL*-*F* genler arası boşluk bölgelerinin karşılaştırılması, bitkilerde çok sayıda filogenetik analiz için yaygın biçimde kullanılan kloroplast markörü niteliğindedir (Quandt ve diğ., 2004).



Şekil 2.7- *trnT*-*trnF* bölgesine özgü primerler ile çoğaltılabilen DNA fragmentinin (a-b, a-d, c-d, c-f, e-f) şematik gösterimi (Taberlet ve diğ., 1991).

Tez projesi kapsamında kullanılan diğ er bir yöntem, bu bölgeleri hedef almaktadır. cpDNA'ya, özellikle *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizleri ile baz polimorfizmi belirlenir. Elde edilen polimorfik baz profilleri çeşitli filogenetik programlarla analiz edilir ve bu şekilde taksonlar arası filogenetik benzerlik saptanabilir (Klug ve diğ., 2009).

## 2.8 AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİ

### 2.8.1 Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, makromolekülleri büyüklük, elektrik yükü ve diğ er fiziksel özellikler temelinde ayıran bir yöntemdir. Bu yöntemde elektrik akımı varlığında hareketlenen negatif yüklü DNA/RNA jel boyunca pozitif yüklü elektrik alana doğru hareket etmektedir. Hedef bölgenin çoğaltılmasından sonra, elde edilen ürünlerin görüntülenmesi ve analizlerinin yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. Teknik basit, hızlı ve diğ er yöntemlerle ayrıştırılamayan DNA parçalarını çözebilme yeteneğindedir. DNA agaroz jelde, düşük konsantrasyonlarda etidyum bromid ile boyanarak ultraviyole ışık altında görüntülenebilmektedir (Şahin, 2011). Agaroz jel elektroforezi aşamaları Şekil 2.8'de görülmektedir.

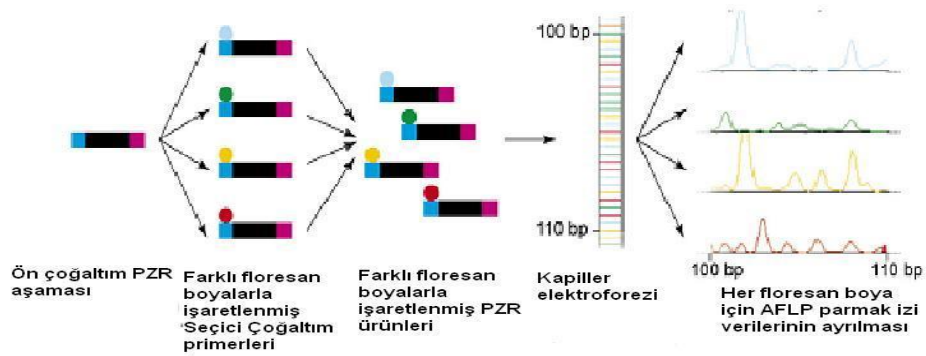


Şekil 2.8- Agaroz Jel Elektroforezi

### 2.8.2 Kapiler Jel Elektroforezi ve Floresan Temelli Görüntüleme

PZR'la çoğaltılan DNA fragmentlerinin ayrımı ve analizinde hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi nedeniyle kapiler jel elektroforez sistemi son yıllarda

yaygın olarak kullanılmaktadır. Kapiler jel elektroforezi, kapiler elektroforez ve klasik jel elektroforez yöntemlerinin kombine edildiği; daha detaylı analizler için sunduğu üstünlükler nedeniyle tercih edilen bir tekniktir. Teknik; 75 µm çapındaki kapilerin, polimerik kimyasallar ile doldurularak yüksek elektrik akımı varlığında oligonükleotidlerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayarak oligonükleotidlerin kalite ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. Özellikle farklı genomlardaki dizi değişiklikleri tek baz değişikliğinden kaynaklandığı için mutasyonları ve polimorfizmi belirlemede yüksek ayırım yapabilme kapasitesi ile teknik hassas ve güvenilir sonuçlar ortaya koymaktadır. Genetik analiz cihazları tam otomatik, yüksek performanslı, floresan tabanlı ve çoklu kapiler kanallara sahip kapiler jel elektroforez sistemleridir. 8-16 kapiler bulunabilen cihazlarda elektroforez işlemi her kapilerde aynı anda yapıldığı için, örnekler eş zamanlı olarak ayrıştırılabilmektedir. Çok sayıda kuyucuk bulunan plaklar kullanılarak fazla sayıda örnek ile çalışmak mümkündür. Ayrılan DNA fragmentlerinin belirlenmesinde “Lazerle Uyarılmış Floresan Dedektörleri” kullanıldığı için fragmentlerin floresan işaret taşıması gerekmektedir. Bu durum bu tez çalışmasında da uygulandığı gibi AFLP tekniğinin seçici çoğaltım PZR aşamasında floresan özellikte kimyasallarla işaretlenmiş primerler kullanılarak sağlanır (Şekil 2.9). Analiz ise dışarıdan müdahaleye gerek kalmadan tamamen otomatik olarak gerçekleştirilir. Ayrıca cihazın yazılım programı, kullandığı ileri algoritmalar sayesinde PZR sırasında kullanılan kimyasalların yol açtığı kirlenmeleri de tespit edip temizleme olanağı sunmaktadır. Böylece bu sistemler ile son derece hassas (1-2 baz fark) ve güvenilir sonuçlar elde edilerek, çok sayıda örnek kısa zaman da analiz edilebilmektedir (Hasançebi, 2009).



Şekil 2.9- AFLP analizlerinde floresan görüntülemenin şematize edilmesi.

## 2.9 DNA DİZİ ANALİZİ

DNA, uzunluğu 2 m'ye genişliği  $10^{-7}$  cm' ye kadar değişkenlik gösterebilen bir makro moleküldür. Bu molekül çeşitli canlılarda sırası ve sayısı farklı olmakla birlikte dört farklı bazdan meydana gelen bir omurga üzerinde kuruludur. DNA dizi analizi herhangi bir DNA parçasında bulunan A,C,G,T nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanabilmektedir. Moleküler biyolojik çalışmalar sırasında bir DNA parçasına ait nükleotidlerin sıralarının belirlenmesi ile;

- DNA bölgesinin hangi proteini kodlayabileceğine ilişkin bilgi elde edilebilmektedir.
- Genomik DNA dizisi ile tamamlayıcı DNA'ya ait dizi bilgileri karşılaştırılarak ekson ve intron yapılarının ortaya çıkarılması mümkün olabilmektedir.
- DNA dizi analizi ile gen aktivitesini kontrol eden bölgeler tanımlanabilmektedir.
- Bir organizmaya ait genom dizisi ile o organizmaya ait gen dizileri tespit edilebilmektedir.
- Spesifik genlere ait DNA dizilerinin belirlenmesi ile ilgili genlere ait evrimsel akrabalık ilişkileri farklı canlı grupları ile karşılaştırılarak tanımlanabilmektedir (Ülger, 2007).

DNA dizi analizi yöntemleri temelde aynı amaca hizmet eden 2 farklı gruba ayrılmıştır. Bu yöntemlerden ilki parçalı kesim reaksiyonu olarak da bilinen "Maxam/Gilbert"dir. "Sanger" ya da "Dideoxy" yöntemi ise DNA üzerinde dizi sonlandırma temeline dayanan bir yöntemdir.

Enzimatik DNA dizi analizi yöntemi olarak da adlandırılan Maxam/Gilbert yönteminde DNA molekülü üzerindeki farklı bazlar arasındaki bağların koparılması ile meydana gelen farklı boyutlardaki DNA moleküllerinin ayrımı gerçekleştirilmektedir (Maxam ve

Gilbert, 1977). Bu yöntem; günümüzde kullanılan otomatik dizileme sistemlerinde ve manual olarak gerçekleştirilen dizileme reaksiyonlarında kullanılmamaktadır.

Sanger yöntemi 1975 ve 1980 yıllarında DNA dizi analizi çalışmaları ile kendisine iki kez Nobel ödülü kazandıran Frederick Sanger tarafından geliştirilen dizi sonlandırma metodudur. Bu metoda göre dizilenmesi istenen DNA parçası çoğaltılırken ortamda bulunan dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP) ile normal hidrosil grubuna sahip deoksinükleotidtrifosfatlar (dNTP) arasında DNA'ya bağlanmak için rekabet gerçekleşmektedir. ddNTP'ler DNA molekülüne normal dNTP'lere oranla daha kolay bağlanabilmektedir. Böylelikle floresan ya da radyoaktif olarak işaretlenmiş olan farklı karakterdeki nükleotidler ve diğer reaksiyon bileşenleri kullanılarak PZR gerçekleştirilir. DNA'nın tamamlayıcı molekülünün sentezi sırasında boyutları birbirinden farklı çok sayıda DNA molekülü oluşmaktadır. Meydana gelen bu ürünler ayırım gücü yüksek poliakrilamid jeller kullanılarak boyutlarına göre ayrılabilir (Sanger ve Coulson, 1977; Ülger, 2007).

### **2.9.1 Floresan Temelli Otomatik Dizi Analiz Sistemleri**

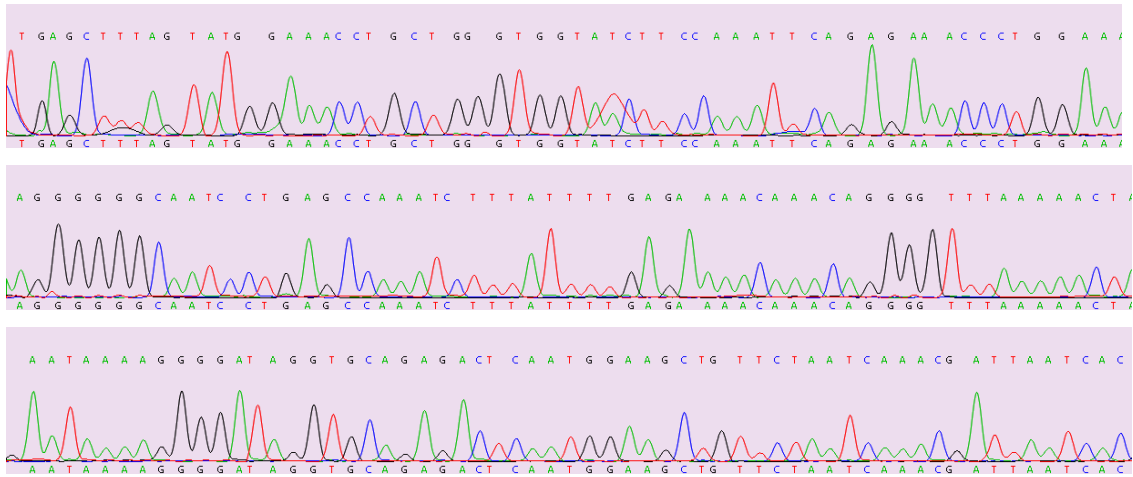
Floresan boya ve lazer teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, 1986 yılında Smith ve diğ. tarafından geliştirilen yöntemle dizi analizi yeni bir boyut kazanmıştır. Dört farklı floresan boya işaretli primerler dört ayrı reaksiyon olarak ele alınır ve her tüpe dideoksinükleotidlerden biri ve diğer bütün deoksinükleotidler eklenerek reaksiyon gerçekleştirilir. Reaksiyon bitiminde dört reaksiyon bir tüpte toplanır ve poliakrilamid sekans jelindeki tek bir kuyuya yüklenir. Örnek, jel boyunca yürürken dört-renkli lazerin uyarılmasıyla ortaya çıkan sinyaller dedektör ile tespit edilip bilgisayara aktarılarak analiz edilir (Türktaş, 2011).

Benzer bir teknoloji 1990'larda daha da geliştirilmiş olarak ortaya çıkmıştır ve bu kez kullanılan primer yerine floresan işaretli dideoksinükleotidler kullanılmaya başlanmış ve artık reaksiyon tek bir tüp içinde yapılabilir hale getirilmiştir. Sonraki yıllarda bu teknoloji kapiller elektroforez tekniğiyle birleştirilerek günümüzde de kullanılan halini almaya başlamıştır. Bu şekilde yaklaşık 50 µm çapındaki kapiller içerisine uygulanan jel içinde yürütme işlemi yapılırken çok daha yüksek voltajlar uygulanarak reaksiyon süresi de kısaltılabilmektedir. Bu sistemde ayrılan bantlar optik pencereden geçerken

lazerle uyarılır ve bu sinyal dedektör tarafından toplanarak bilgisayara gönderilir. Burada emisyon dalga boyları bir nükleotidi işaret edecek şekilde analiz edilerek sonuçlar kromatogram şeklinde ifade edilir (Şekil 2.10 ve Şekil 2.11) (Türktaş, 2011; www.beckmancoulter.com).



Şekil 2.10- GeXP Genetik Analiz Sistemi.



Şekil 2.11- DNA dizilemesi sonucu oluşan piklerin görüntüsü.

DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Virüslerin tüm genomları, *E. coli* ve maya gibi birçok organizmanın genomları aydınlatılmıştır (Türktaş, 2011).



Tüm analizler sonucunda elde edilen veriler Genome Lab GeXP Genetik Analiz Sistemi, Phylip v.3.69, MEGA 5.05, BioEdit, ve DNA Baser gibi biyoinformatik programları kullanılarak skorlama, kontrol ve düzenlemeleri yapılacak ve yine programlar yardımıyla filogenetik ağaçlar (dendogram) çıkarılmıştır.

## **2.10 FİLOGENETİK AĞAÇ VE AĞAÇ OLUŞTURULMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER**

Çeşitli organizma taksonları arasındaki evrimsel ilişkinin araştırılmasına filogenetik denir. Bu ilişkiler ve organizmanın köken tarihi filogeni olarak adlandırılır. Başka bir deyişle filogeni, bir organizma grubunun veya taksonomik kategorinin, ilk ortaya çıkışından ya da özgünlüğünü kazandıktan, bulunduğu zamana veya ölümüne (özgünlüğünü kaybettiği hal değişimine) kadar ki gerçek hayat hikayesidir. Filogenetik analiz ise türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla; mevcut karakterlerin değişik kriterler kullanılarak değerlendirilmesi sonucu, soy ağaçlarının oluşturulması ile gerçekleştirilir. Oluşturulan bu soy ağaçları bir grubun evrimsel tarihinin grafiksel özeti olup, filogenetik ağaç olarak adlandırılır (Sevindik, 2011).

Filogenetik ağaç; takson ve türler arasındaki dallanma olaylarının nasıl, bazı durumlarda ise ne zaman gerçekleştiğini modeller. Taksonların birbirine akrabalık derecelerini gösterir. Dallar ve düğümlerden oluşur. Filogenetik bir ağaçta; dallar, türler arasındaki popülasyonun zaman içerisindeki uyumunu gösterir. Ağaçlardaki dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin (basamakların) sayısını belirler. Düğümler ise; bir popülasyon ya da taksonun, iki veya daha fazla türev popülasyon ya da taksona ayrıldığı noktalarıdır. Filogenetik ağaçlar köklü veya köksüz olabilir. Köklü ağaçlarda soy hattının nereden kökenlendiği bilindiği için ayrılma olayının belirlenmesi yapılabilir. Köksüz ağaçlarda ise buna karşın türlerin önce ya da sonra açığa çıktığı belirtilmez (Tez, 2011).

Filogenetik ağaç oluşturulurken genellikle üç yöntem kullanılır. Bu yöntemlerden ikisi karakter temelli yöntemler olarak bir başlık altında toplanabilen Maksimum parsimoni ve Maksimum Benzerlik yöntemleridir. Diğerisi ise uzaklığa dayalı bir yöntemdir.

### 2.10.1 MP (Maximum Parsimony) Farklılıkları En Aza İndirme Yöntemi

Parsimoni, bir gözlemin en az karmaşık olarak açıklanması şeklinde tanımlanır. İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan yöntemdir. İki birim arasında en az değişiklik gerektiren ağaç en makul olan ağaçtır. Yani en az farklı olan birimler, birbirine en yakın ve benzeyen birimlerdir. Ağacın belirlenmesinde işlemin daha kısa zamanda tamamlanması için en zengin filogenetik bilgiye sahip olan az sayıdaki bölgeler kullanılır. Diğer bir anlamda da tutumluluk olarak tanımlanabilmektedir.

MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır. MP ile ağaçların oluşturulmasında ‘kesin’ ve ‘tahmini’ yaklaşımlar sözkonusu olmaktadır. Kesin yaklaşımda olası tüm ağaçlar gözden geçirilir ve kullanılan ölçüte en uygun ağaç belirlenir. Çok zaman alıcıdır ve yirmiden fazla örnekleme varlığında uygun değildir. Çok sayıda dizinin bulunduğu durumlarda ‘tahmini’ yaklaşım uygulanmaktadır (Mount, 2001).

Maksimum parsimoni yönteminin olumsuzlukları;

- Yüksek seviye homoplasilerde yanılabilirler.
- İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir.
- MP analizi ile en iyi sonuçlar dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır (Mount, 2001).

### 2.10.2 ML (Maximum Likelihood) En Yüksek İhtimal Yöntemi

En yüksek ihtimal yönteminde, tüm ağaç topolojileri değerlendirilir. Birbiri ile yarışan ağaç topolojilerinden en yüksek gerçekleşme olasılığı olan ağaç seçilir.

Maximum Likelihood yönteminin üstünlükleri;

- Karakter ve oran analizlerinde kullanılabilir.

- Sönmüş (hipotetik) ataların dizilerini tahmin etmede kullanılabilir.
- Nükleotid, aminoasit dizileri ve diğer veri tiplerine uygulanabilir.

Bütün bu üstünlüklerinin yanında Maximum Likelihood yöntemi, basit ve sezgisel olmayışı, parsimonide olduğu gibi yüksek seviye homoplasilerde yanılabilmesi ve parsimoni metoduna göre daha yavaş olması gibi dezavantajlara sahiptir (Freeman ve Herron, 2009).

### **2.10.3 Uzaklık (Distance) Yöntemi**

Genetik uzaklık yöntemi filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Uzaklık yöntemi ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir. Tercih edilen ağaçlar, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçlardır (Sevindik, 2011).

En çok kullanılan uzaklık yöntemlerinden bazıları “Neighbour joining” ve “UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages)” yöntemleridir.

#### *2.10.3.1 Neighbour Joining Komşu Birleştirme Yöntemi*

Bu yöntem içerik olarak “kümelenme (cluster)” analizi ile ilişkilidir. Taksonların kökten eşit uzaklıkta olduğu varsayılmaz. Analizin her adımında uzaklık matrisi, düğümlerin her çifti arasında ayarlanan dal uzunluklarının net etkisine sahiptir. Bunun anlamı; tüm diğer düğümlerden farklıdır. Bu yöntemde bir tane ağaç oluşturulur ve geniş veri kümelerinin analizi yapılabilir. Fakat tüm olası ağaç topolojileri değerlendirilemez (Mount, 2001).

#### *2.10.3.2 UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Yöntemi*

Bir takson için uzaklık matrisi gözden geçirilirken, en küçük uzaklık matrisi baz alınır. Geniş veri setleri bu yöntemle hızlı bir şekilde analiz edilebilir, fakat karakter analizinde kullanılamazlar. Bir atanın iki yavrusunun aynı miktarda değişime uğradığının (dalların eşit uzunlukta olduğunun) savunulması gerçekçi değildir (Mount, 2001).

#### **2.10.4 Bootstrap (Seç-Bağla) Analizi**

Bootstrap (seç-bağla analizi) ağaçların güvenilirlik derecelerini istatistiksel olarak değerlendirmeye yarayan bir parametredir. Elde edilen ağaçların dallarının tutumluluk kriterlerini kullanarak, istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılır. Burada veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturulur. Bu işlem, seçilen bootstrap değerine göre tekrarlanmak suretiyle , ağaçtaki dalın çıkma yüzdesi hesaplanabilir. Bu da veri setindeki filogeniyi hesaplamak için kullanılabilir. Bootstrap değeri % 0 ile % 100 arasında değişir (Tez, 2011).

### **2.11 FİLOGENETİK AĞAÇ OLUŞTURMADA KULLANILAN PROGRAMLAR**

Filogenetik ağaçların eldesinde bu tez çalışması kapsamında kullanılan programlar aşağıda belirtilmiştir.

PHYLIP: Filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılan bir programlar paketidir. İnternette erişimi ücretsizdir. Paket kapsamında parsimoni, uzaklık matrisi ve olasılık metotlarının yanı sıra seç-bağla (bootstrapping) ve ortak karar (consensus) ağaçları mevcuttur.

Treeview: PHYLIP ve NTSYSpc gibi filogenetik programlarından elde edilen ağaçların bilgisayarda görüntülenebilmesini sağlayan bir programdır.

MEGA: DNA dizilerini üst üste getirerek hizalamak, karşılaştırmak ve mevcut metodlara göre filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılan bir programdır. İnternette ücretsiz olarak erişilebilir.

DNA Baser: Dizi analizi sonucu elde edilen kromatogramları inceleyebilmeye, birbirinin tamamlayıcısı olan dizileri birleştirip işleyerek ortak bir dizi elde etmeye yarayan bir programdır.

Phytols: AFLP analizlerinden elde edilen 1-0 verisi kullanılarak; Neighbour Joining ağacı elde etmek için gerekli uzaklık matriksinin hazırlanmasında kullanılan bir programdır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1 BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada kullanılan doğal seleksiyon ile oluşan 14 adet *Iris* L. türü ve melezleme ıslahı ile elde edilmiş 11 adet *Iris* L. çeşit adayı Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Yalova Atatürk Bahçe Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1- Bitki örneklerinin alındığı Yalova Atatürk Bahçe Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Seraları.

Bu tez çalışmasının deneysel kısmı TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Gen Teknolojileri Laboratuvarının olanaklarından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan, doğal seleksiyon ile oluşan 14 adet *Iris* L. türünün fotoğrafları Şekil 3.2-15'te görülmektedir.



Şekil 3.2- ICA 1 - *Iris reticulata*



Şekil 3.3- ICA 2 - *Iris histrio*



Şekil 3.4- ICA 3 - *Iris iberica subsp. elegantissima*



Şekil3.5 - ICA 4 - *Iris kirkwoodii*



Şekil 3.6- ICA 5 - *Iris sari*



Şekil 3.7- ICA 6 - *Iris Xanthospuria*



Şekil 3.8- ICA 7 -*Iris lazica*



Şekil 3.9- ICA 8- *Iris barnumae f. barnumae*



Şekil 3.10- ICA 9-*Iris barnumae f. urumiensis*



Şekil 3.11- ICA 16 – *Iris sintenisii*



Şekil 3.12- ICA 17 - *Iris stenophylla*



Şekil 3.13- ICA 18 - *Iris suaveolens*





Şekil 3.14- ICA 23 - *Iris purpureobracteata*  
(Kolşisin Mutantı)



Şekil 3.15- ICA 25 - *Iris sari* (Doğal melez)

Materyalin toplanması sırasında, DNA izolasyonu için uygun olan bitkinin genç yaprakları tercih edilmiştir. Kesilen yapraklar alkol ile temizlendikten sonra alüminyum folyolara sarılarak sıvı azotla (-196°C) dondurulmuş. Derin dondurucuya (-80°C) kadar sıvı azot (-196°C) içinde muhafaza edilerek taşınmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan bitki materyali ile ilgili bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

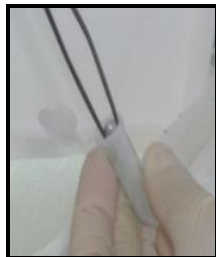
Tablo 3.1- Tez çalışması kapsamında incelenen bitki materyalleri

Örnek adı	Endemik türler	Yerel Adı	Erişim Kodu	Toplayıcı Kodu	Toplayan Kişi	Toplandığı/Mezlelendiği Lokasyon
<i>Iris reticulata</i> Bieb	*		JQ413995	ICA1	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Şanlıurfa-</b> Siverek, Karabahçe, Bahadır yaylası ve kayak tesisleri yolu Rame deresi
<i>Iris histrio</i> Reichb	*		JQ413996	ICA 2	Kamil Erken Erken/Serdar	<b>Hatay-</b> Yayladağ yolu Kışlak beldesi Örenseki mevkii
<i>Iris iberica</i> Hoffm. subsp. <i>elegantissima</i> (Sosn.) Takht. et Fedorov		Alaca Süsen	JQ413997	ICA 3	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Van-</b> Muradiye, Muradiye şelalesi çevresi
<i>Iris kirkwoodii</i> Chaudhary		Maraş Kurtkulağı	JQ413998	ICA 4	Kamil Erken Erken/Serdar	<b>Kahramanmaraş-</b> Ahır dağı gölünün üst yamaçları
<i>Iris sari</i> Schott ex Baker	*	Anadolu Kurtkulağı	JQ413999	ICA 5	Kamil Erken Erken/Serdar	<b>Gaziantep-</b> Dülükbaşa mesire ormanı, en yüksek tepe tv ve telefon vericisinin civarı
<i>Iris xanthospuria</i> B. Mathew et T. Baytop	*	Sarı Süsen	JQ414000	ICA 6	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Muğla-</b> Ula Kızılyaka köyü Yeşilçam mevkii
<i>Iris lazica</i> Albov		Laz Süseni	JQ414001	ICA 7	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Rize-</b> İkizdere, Güneyce Köyü çıkışı 2. km sol taraftaki meşelik
<i>Iris barnumae</i> Baker et Foster f. <i>barnumae</i>		Van Kurtkulağı	JQ414002	ICA 8	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Van-</b> Muradiye yolu 35. km solda kum ocağına giden yol boyu
<i>Iris barnumae</i> Baker et Foster f. <i>urmiensis</i> (Hoog) Mathew & Wendelbo		Sarı Van Kurtkulağı	JQ414003	ICA 9	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Van-</b> Hoşap-Başkale Albayraklar köyü
<i>Iris germanica</i> L. x <i>Iris albicans</i> Lange			KC256788	ICA 10	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kültürleri Enstitüsü
<i>Iris germanica</i> L. x <i>Iris schachtii</i> Markgraf			KC256789	ICA 11	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kültürleri Enstitüsü
<i>Iris germanica</i> L. x <i>Iris schachtii</i> Markgraf			KC256790	ICA 12	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kültürleri Enstitüsü
<i>Iris sari</i> Schott ex Baker x <i>Iris schachtii</i> Markgraf			KC256791	ICA 14	Erdal Erken Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kültürleri Enstitüsü

<i>Iris sari</i> Schott ex Baker x <i>Iris schachtii</i> Markgraf			KC256792	ICA 15	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris sintenisii</i> Janka		Çatal Süsen	KC256793	ICA 16	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>İstanbul-</b> Durusu(Terkos) Terkos gölü ile deniz arası yangın kulesi civarı
<i>Iris stenophylla</i> Hausskn. et Siehe ex Baker	*	Gök Navruz	KC256794	ICA 17	Kamil Erken	Erken/Serdar	<b>Mersin-</b> Fındıkpınar köyü, Elektrik trafosunun olduğu kayalık tepecik
<i>Iris suaveolens</i> Boiss. et Reuter		Bodur Süsen	KC256795	ICA 18	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Çanakkale-</b> Eceabat, Anzak koyu, Arıburnu- Azmak deresi arasında kumullar
<i>Iris germanica</i> L. x <i>Iris schachtii</i> Markgraf			KC256796	ICA 19	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris purpleobracteata</i> B. Mathew et T. Baytop x <i>Iris schachtii</i> Markgraf			KC256797	ICA 20	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris germanica</i> L. x <i>Iris albicans</i> Lange			KC256798	ICA 21	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris germanica</i> L. x <i>Iris albicans</i> Lange			KC256799	ICA 22	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris purpleobracteata</i> B. Mathew et T. Baytop (Kolşisin Mutantı)			KC256800	ICA 23	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris sari</i> Schott ex Baker x <i>Iris albicans</i> Lange			KC256801	ICA 24	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris germanica</i> L. x <i>Iris schachtii</i> Markgraf			KC256802	ICA 25	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Yalova-</b> Atatürk Bahçe Kùltürleri Enstitüsü
<i>Iris sari</i> Schott ex Baker (Doğal Melez)			KC256803	ICA 26	Erdal Erken	Kaya/Kamil	<b>Ankara-</b> Çubuk I barajı, Alman tepesi, Baraja bakan yamaçlar

### 3.2 DNA İZOLASYONU

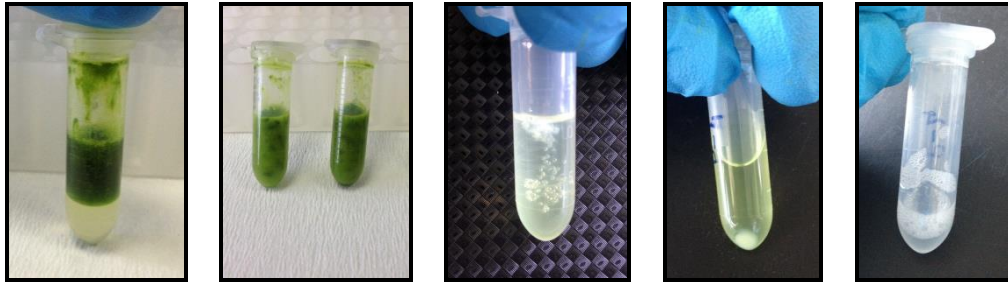
Genomik DNA izolasyonu, süsen (*Iris L.*) bitkisinin yaprakları kullanılarak Doyle ve Doyle'nin (1987) geliştirdiği CTAB izolasyon protokolüne göre gerçekleştirildi. *Iris reticulata*, *Iris histrio*, *Iris iberica* subsp. *elegantissima*, *Iris kirkwoodii*, *Iris sari*, *Iris xanthosporia*, *Iris lazica*, *Iris barnumae* f. *barnumae*, *Iris barnumae* f. *urmiensis*, *Iris sintenisii*, *Iris stenophylla*, *Iris suaveolens*, *Iris germanica* x *Iris albicans*, *Iris germanica* x *Iris schachtii*, *Iris sari* x *Iris schachtii*, *Iris germanica* x *Iris schachtii*, *Iris purpureobracteata* x *Iris schachtii*, *Iris germanica* x *Iris albicans*, *Iris sari* x *Iris albicans*, *Iris germanica* x *Iris schachtii*, *Iris purpureobracteata* (Kolşisin Mutant), *Iris sari* (Doğal Melez) genotiplerine ait yaklaşık 100 mg yaprak dokusu sıvı azot içinde dondurulduktan sonra metal bilyeler eklenerek "Retsh MM 301" model homojenizatör cihazında, 2 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde toz haline getirildi (3.16). Her bir örneğin üzerine 450 µl CTAB (60°C) çözeltisi ve 6 mg toz PVP (Polivinilpoliprolidone polyvinylpyrrolidone) eklenerek iyice karıştırıldı, 60°C'de 25 dk inkübe edildi. Sürenin sonunda örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. 450 µl kloroform:oktanol karışıma eklendi. 20-25 kez alt-üst edilerek karıştırıldı. 13000 rpm'de oda sıcaklığında (20°C) 15 dk santrifüj edildi. Üst faz temiz bir tüpe alındı. Üst fazın temiz olmadığı durumlarda bu aşama tekrar edildi. Toplanan üst fazın üzerine (350 µl), 5M NaCl'den 175 µl (üst fazın 0.5 hacim oranında), 700 µl % 95'lik etanol (üst fazın 2 hacim oranında) eklenip 4-6°C'de 15-20 dk genomik DNA'nın çökmesi sağlandı (Tablo 3.2). DNA örnekleri 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek toplandıktan sonra %75'lik etanol ile yıkama aşaması gerçekleştirildi. Örnekler 13000 rpm'de 5 dk daha santrifüj edildi ve ardından kurumaya bırakıldı. DNA örnekleri yoğunluklarına göre 200-250 µl nükleazdan arındırılmış distile H<sub>2</sub>O'da çözdürüldü. 2 µl 2U RNaz (RNase ONE Ribonuclease M4261 Promega) eklenip, 37°C'de yarım saat inkübe edildi (Şekil 3.17).



Şekil 3.16- Bitki örneklerinin “Retsh MM 301” model homojenizatör cihazı ile parçalanması.

Tablo 3.2- DNA izolasyonunda kullanılacak stok çözeltiler.

Çözeltinin Adı	İçeriği	Konsantrasyonu
CTAB izolasyon tamponu	Tris-HCl (pH:8.0) EDTA (pH:8.0) NaCl CTAB(cetyltrimethylammoniumbromide) β-merkaptoetanol (kullanmadan hemen önce eklenir)	100 mM 20 mM 1,4 M % 2 % 0.2
Kloroform:oktanol	Kloroform Oktanol	24:1
Sodyum klorür	NaCl	5M



Şekil 3.17- DNA izolasyonunun çeşitli aşamalarında örneklerin durumu.

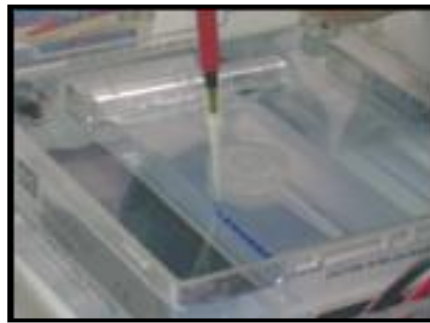
DNA konsantrasyonu Nanodrop (ND1000) spektrofotometre kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçüldü. DNA örnekleri PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere 50 ng/μl ve 100 ng/μl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra kalan örnekler stok olarak -20°C’de, sulandırılmış örnekler ise +4°C’de saklandı.

“NanoDrop” kullanılarak yapılan ölçümde DNA veya RNA örneği cihazın kaidesine bir damla halinde yüklenir. Daha sonra bu aparat kapatılarak bir damla halinde bulunan örneğe cihaz tarafından hafif bir baskı uygulanır. Oluşan bu yüzey gerilimi ile örneğin yerinde kalması sağlanır ve örnek spektrofotometrik olarak okunur. Cihaza bağlı bir bilgisayar programı ile değerler elde edilir (Şekil 3.18). Ancak ölçümden sonra DNA kalitesi agaroz jelde kontrol edilmelidir.



Şekil 3.18- NanoDrop (ND1000) ile DNA'nın konsantrasyonunun belirlenmesi.

İzolasyon sonrası örnekler kontrol amaçlı stoktan 2  $\mu$ l'si 1/10 sulandırılarak %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü. Bunun için 0.5 X TBE çözeltisi kullanılarak hazırlanan %0.8'lik agaroz mikrodalga fırında eritildi. Oda sıcaklığına gelen jele 5  $\mu$ l etidyum bromid (10mg/ml) çözeltisi eklenip karıştırıldıktan sonra yatay elektroforez kasetine döküldü. Elektroforez kaseti jelin polimerize olması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve 0.5 X TBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Örnekler 2.5  $\mu$ l yükleme tamponu ile karıştırılarak jel kuyularına yüklendi (Tablo 3.3). Jel, örneklerin kuyucuklardan çıkması amacıyla 200 Volt'ta yaklaşık 1 saat yürütülüp UV ışık altında incelendi. "DNr Bio-Imaging System MiniBIS Pro" görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekildi (Şekil 3.19).



Şekil 3.19- İzolasyonu yapılan DNA'nın agaroz jele yüklenmesi ve kullanılan görüntüleme cihazı (DNr Bio-Imaging System MiniBIS Pro).

Tablo 3.3- Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti Adı	İçeriği	Konsantrasyon
TBE Tamponu (10X)	Trisma Base EDTA Borik Asit	890 mM 20 mM 890 mM
Yükleme Tamponu (6X)	Bromofenol mavisi Sukroz	% 0.25 (w/v) % 40 (w/v)
Etidyum Bromür	Etidyum bromür	10 mg /ml

### 3.3 AFLP ANALİZLERİ

14 adet doğal seleksiyon ile oluşan *Iris L.* türleri ve 11 adet melezleme ıslahı ile elde edilmiş melez *Iris L.* çeşit adayları kullanılarak yapılan AFLP analizleri Pharmawati ve diğ. (2005) protokollerine göre gerçekleştirildi. Analizlerde, AFLP çalışmaları için belirlenen 7 farklı primer kombinasyonu kullanıldı. Tablo 3.4 verilen *MseI* ve *EcoRI* adaptör çiftleri (alt ve üst) konsantrasyonları 100  $\mu$ M karıştırılıp, 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından alt ve üst adaptörlerin çift iplikli hale gelebilmesi için tüpler oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutma sonrası, adaptörlerin çalışma konsantrasyonları *MseI* adaptörü için 50 pmol/ $\mu$ l, *EcoRI* adaptörü için 5 pmol/ $\mu$ l olacak şekilde sulandırıldı.

Tablo 3.4- *EcoRI* ve *MseI* restriksiyon endonükleazlarına özgün adaptör dizileri.

Adaptör Dizisi	Dizi (5'-3')
<i>EcoRI</i> (Üst adaptör dizisi)	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoRI</i> (Alt adaptör dizisi)	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>MseI</i> (Üst adaptör dizisi)	GACGAGAGTCCTGAG
<i>MseI</i> (Alt adaptör dizisi)	TACTCAGGACTCAT

Genomik DNA örnekleri için restriksiyon ve ligasyon işlemi bir arada gerçekleştirildi. Genomik DNA'nın kesimi *EcoRI* ve *MseI* restriksiyon endonükleazları kullanılarak gerçekleştirildi. DNA üzerinde *MseI* enzimi dört bazda bir, *EcoRI* enzimi ise altı bazda bir kesim yapmaktadır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5- *EcoRI* ve *MseI* restriksiyon endonükleazlarının çift iplikli DNA'yı kestiği bölgeler.

<i>EcoRI</i> enziminin kesim bölgesi	<i>MseI</i> enziminin kesim bölgesi
5'-G ^ A A T T C-3'	5'-T ^ T A A-3'
3'-C T T A A ^G-5'	3'-A A T ^ T-5'

Restriksiyon ve ligasyon reaksiyonu için önce, Tablo 3.6'da bileşenleri verilen enzim karışımı hazırlandı. Hazırlanan enzim karışımının 1-2 saat içinde kullanılması gerekmektedir.

Tablo 3.6- Restriksiyon ve ligasyon reaksiyonunda kullanılan enzim karışımının bileşenleri.

Bileşenler	Miktar/10 örnek için
10X Reaksiyon tamponu (ATP içeren T4 DNA Ligaz Tamponu) (her iki enzimin ortak tamponu)	1 µl
0.5 M NaCl	1 µl
1 mg/mL BSA (10 mg/mL'lik stoktan seyreltilmiş)	0.5 µl
<i>EcoRI</i> (5U)	5 µl
<i>MseI</i> (10U)	1 µl
T4 DNA Ligaz (10U)	2 µl

Restriksiyon-ligasyon reaksiyon bileşenleri Tablo 3.7'de verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.7- Restriksiyon ve ligasyon reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
10X Reaksiyon tamponu (ATP içeren T4 DNA Ligaz Tamponu)	1 µl
0.5 M NaCl	1 µl
1 mg/mL BSA (10 mg/mL'lik stoktan seyreltilmiş)	0.5 µl
<i>EcoRI</i> Adaptörü (5 pmol/µl)	1 µl
<i>MseI</i> Adaptörü (50 pmol/µl)	1 µl
Enzim karışımı (Tablo 4)	1 µl



Her örnek için, tüplere Tablo 3.7’de belirtilen karışımdan 5.5 µl dağıtıldı. Bu karışıma önceden DNA miktarları 100 ng/µl olacak şekilde sulandırılmış örneklerden 5 µl genomik DNA eklenip hafifçe karıştırılarak ardından 10 sn santrifüj edildi. Bu karışım 37°C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası restriksiyon-ligasyon örnekleri, PZR reaksiyonlarında kullanılmak amacıyla 189 µl TE<sub>0.1</sub> (20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) ile seyreltildi. Bu karışım (Dig-lig) ön çoğaltım PZR’ında kullanılmak üzere 2-6 °C arası 1 ay, -20 °C’de ise uzun süre saklanabilir.

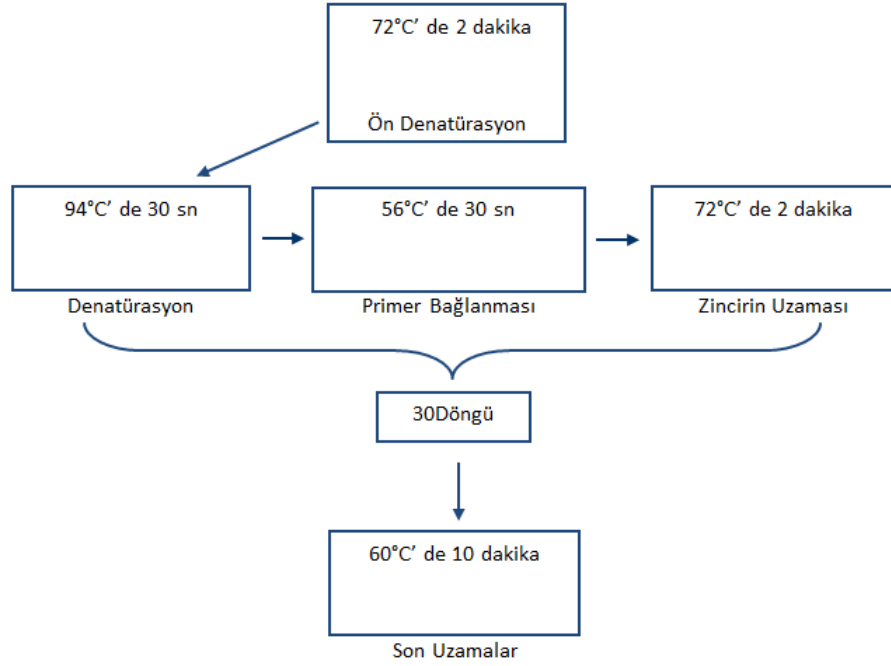
AFLP yönteminin ilk PZR aşaması olan ön çoğaltım PZR’ında, adaptör dizileri ile eşleşen fakat ilave 1 seçici baz içeren primerler kullanıldı. Ön çoğaltım primerlerinde herhangi bir baz seçici baz olarak kullanılabilir. Ön çoğaltım PZR’inde *EcoRI* primerlerine ilave baz olarak A bazı (*EcoRI*+1A) ve *MseI* primerlerine ise C bazı eklenmiş (*MseI*+1C) primerler kullanıldı (Tablo 3.8).

Tablo 3.8- AFLP analizlerinde ön çoğaltım PZR aşamasında kullanılan primerler.

Primer Adı	Dizi (5’-3’)
<i>EcoR</i> I ön çoğaltım primeri	GACTGCGTACCAATTCA
<i>Mse</i> I ön çoğaltım primeri	GATGAGTCCTGAGTAAC

Ön çoğaltım PZR uygulamasında her örnek için 0.2 ml’lik tüplerdeki 25 µl içerisinde son konsantrasyon; 1 X Taq Buffer (Invitrogen, Brazil), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brazil), 0.12 mM dNTP (Invitrogen, Brazil), 0.25 U/µl Taq polimeraz, 0.2 µM primer *Mse*-C, 0.2 µM primer *Eco*-A ve 100 ng genomik DNA şeklindedir.

AFLP analizlerinde ön çoğaltım reaksiyonu için kullanılan PZR programı; başlangıç denatürasyonu için 72 °C’de 2 dakika; genomik DNA’nın denatürasyonu için 94 °C’de 30sn, primerin DNA’ya bağlanması için primer çifti için belirlenmiş sıcaklıkta (56 °C) 30sn, zincir uzaması için 72 °C’de 2 dakika bekletilip 30 döngü tamamlandıktan sonra, son uzama için de 60 °C’de 10 dakika tutularak tamamlanmıştır (Şekil 3.20). PZR reaksiyonları “Biorad ve Applied Biosystems Thermal Cycler” cihazlarında gerçekleştirildi.



**Şekil 3.20-** AFLP ön çoğaltım aşaması için kullanılan PZR programı.

Ön çoğaltım reaksiyonu yapılmış örneklerin 10 µl'si %1.5'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi. PZR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için örnekler, 50 bç'lik (Fermentas) DNA markörleri ile birlikte jele yüklendi. Jel PZR ürünlerinin kuyucuklardan çıkması amacıyla 200 Volt'da yaklaşık 1 saat yürütüp UV ışık altında incelendi. PZR ürünlerinin "DNr Bio-Imaging System MiniBIS Pro" görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekildi. PZR ürünlerinin kalanına, AFLP analizlerinin seçici çoğaltım aşamasında (Selektif PZR) kullanmak üzere 100 µl TE<sub>0.1</sub> eklendi ve karıştırıldı.

Seçici çoğaltım reaksiyonunda ön çoğaltım reaksiyonu ile elde edilen ve TE<sub>0.1</sub> ile seyreltilen örnekler kalıp olarak kullanıldı. Bu aşamada floresan işaretli ve 3 farklı baz eklenmiş *EcoRI* (*Eco-AGG*) primeri reaksiyonlara dahil edildi. Böylece PZR sonrası elde edilen ürünlerin floresan işaretli olarak Beckman Coulter GeXP Genetik Analiz Sistemi tarafından analiz edilmesi mümkün olmaktadır. Seçici çoğaltım aşamasında

kullanılacak floresan boyalı *EcoRI* ve *MseI* primerlerine ait diziler Tablo 3.9’da verilmiştir (Floresan boyalı *EcoRI* primeri “B”, 7 farklı *MseI* primerleri “1-2-3-4-5-6-7” olarak kodlanmış, yapılan PZR reaksiyonları da primer kombinasyonlarına göre B1, B2, B3, B4, B5, B6 ve B7 şeklinde kodlanmıştır.).

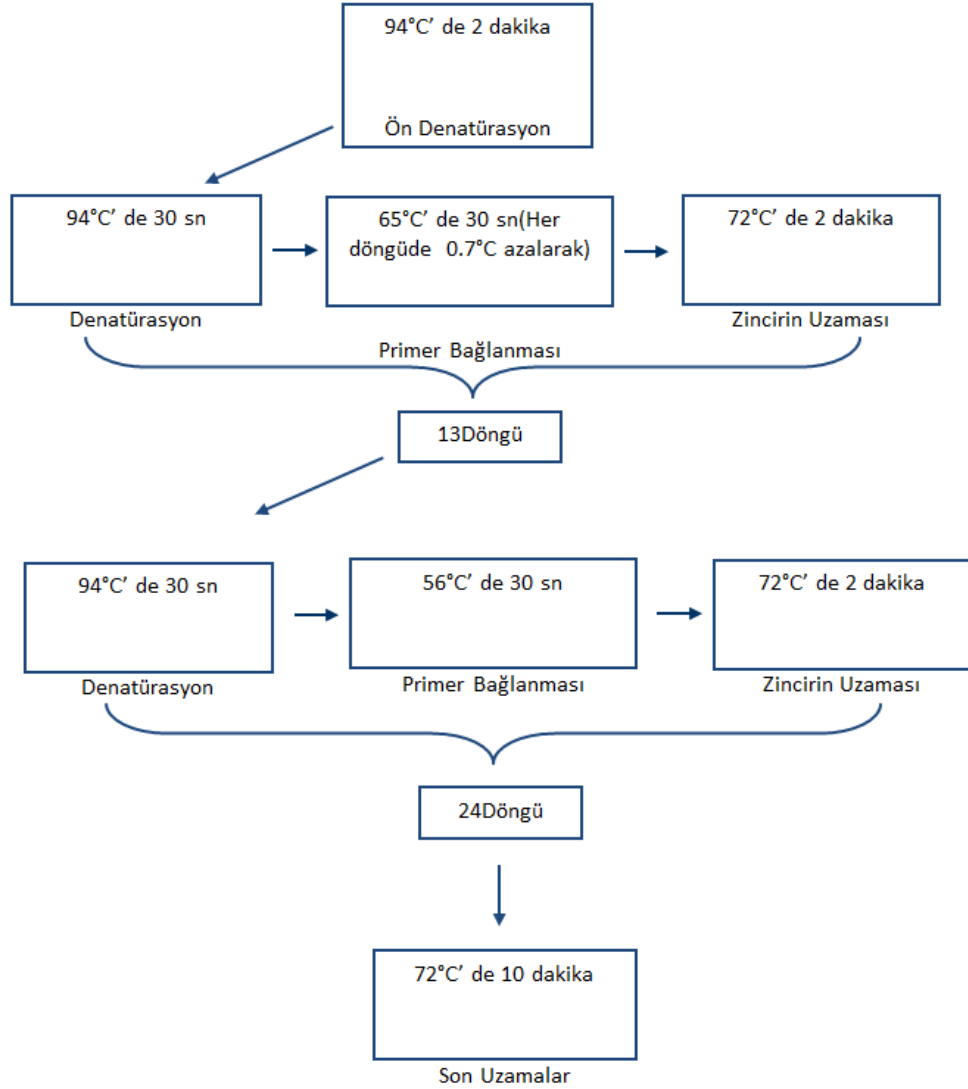
Tablo 3.9- AFLP analizlerinde selektif PZR aşamasında kullanılan primerler.

Primer Adı	Dizi (5’-‘3)
E- AGG*D4 (B)	CTGCGTACCAATTCAAGG
M-CAA (1)	GATGAGTCCTGAGTAACAA
M-CTT (2)	GATGAGTCCTGAGTAACCTT
M-CGA (3)	GATGAGTCCTGAGTAACGA
M-CGT (4)	GATGAGTCCTGAGTAACGT
M-CAT (5)	GATGAGTCCTGAGTAACAT
M-CAC (6)	GATGAGTCCTGAGTAACAC
M-CCA (7)	GATGAGTCCTGAGTAACCA

Seçici çoğaltım aşamasında PZR uygulamasında her örnek için 0.2 ml’lik tüplerdeki 12.5µl içerisinde son konsantrasyon; 1X Taq Buffer (Invitrogen, Brazil), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brazil), 0.12 mM dNTP (Invitrogen, Brazil), 0.5 U/µl *Taq* polimeraz, 0.04 µM floresan işaretli primer *Eco*-AGG, 0.2 µM primer *Mse*-C\*\* ve 8 µg/ml BSA şeklinde olup bu içerik 2.5 µl seyreltilmiş ön çoğaltım reaksiyonu ürünleri ile karıştırıldı.

AFLP analizlerinde seçici çoğaltım (Selektif) PZR uygulaması için kullanılan PZR programı 2 ayrı döngü seti içermektedir. Başlangıç denatürasyonu için 94°C’de 2 dakika; ilk döngü setinde genomik DNA’nın denatürasyonu için 94°C’de 30sn, primerin DNA’ya bağlanması için 30 sn 65 °C ‘den 56 °C’ye kadar her döngüde 0.7 °C azalarak, zincir uzaması için 72 °C’de 2 dakika bekletilip 13 döngü tamamlandıktan sonra; ikinci döngü setinde genomik DNA’nın denatürasyonu için 94 °C’de 30sn, primerin bağlanması için 56 °C’de 30 sn, uzama için 72 °C’de 2 dk bekletilip 24 döngü tamamlandıktan sonra; son uzama için de 72 °C’de 10 dakika tutularak tamamlandı

(Şekil 3.21). PZR reaksiyonları “Biorad ve Applied Biosystems Thermal Cycler” cihazlarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.21- AFLP seçici çoğaltım aşaması için kullanılan PZR programı.

Selektif PZR sonrasında elde edilen reaksiyon ürünlerinden 2.5 µl alınarak, GeXP Genetik Analiz Sistemi'nde kullanılan 96 kuyuluk plaklara yüklendi (Şekil 3.22); üzerilerine Tablo 3.10'da verilen yükleme çözeltisi eklenip pipetaj yapılarak karıştırıldı ve GeXP Genetik Analiz Sistemi'nde analiz edildi.



Şekil 3.22- GeXP Analiz Sistemi (Beckman Coulter GenomeLab) ve 96 kuyuluk örnek plağı.

Tablo 3.10- Gen anlatım analizinde kullanılan örnek yükleme çözeltisi bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
DNA size standart-400	0.25 µl
Örnek yükleme çözeltisi (SLS)	17.25 µl

### 3.4 KLOROPLAST DNA'SININ *trnL-F* BÖLGESİ ANALİZLERİ

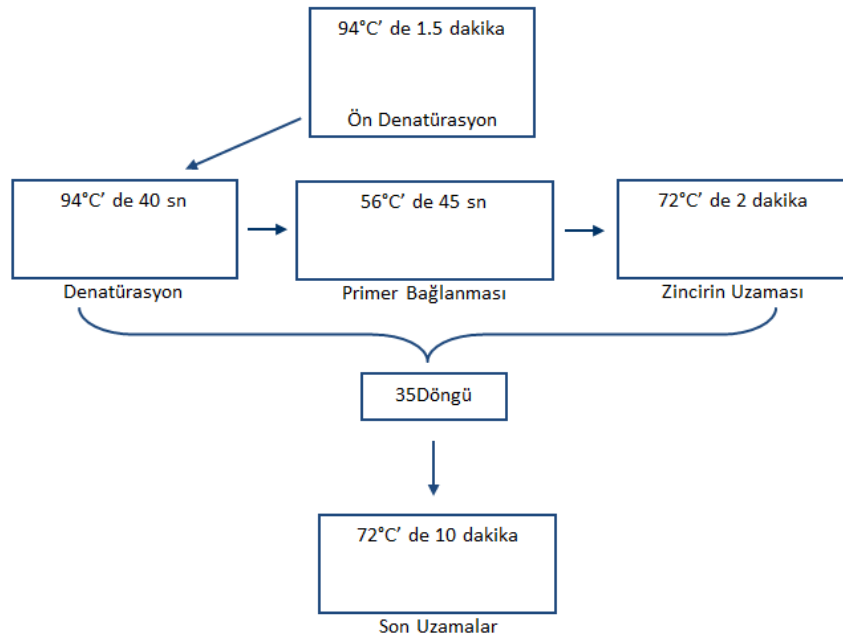
*trnL-F* bölgesi analizleri Taberlet ve diğ. (1991) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmişlerdir. Analizlerde *trnL-F* bölgesine özgü 4 evrensel primer kullanıldı (Tablo 3.11). Analizlerde kalıp DNA olarak 50 ng/µl olacak şekilde sulandırılmış örnekler kullanıldı.

Tablo 3.11- *trnL-F* bölgesi analizlerinde kullanılan primerler.

Primer Adı	Sekans (5'-3')
<b>c</b>	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<b>d</b>	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
<b>e</b>	GGTCAAGTCCCTCTATCCC
<b>f</b>	ATTGAACTGGTGACACGAG

Yöntemin ilk PZR uygulamasında her örnek için 0.2 ml'lik tüplerdeki 20 µl içerisinde son konsantrasyon; 1X Taq Buffer (Invitrogen, Brazil), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brazil), 0.12 mM dNTP (Invitrogen, Brazil), 0.25 U/µl *Taq* polimeraz, 0.2 µM primer Forward, 0.2 µM primer Reverse ve 50 ng genomik DNA şeklindedir.

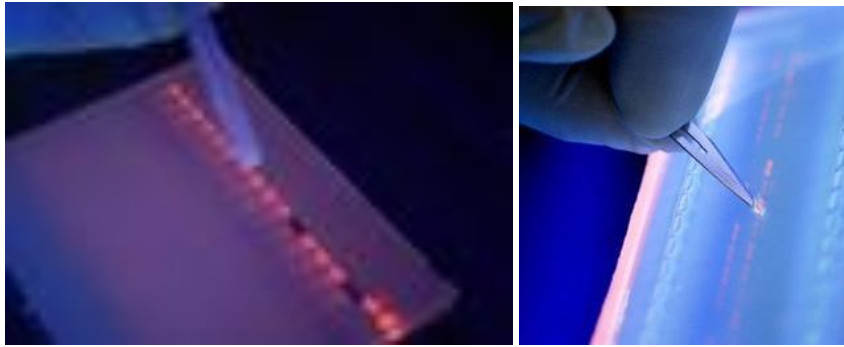
Yöntemin ilk PZR aşamasında PZR programı; başlangıç denatürasyonu için 94 °C'de 1.5 dakika; genomik DNA'nın denatürasyonu için 94 °C'de 40sn, primerin DNA'ya bağlanması için primer çifti için belirlenmiş sıcaklıkta (56 °C) 45sn, zincir uzaması için 72 °C'de 2 dakika bekletilip 35 döngü tamamlandıktan sonra, son uzama için de 72 °C'de 10 dakika tutularak tamamlanmıştır (Şekil 3.23). PZR reaksiyonları “Biorad ve Applied Biosystems Thermal Cycler” cihazlarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.23- *trnL-F* bölgesi analizlerinde gerçekleştirilen ilk PZR uygulamasının programı.

PZR sonrası ürünler %1'lik agaroz jele yüklenerek görüntüldü. PZR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için örnekler, 100 bç'lik (Fermentas) DNA markörleri ile birlikte jele yüklendi. UV ışık altında hedef bölge bantlar halinde görüntüldü. Bantların “DNr Bio-Imaging System MiniBIS Pro” görüntüleme cihazı ile fotoğrafı çekildi.

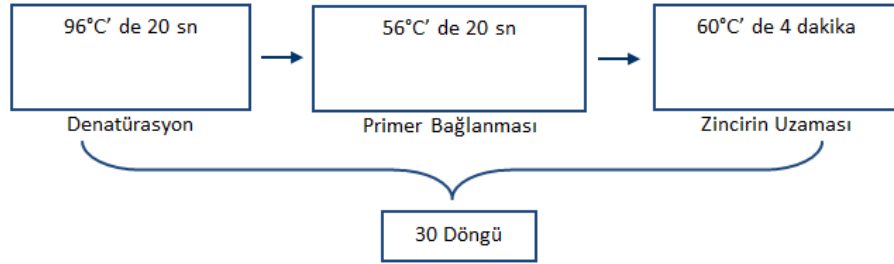
Bantlar UV ışığı altında, bantları ışığa fazla maruz bırakmadan hızlı bir şekilde kesilip 1.5 ml'lik "eppendorf" tüplerine aktarıldı (Şekil 3.24). Tüpler tartıldı. Tartım sonuçlarına göre her 10 mg jel için 10 µl "Membran Binding Solution" tüplere eklendi. Tüpler 65 °C'de jeller tamamen eriyene kadar inkübasyona bırakıldı. Temiz bir tüpe kolon yerleştirildi ve erimiş jel karışımı kolona aktarıldı. Oda sıcaklığında (20°C'de) 1 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı döküldü. Kolon tekrar tüpe konulup, 700 µl "Membrane Wash Solution (Etanol eklenmiş)" eklendi. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, tüpteki sıvı döküldü. Kolon tekrar tüpe konuldu. 500 µl "Membrane Wash Solution (Etanol eklenmiş)" eklenip, 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek işlem tekrar edildi. Tüpteki sıvı dökülüp, 13000 rpm'de 1 dakika daha kapak açık bir şekilde santrifüj edildi. Kolon temiz bir tüpe aktarıldı. 50 µl dH<sub>2</sub>O eklenip; oda sıcaklığında (20°C'de) 1 dakika inkübasyona bırakılarak DNA'nın membrandan ayrılıp, dH<sub>2</sub>O içinde çözünmesi sağlandı. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve kolon atıldı. Örneklerin NanoDrop'ta DNA miktarları ölçüldükten sonra örnekler 4°C'de saklandı.



Şekil 3.24- UV ışık altında hedef bölgenin bantlar halinde görüntülenmesi ve istenilen bantların agaroz jelden kesilmesi (Wong Maye-e, AP, <http://news.nationalgeographic.com/news>).

NanoDrop'ta DNA miktarları ölçülen örnekler, yöntemin ikinci PZR aşamasında kalıp olarak kullanılmak üzere DNA miktarları 60 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı. Örneklerin, Beckman Coulter GeXP Genetik Analiz Sistemi ile analiz edilmesi için floresan işaretli ddNTP içeriği olan "DTSC Quick Start Master Mix" ile PZR uygulaması gerçekleştirildi. Her örnek için 0.2 ml'lik tüplerde; DNA miktarları 60 ng/µl olacak şekilde sulandırılmış 10 µl örnek, 8 µl "DTSC Quick Start Master Mix" ve 2 µl primer ile karıştırıldı.

Yöntemin ikinci PZR uygulaması için kullanılan PZR programı; genomik DNA'nın denatürasyonu için 96°C'de 20 sn, primerin bağlanması için 56°C'de 20 sn, zincir uzaması için 60°C'de 4 dakika bekletilip 30 döngü ile tamamlanmıştır (Şekil 3.25). PZR reaksiyonları “Biorad ve Applied Biosystems Thermal Cycler” cihazlarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.25- *trnL*-F bölgesi analizlerinde gerçekleştirilen ikinci PZR uygulamasının programı.

PZR sonrası, ürünleri temizlemek amacıyla her örnek 5 µl hazırlanan durdurma çözeltisi ile karıştırıldı (Tablo 3.12).

Tablo 3.12- Sekans PZR'ı sonrası ürünleri temizlemede kullanılan “durdurma çözeltisi” bileşenleri.

Bileşenler	Stok konsantrasyonlar	Hacim (µl)
Sodyum Asetat	3M	2
Na <sub>2</sub> -EDTA	100mM	2
Glycogen	20mg/mL	1

Durdurma çözeltisi ile karıştırılan örnekler -20°C'de 60 µl %95'lik Etanol eklenerek hafifçe karıştırıldı. Karışım 0.5ml'lik tüplere aktarıldı. Örnekler 13000 rpm'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı, tüp dibindeki pelete dikkat edilerek pipetle çekilip atıldı. Tüplere -20°C'de 200 µl %75'lik Etanol eklendi. 13000 rpm'de 4°C'de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı, tüp dibindeki pelete dikkat edilerek pipetle çekilip atıldı. Peletler ve tüpler kurumaya bırakıldı. Etanolün uçması sağlandıktan sonra peletler, 30 µl örnek yükleme çözeltisi (SLS) ile çözdürüldü. Örnekler GeXP Genetik Analiz Sistemi'nde kullanılan 96 kuyuluk plakalara yüklendi ve GeXP Genetik Analiz Sistemi'nde analiz edildi.



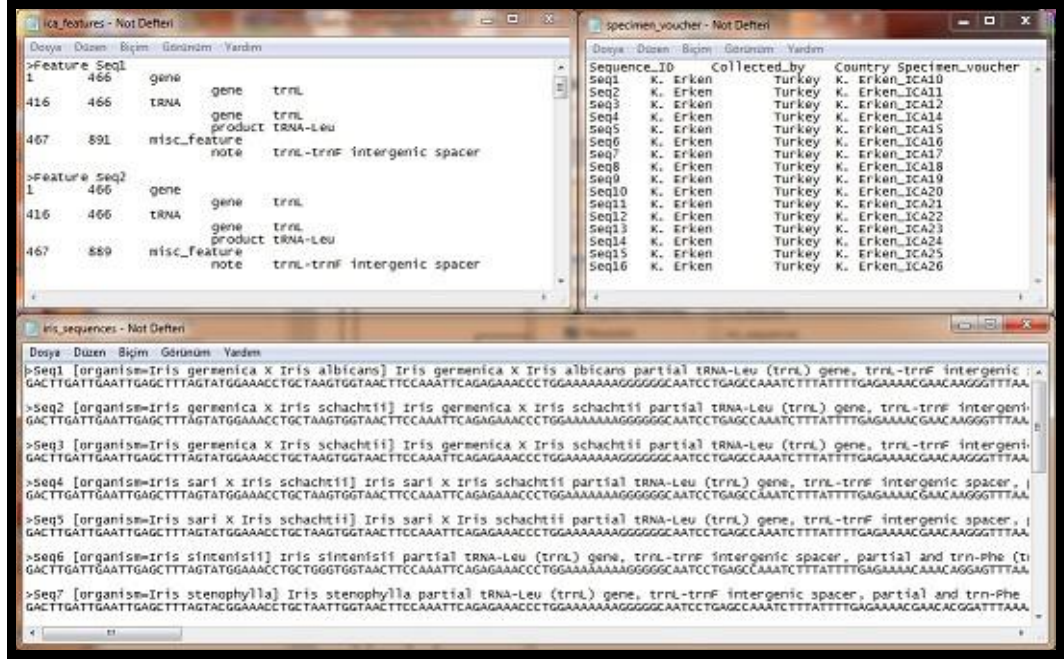
### 3.5 VERİ ANALİZİ

Floresanlı boyalarla işaretlenmiş primerler kullanılarak gerçekleştirilen AFLP analizleri sonucu tanımlanan değer aralıkları ile elde edilen piklerden (bantlar) sadece temiz, tekrarlanabilir ve belli değer aralıklarında olanları değerlendirmeye alınarak Genome Lab GeXP Genetik Analiz Sistemi ile skorlandı. Sistem piklerin varlığında (1) ve olmadığı durumlarda (0) değerleri vererek değerlendirme yapmaktadır. AFLP verilerinden elde edilen verilerin filogenetik analizleri Phylip v.3.69 programı (Felsenstein, 1989) ile dizi analizinden elde edilen verilerin filogenetik analizleri ise MEGA 5.05 programı (Tamura ve diğ., 2011) ile gerçekleştirildi.

#### 3.5.1 Verilerin Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI)'ne Yüklenmesi

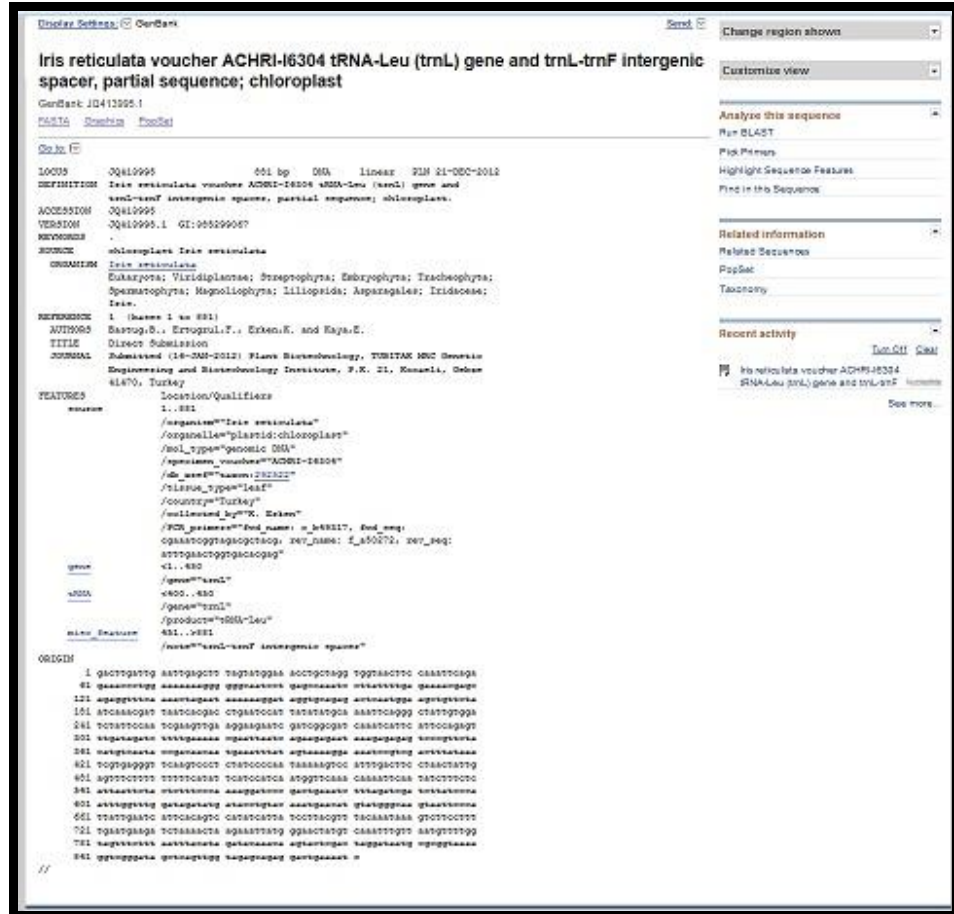
Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI), biyoteknolojinin her dalından elde edilen bilgilerin depolanabildiği çevrimiçi (online) bir veri bankasıdır. Her araştırmacı; önceki araştırmaların verilerine ulaşabilir, kendi araştırmasının verilerini diğer araştırmacıların kullanımına sunabilir. Bu veri girişi NCBI'nın her veri tipi için belirlediği formatta gerçekleştirilmelidir. Eklenen veriler ve bilgiler NCBI editörlerince kontrol edilir; revize edilmesine gerek duyulmaz ise editörlerce belirlenen tarihte internet sitesinden ulaşılabilir hale gelir.

*trnL-F* bölgesi analizlerinden elde edilen diziler ve diziler ile ilgili bilgiler, NCBI'nın DNA dizi veri girişi için belirttiği 3 farklı metin formatı dosyasında yazıldı. Dosyalar ve bilgiler NCBI veri bankasına yüklendi (Şekil 3.26).



Şekil 3.26- DNA dizi veri girişi için NCBI tarafından istenen dosyaların görünümü.

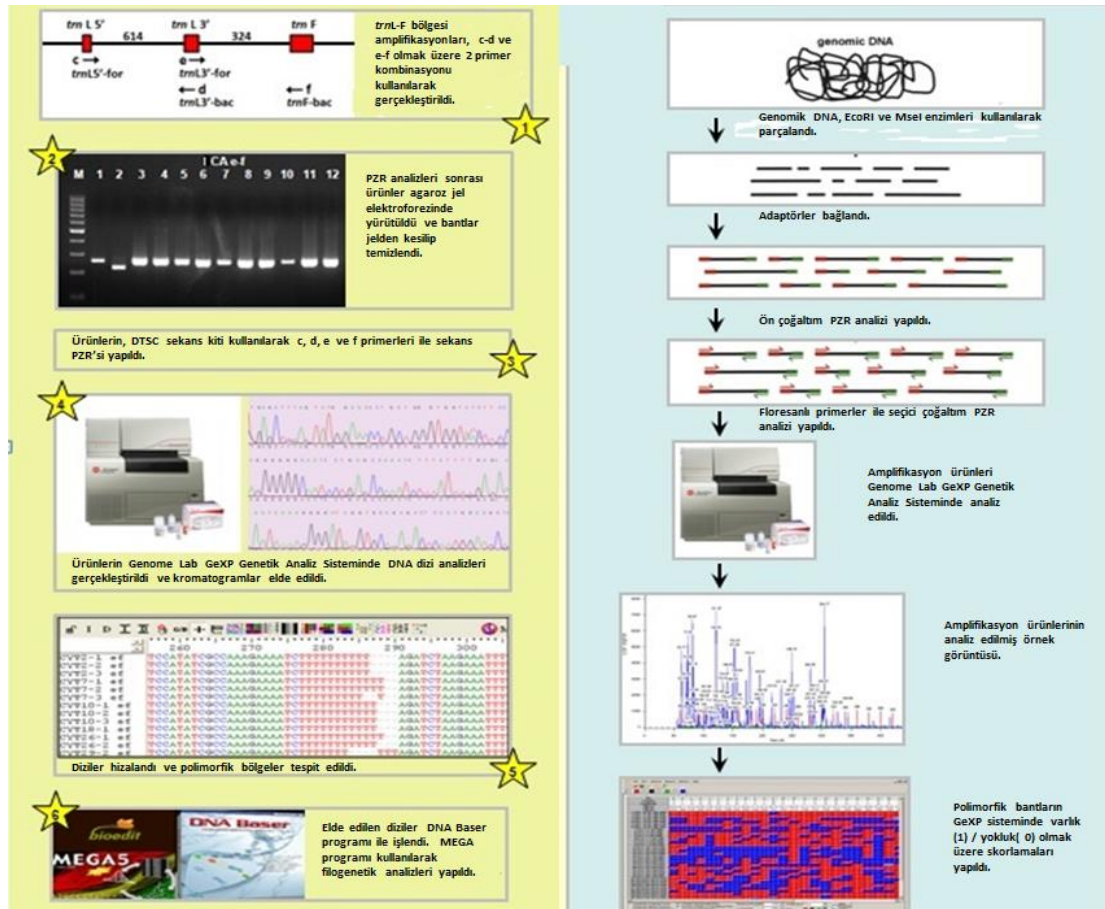
NCBI editörlerince verilen erişim kodları ile veriler siteden erişilebilir hale geldi (Şekil 3.27).



Şekil 3.27- NCBI internet sitesinde *Iris reticulata* (ICA 1)'ya ait dizi bilgilerinin görünümü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim Kodu: JQ413995).

## 4. BULGULAR

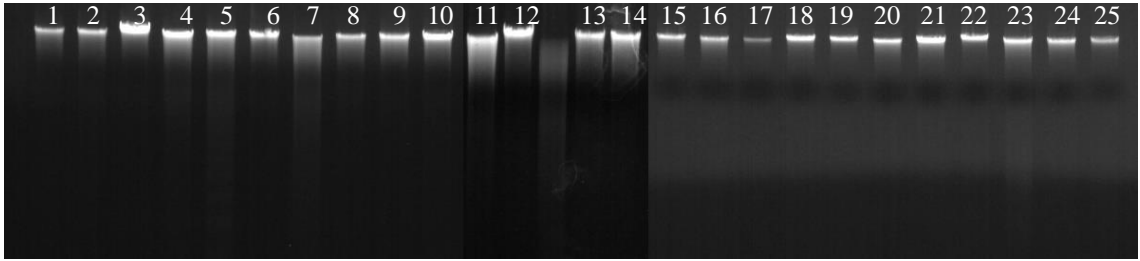
Tez çalışmasında, Türkiye florasında kayıtlı taksonlardan arazi çalışmaları sonucu toplanan bazı süsen (*Iris L.*) türleri ve bu türlerin melezlenmesi sonucu ortaya çıkan çeşit adaylarının karakterizasyonunda floresan temelli AFLP (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) moleküler markör tekniği ve kloroplast genomuna özgü markörler kullanılarak yapılan dizi analizleri ile filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, akrabalık derecelerinin saptanması, türler arası polimorfizm ve genetik varyasyonların ortaya koyulması amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tüm aşamalar Şekil 4.1’de özetlenmiştir.



Şekil 4.1- Tez çalışmasında izlenen tüm aşamaların şematik gösterimi.

#### 4.1. DNA İZOLASYONU

Çalışmada kullanılan *Iris* L. cinsine ait 25 örnek Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Enstitüsü'nden elde edilmiştir. Bitki örneklerinin genomik DNA'larının izolasyonu, CTAB izolasyon protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası örneklerin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2' deki gibidir.



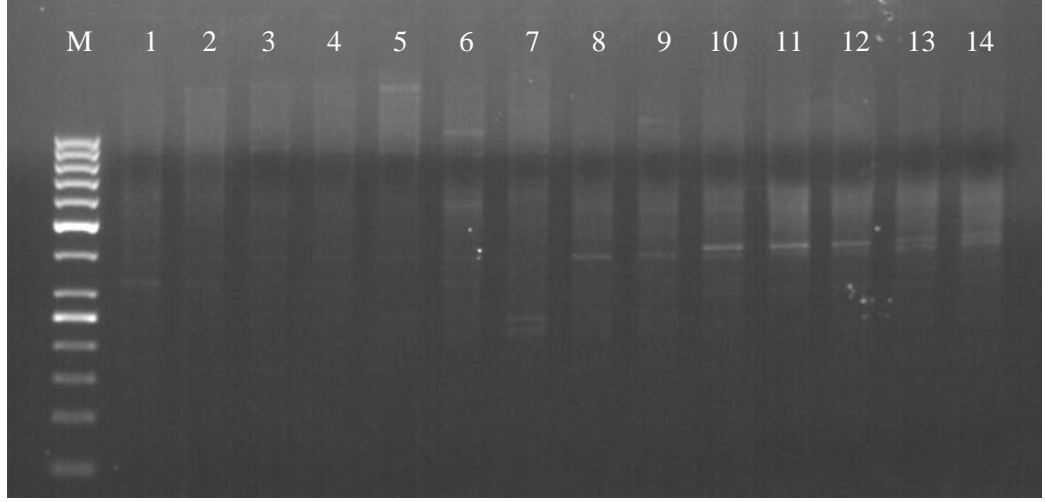
**Şekil 4.2-** DNA izolasyonu sonrası örneklerin jel görüntüsü.

M:Markör 1: *Iris reticulata*, 2: *Iris histrio*, 3: *Iris iberica subsp. elegantissima*, 4: *Iris kirkwoodii*, 5: *Iris sari*, 6: *Iris xanthospuria*, 7: *Iris lazica*, 8: *Iris barnumae f. barnumae*, 9: *Iris barnumae f. urmiensis*, 10: *Iris germanica x Iris albicans*, 11: *Iris germanica x Iris schachtii*, 12: *Iris germanica x Iris schachtii*, 13: *Iris sari x Iris schachtii*, 14: *Iris sari x Iris schachtii*, 15: *Iris sintenisii*, 16: *Iris stenophylla*, 17: *Iris suaveolens*, 18: *Iris germanica x Iris schachtii*, 19: *Iris purpureobractea x Iris schachtii*, 20: *Iris germanica x Iris albicans*, 21: *Iris germanica x Iris albicans*, 22: *Iris purpureobractea* (Kolşisin Mutant), 23: *Iris sari x Iris albicans*, 24: *Iris germanica x Iris schachtii*, 25: *Iris sari* (Doğal Melez)

#### 4.2 AFLP ANALİZİ SONUCU ELDE EDİLEN VERİLER

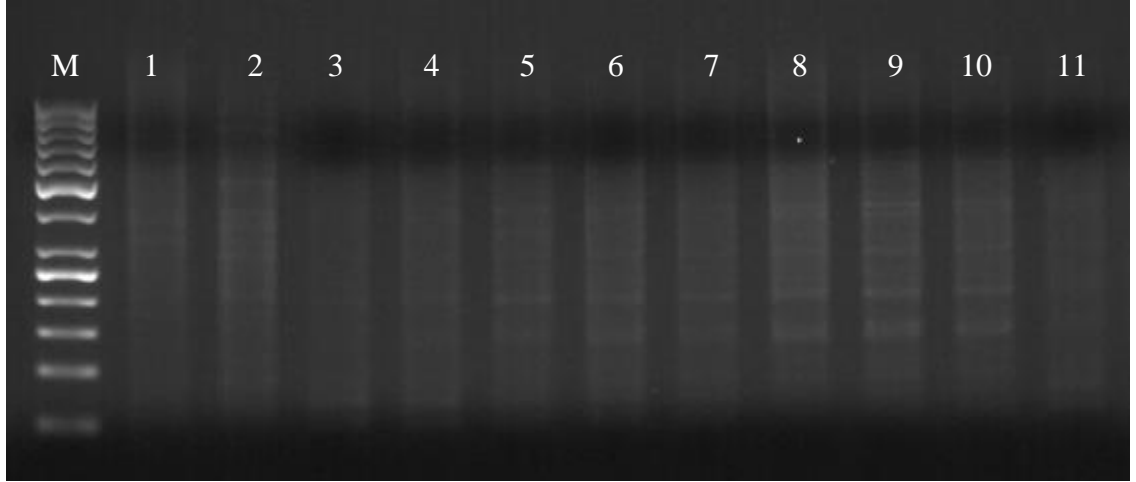
##### 4.2.1 AFLP Analizi Kapsamında Gerçekleştirilen Önçoğaltım PZR'ı

İzole edilen gDNA'lar, AFLP ön çoğaltım aşaması uygulanarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR sonrası örneklerin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3- 4.4 'deki gibidir.



Şekil 4.3- ICA 1-15 örneklerinin AFLP ön çoğaltım PZR'ı sonrası jel görüntüsü.

M:Markör 1: *Iris reticulata*, 2: *Iris histrio*, 3: *Iris iberica subsp. elegantissima*, 4: *Iris kirkwoodii*, 5: *Iris sari*, 6: *Iris xanthospuria*, 7: *Iris lazica*, 8: *Iris barnumae f. barnumae*, 9: *Iris barnumae f. urmiensis*, 10: *Iris germanica x Iris albicans*, 11: *Iris germanica x Iris schachtii*, 12: *Iris germanica x Iris schachtii*, 13: *Iris sari x Iris schachtii*, 14: *Iris sari x Iris schachtii*

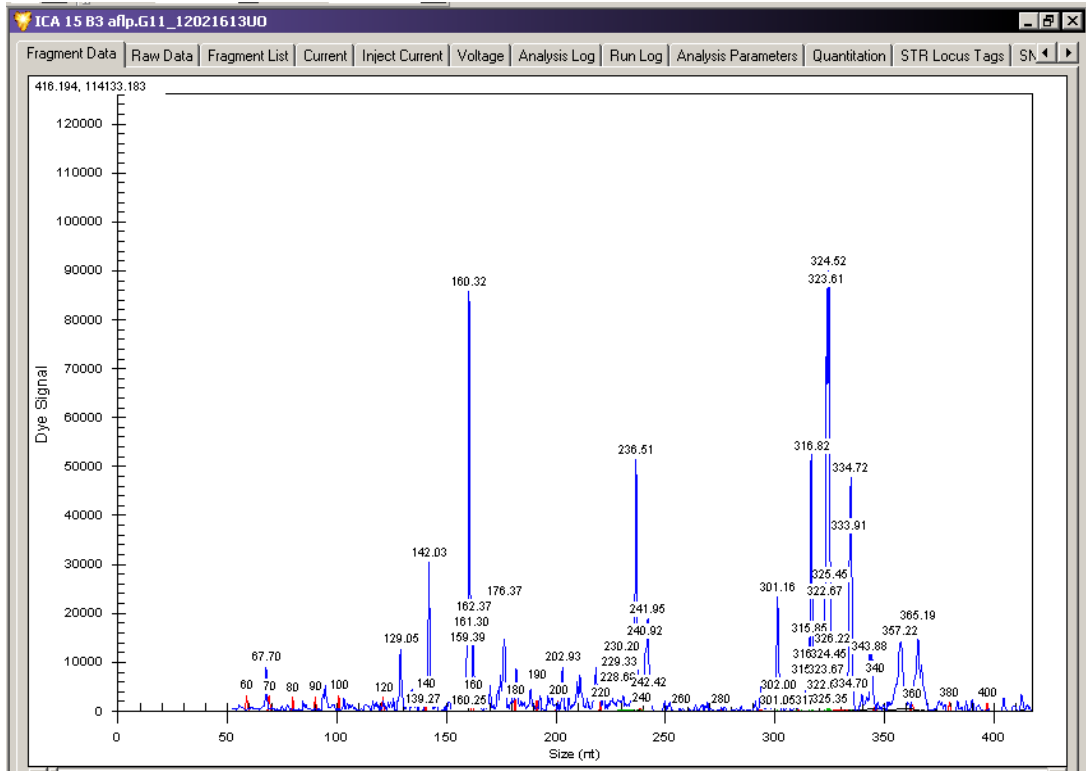


Şekil 4.4- ICA 16-26 örneklerinin AFLP ön çoğaltım PZR'ı sonrası jel görüntüsü.

M:Markör 1: *Iris sintenisii*, 2: *Iris stenophylla*, 3: *Iris suaveolens*, 4: *Iris germanica x Iris schachtii*, 5: *Iris purpureobracteata x Iris schachtii*, 6: *Iris germanica x Iris albicans*, 7: *Iris germanica x Iris albicans*, 8: *Iris purpureobracteata*(Kolşisin Mutant), 9: *Iris sari x Iris albicans*, 10: *Iris germanica x Iris schachtii*, 11: *Iris sari* (Doğal Melez)

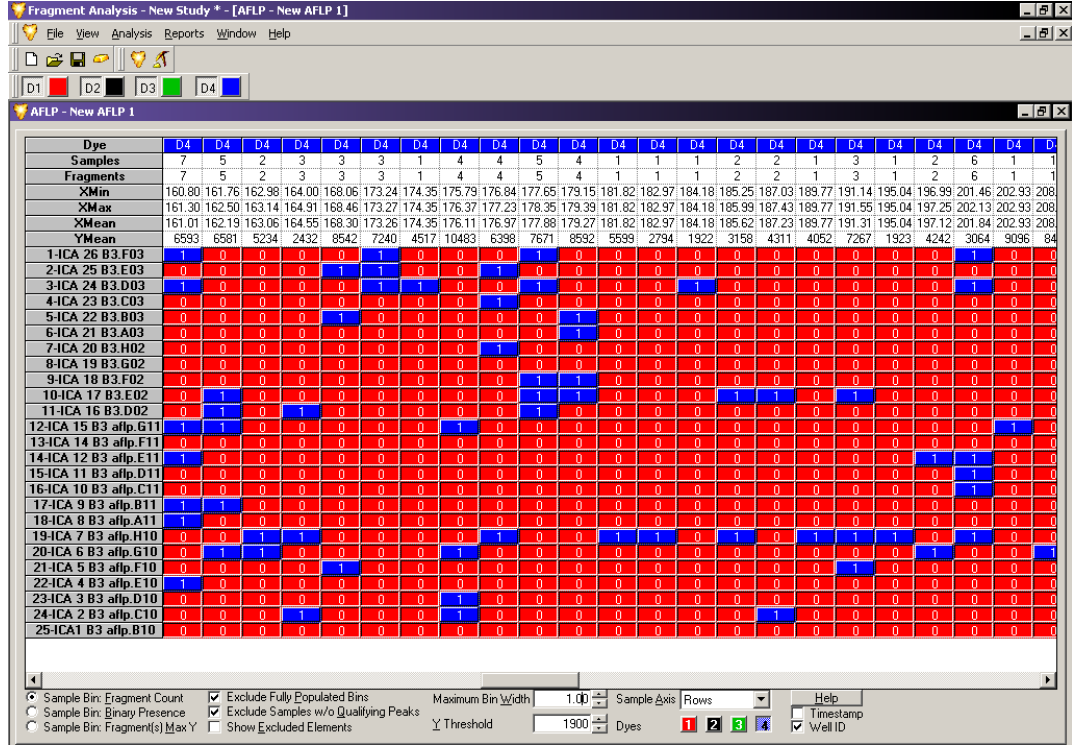
#### 4.2.2 AFLP Analizi Kapsamında Gerçekleştirilen Seçici Çoğaltım PZR'ı

AFLP ön çoğaltım aşamasını takiben örneklerin seçici çoğaltım PZR yapılmış, reaksiyon sonucu oluşan, farklı uzunluklardaki floresan işaretli PZR ürünleri (fragmentler), Beckman Coulter GeXP GenomeLab Genetik Analiz sisteminin "fragment analizi" modülü kullanılarak analiz edilmiştir. GeXP Genetik Analiz sisteminde gerçekleştirilen analiz sonucunda bantların pik görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5- AFLP analizi yapılan ICA 15 DNA'sından elde edilen floresan işaretli fragmentlerin kapiler elektroforez sisteminde yürütülmesi ile elde edilen grafik.

Cihaz 1 baz farklı uzunlukta olan, 50-600 bç uzunlukta fragmentleri ayırabilme kapasitesine sahip olduğundan, elde edilen fragmentler floresan teknolojisinin sağladığı üstünlük ile boyut farklılıkları ve yoğunlukları bakımından hassas bir şekilde analiz edilmiştir. Bu aşamada tüm *Iris* bitki materyali (25 örnek) bir arada analiz edilmiştir. GeXP Genetik Analiz sistemine ait program ile elde edilen bantların 1/0 skorlaması yapılmıştır (Şekil 4.6). Bantların istatistiksel verileri Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.6- GeXP Genetik Analiz sistemine ait programda skorlamaların görüntüsü.

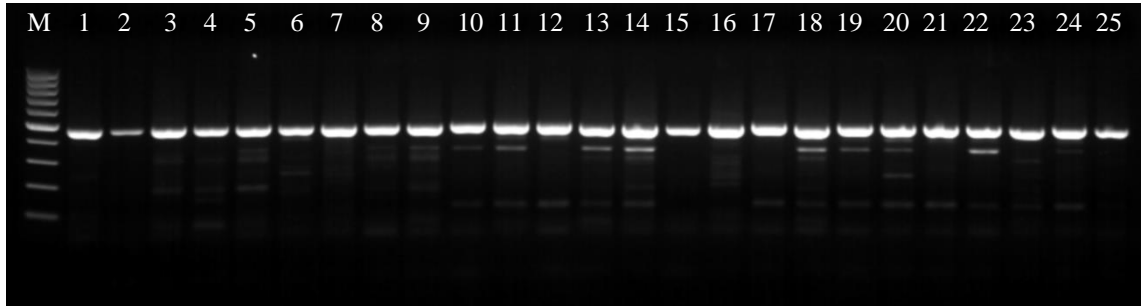
Tablo 4.1- AFLP primer kombinasyonları ile oluşturulan bantların istatistiksel verileri.

Primer çifti kombinasyonları	Primer çiftinin kodu	Minimum bant uzunluğu (bp)	Maksimum bant uzunluğu (bp)	Bant sayısı
<i>EcoRI</i> AGG*D4- <i>MseI</i> CAA	B2	58.05	428.10	138
<i>EcoRI</i> AGG*D4- <i>MseI</i> CTT	B3	54.08	443.50	180
<i>EcoRI</i> AGG*D4- <i>MseI</i> CGA	B6	58.28	444.54	180
<i>EcoRI</i> AGG*D4- <i>MseI</i> CGT	B7	54.39	453.14	203
<i>EcoRI</i> AGG*D4- <i>MseI</i> CAT	B8	54.44	449.47	202
<i>EcoRI</i> AGG*D4- <i>MseI</i> CAC	B9	54.20	461.12	208
<i>EcoRI</i> AGG*D4- <i>MseI</i> CCA	B10	54.09	448.79	221
<b>Toplam</b>				<b>1332</b>

### 4.3 KLOROPLAST DNA'SINA AİT *trnL*-F BÖLGESİ AMPLİFİKASYONLARI

#### 4.3.1 c-d ve e-f Primerleri kullanılarak Gerçekleştirilen PZR Analizleri

İzole edilen gDNA'ların *trnL* intron bölgeleri, *trnL5*'c ve *trnL3*'d primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR sonucunda elde edilen *trnL* intron bantları Şekil 4.7'deki gibi görüntülenmiştir.

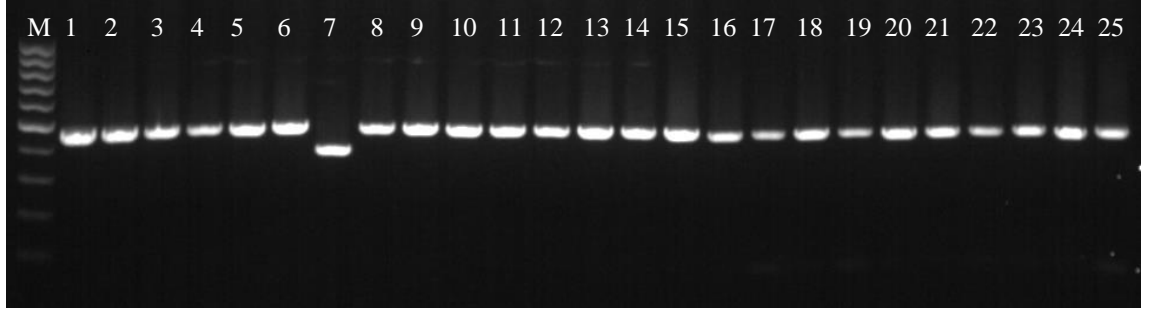


Şekil 4.7- ICA 1-26 kodlu örneklerin, *trnL* intron bölgesine özgü evrensel c ve d primerleri ile yapılan PZR sonrası jel görüntüsü.

M:Markör 1: *Iris reticulata*, 2: *Iris histrio*, 3: *Iris iberica subsp. elegantissima*, 4: *Iris kirkwoodii*, 5: *Iris sari*, 6: *Iris xanthospuria*, 7: *Iris lazica*, 8: *Iris barnumae f. barnumae*, 9: *Iris barnumae f. urmiensis*, 10: *Iris germanica x Iris albicans*, 11: *Iris germanica x Iris schachtii*, 12: *Iris germanica x Iris schachtii*, 13: *Iris sari x Iris schachtii*, 14: *Iris sari x Iris schachtii*, 15: *Iris sintensisii*, 16: *Iris stenophylla*, 17: *Iris suaveolens*, 18: *Iris germanica x Iris schachtii*, 19: *Iris purpureobracteata x Iris schachtii*, 20: *Iris germanica x Iris albicans*, 21: *Iris germanica x Iris albicans*, 22: *Iris purpureobracteata* (Kolşisin Mutant), 23: *Iris sari x Iris albicans*, 24: *Iris germanica x Iris schachtii*, 25: *Iris sari* (Doğal Melez)

İzole edilen gDNA'ların *trnL*-F bölgeleri, *trnL e* ve *trnL-F f* primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR sonucunda elde edilen *trnL*-F bantları Şekil 4.8'deki gibi görüntülenmiştir.



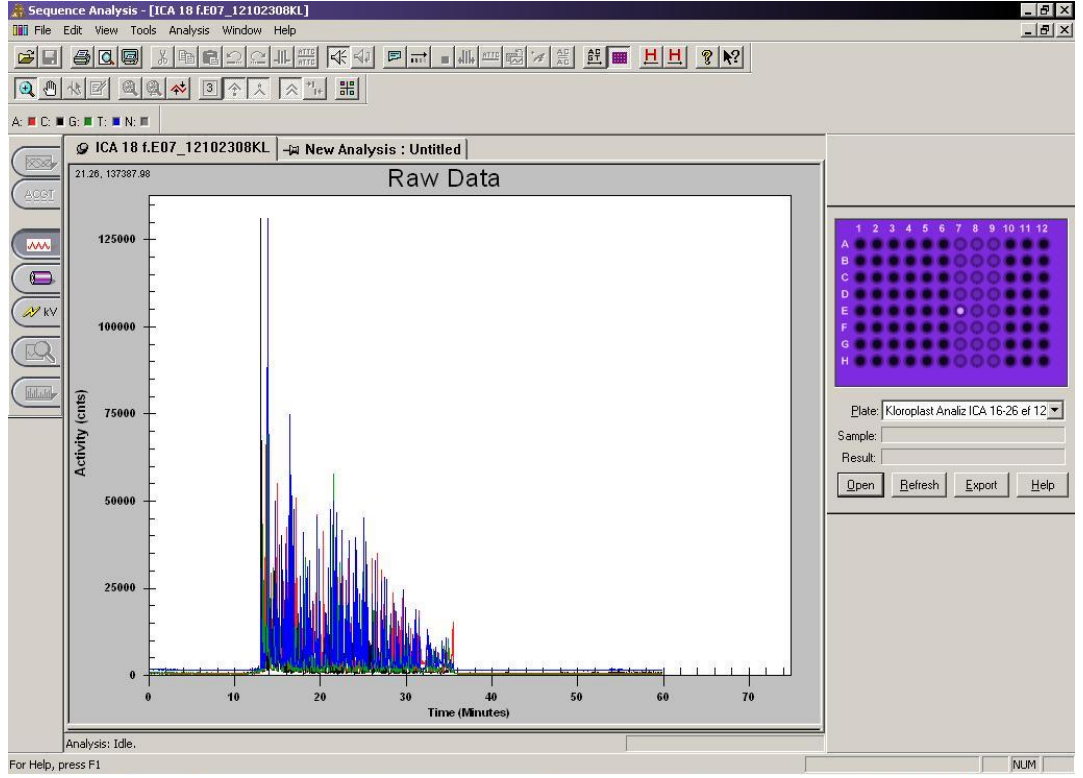


Şekil 4.8- ICA 1-26 örneklerinin *trnL-F* bölgesine özgü evrensel e ve f primerleri ile yapılan PZR sonrası jel görüntüsü.

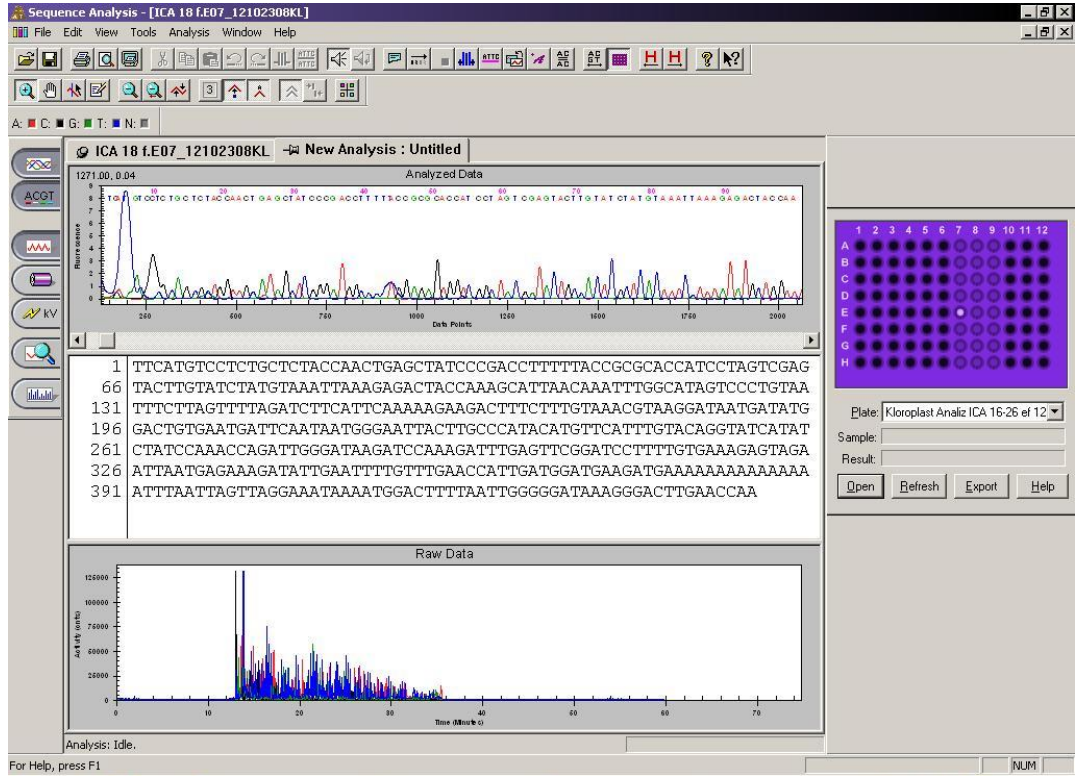
M:Markör 1: *Iris reticulata*, 2: *Iris histrio*, 3: *Iris iberica subsp. elegantissima*, 4: *Iris kirkwoodii*, 5: *Iris sari*, 6: *Iris xanthosporia*, 7: *Iris lazica*, 8: *Iris barnumae f. barnumae*, 9: *Iris barnumae f. urmiensis*, 10: *Iris germanica x Iris albicans*, 11: *Iris germanica x Iris schachtii*, 12: *Iris germanica x Iris schachtii*, 13: *Iris sari x Iris schachtii*, 14: *Iris sari x Iris schachtii*, 15: *Iris sintenisii*, 16: *Iris stenophylla*, 17: *Iris suaveolens*, 18: *Iris germanica x Iris schachtii*, 19: *Iris purpureobracteata x Iris schachtii*, 20: *Iris germanica x Iris albicans*, 21: *Iris germanica x Iris albicans*, 22: *Iris purpureobracteata* (Kolşisin Mutant), 23: *Iris sari x Iris albicans*, 24: *Iris germanica x Iris schachtii*, 25: *Iris sari* (Doğal Melez)

#### 4.3.2 Floresan Boyalarla İşaretli ddNTP'ler Kullanılarak Gerçekleştirilen PZR Analizleri

*trnL* intron ve *trnL-F* bölgelerinin elde edilen bantları, agaroz jelden izole edilmiş ve dizileme için floresan işaretli ddNTP'ler ile PZR yapılmıştır. PZR ürünleri GeXP Genetik Analiz Sistemine yüklenip, bölgelerin nükleotid dizileri elde edilmiştir. Elde edilen dizilerde her örnek için, bölgelerin iki yönden okunmaları mevcuttur. Okumalar sonrası elde edilen verilerin örnek görüntüsü Şekil 4.9-10'da verilmiştir.



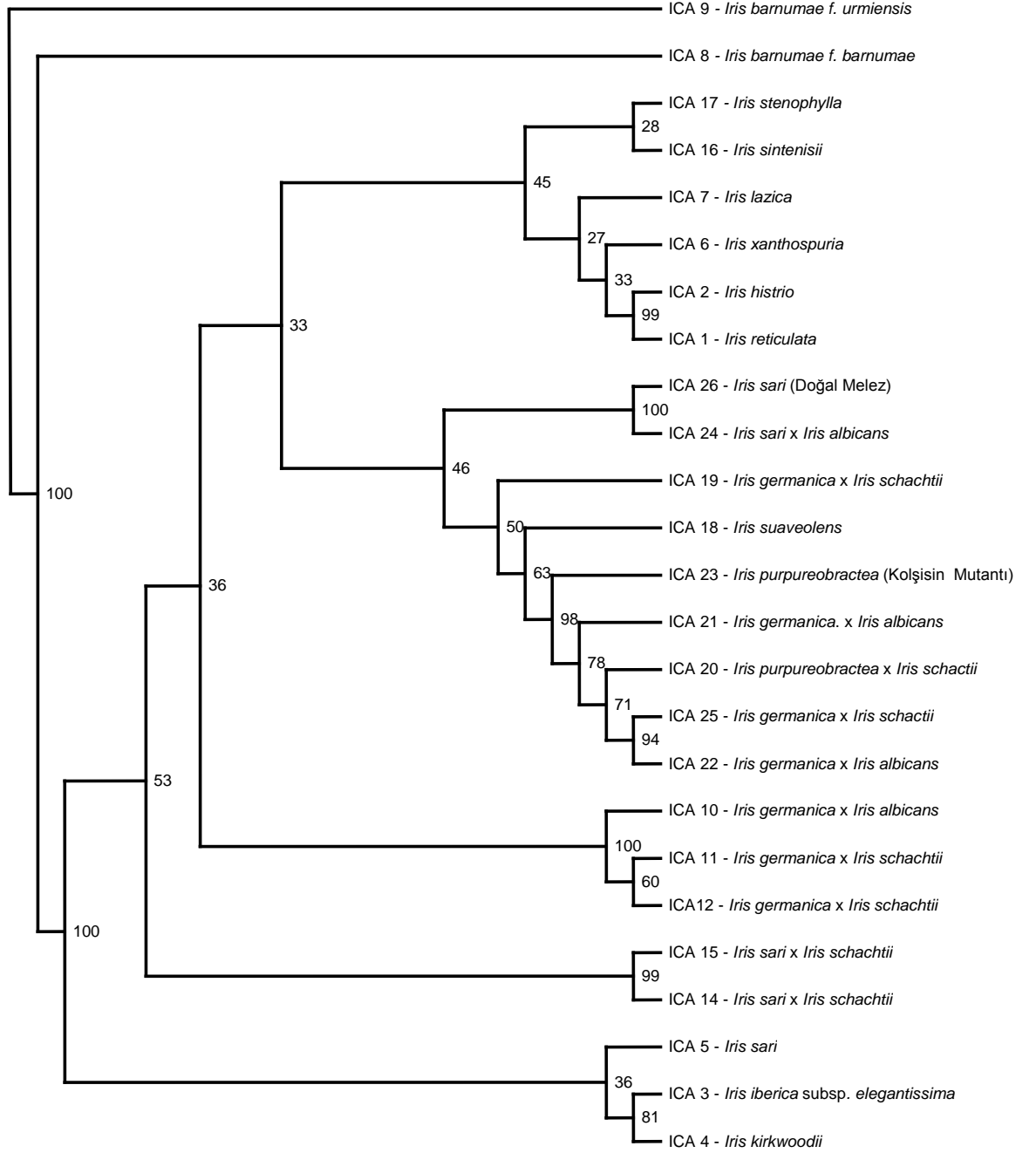
Şekil 4.9- Okuma sonrası GeXP Genetik Analiz Sistemine ait programda ICA 18-f kodlu örneğe ait ham verinin görüntüsü.



Şekil 4.10- Okuma sonrası GeXP Genetik Analiz Sistemine ait programda ICA18-f kodlu örneğe ait analiz edilmiş veri.

#### **4.4 BİYOİNFORMATİK PROGRAMLAR KULLANILARAK VERİLERİN ANALİZ EDİLMESİ**

AFLP analizleri sonucunda skorlanan bant verileri “PHYLIP” programında veri girişine uygun formata çevrildi. Veriler “PHYLIP” programında analiz edildi. “PHYLIP” programında; Maximum Parsimoni ve Neighbour Joining metodları kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu (Şekil 4.11-12). AFLP analizlerinden elde edilen 1-0 verisi kullanılarak Neighbour Joining ağacı elde edebilmek için ilk aşama olan uzaklık matrisinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla, “Phytols (Phylogenetic Tools for Comparative Biology)” programından yararlanıldı. Elde ağaçları oluştururken bootstrap değeri 100 olarak seçildi. Ağaçlar “Treeview” programı kullanılarak görüntülendi.



Şekil 4.11- *Iris* bitki örneklerinde (ICA) AFLP analizi sonucu elde edilen Neighbour Joining ağacı.





Şekil 4.13- ICA 26 kodlu bitki DNA'sına ait; kloroplast *trnL* intron bölgesine özgü “c” ve “d” primerleri kullanılarak yapılan dizi analizinin “DNA Baser” programında birleştirilme işleminin görüntüsü.

Kontrolü yapılmış diziler “MEGA” programı dahilinde ClustalW kullanılarak hizalanmış, türler arasındaki baz farklılıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.14-20).









DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	** ** ** ** **	** ** ** ****	** ** ** ****
1. ICA 1 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
2. ICA 2 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
3. ICA 3 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
4. ICA 4 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
5. ICA 5 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
6. ICA 6 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
7. ICA 7 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
8. ICA 8 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
9. ICA 9 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
10. ICA 10 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
11. ICA 11 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
12. ICA 12 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
13. ICA 14 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
14. ICA 15 cf F	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
15. ICA 16 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
16. ICA 17 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
17. ICA 18 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
18. ICA 19 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
19. ICA 20 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
20. ICA 21 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
21. ICA 22 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
22. ICA 23 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
23. ICA 24 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
24. ICA 25 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT
25. ICA 26 cf	AATCCGTCGACCTTTA	GAGTTTCTTTT	CAATCAATCAATCAAT

Site # 490  with  w/o Gaps

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	** ** ** ****	** ** ** ****	** ** ** ****
1. ICA 1 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
2. ICA 2 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
3. ICA 3 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
4. ICA 4 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
5. ICA 5 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
6. ICA 6 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
7. ICA 7 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
8. ICA 8 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
9. ICA 9 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
10. ICA 10 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
11. ICA 11 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
12. ICA 12 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
13. ICA 14 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
14. ICA 15 cf F	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
15. ICA 16 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
16. ICA 17 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
17. ICA 18 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
18. ICA 19 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
19. ICA 20 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
20. ICA 21 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
21. ICA 22 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
22. ICA 23 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
23. ICA 24 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
24. ICA 25 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT
25. ICA 26 cf	TAACTAAT	TTATAAT	CAATCAATCAATCAAT

Site # 560  with  w/o Gaps

Şekil 4.17- Örneklerin MEGA programında hizalanmış 420-560 blokları arası *trnL* intron ve *trnL-trnF* bölgelerine ait nükleotid dizileri.



DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	** **
1. ICA 1 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
2. ICA 2 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
3. ICA 3 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
4. ICA 4 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
5. ICA 5 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
6. ICA 6 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
7. ICA 7 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
8. ICA 8 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
9. ICA 9 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
10. ICA 10 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
11. ICA 11 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
12. ICA 12 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
13. ICA 14 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
14. ICA 15 cf F	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
15. ICA 16 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
16. ICA 17 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
17. ICA 18 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
18. ICA 19 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
19. ICA 20 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
20. ICA 21 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
21. ICA 22 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
22. ICA 23 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
23. ICA 24 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
24. ICA 25 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---
25. ICA 26 cf	GAAATCAATTTCACAGTCCCAATTCATTAATCCATTGCGTTTAAAGC---

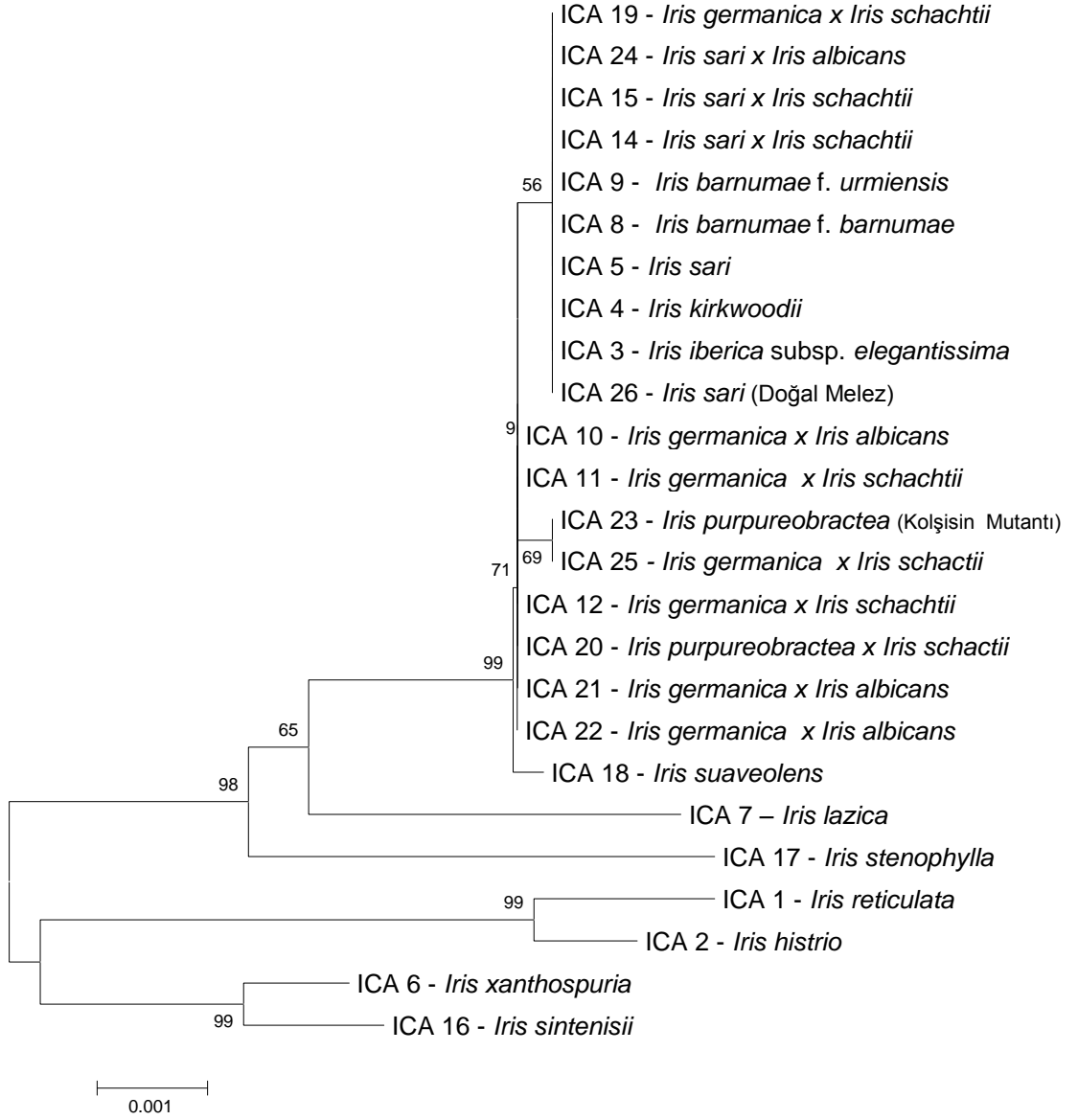
Site # 770  with  w/o Gaps

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **^
1. ICA 1 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
2. ICA 2 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
3. ICA 3 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
4. ICA 4 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
5. ICA 5 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
6. ICA 6 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
7. ICA 7 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
8. ICA 8 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
9. ICA 9 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
10. ICA 10 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
11. ICA 11 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
12. ICA 12 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
13. ICA 14 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
14. ICA 15 cf F	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
15. ICA 16 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
16. ICA 17 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
17. ICA 18 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
18. ICA 19 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
19. ICA 20 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
20. ICA 21 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
21. ICA 22 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
22. ICA 23 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
23. ICA 24 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
24. ICA 25 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC
25. ICA 26 cf	TAAAACTAAGAAATTACGGGAACTTGTTCACAAATTGTTAAATGGTTTTC

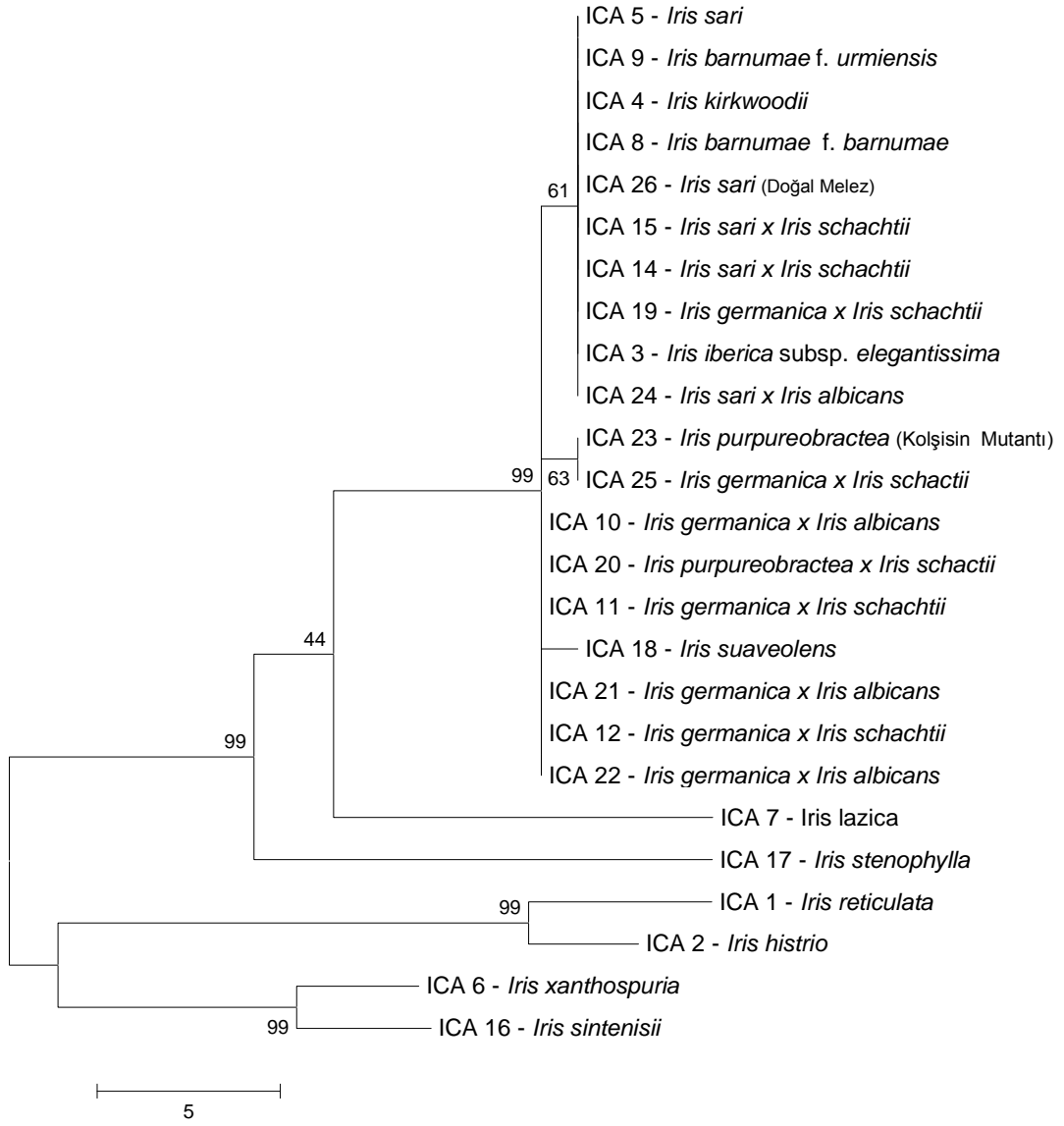
Site # 840  with  w/o Gaps

Şekil 4.19- Örneklerin MEGA programında hizalanmış 700-840 blokları arası *trnL* intron ve *trnL-trnF* bölgelerine ait nükleotid dizileri.





Şekil 4.21- *Iris* bitki örneklerinde (ICA) cpDNA dizi analizi sonucu elde edilen Neighbour Joining ağacı.



Şekil 4.22- *Iris* bitki örneklerinde (ICA) cpDNA dizi analizi sonucu elde edilen Maksimum Parsimoni ağacı.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Modern bitki ıslahı uygulamalı bilim içerisinde dinamik bir alandır. Islahçı, genetik varyasyonları kullanarak, yetiştirici ve tüketicilerin ilgilendiği karakterlere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesi için çalışır. Bu yüzden genetik çeşitliliğin incelenmesi ve bu genetik varyasyonların tespiti ıslah çalışmaları için önemli bir kaynak oluşturur. Modern moleküler DNA teknikleri, genetik çeşitliliğin araştırılmasında etkin rol oynar. Çok sayıda örnek analiz edebilmesi, kısa sürede verimli ve güvenilir sonuçlar üretmesi, sonuçlarının tekrarlanabilir olması, zamandan ve iş gücünden tasarruf edilmesini sağlaması gibi sebeplerden ötürü bu teknikler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler markör teknikleri ise; genetik çeşitliliğin incelenmesinde, varyete ve taksonların ayırt edilmesinde, gruplar arasındaki yakınlık ve uzaklık ilişkilerinin belirlenmesinde son yıllarda etkin olarak kullanılan bir araçtır. Değerli genotiplerin moleküler markörlerle incelendiği çalışmalar, ıslah çalışmalarına katkı sağlayacak ve onları hızlandıracak niteliktedir.

Tez çalışmasında *Iris* L. cinsine ait, 14 adet seleksiyon ile seçilmiş takson ve 11 adet melezleme ıslahı ile elde edilmiş çeşit adayı olmak üzere toplam 25 genotipin moleküler sistematik analizi yapılmıştır. 25 genotipin DNA'ları, CTAB metodu kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen örnekler, AFLP markör sistemine ait 7 primer kombinasyonu ve kloroplast genomuna özgü 4 primer kullanılarak araştırılmıştır.

AFLP yöntemi, genotipik varyasyonun tespit edilmesi amacıyla çeşitli bitki gruplarında yüksek polimorfizm özelliği dolayısı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Mace ve diğ. (1999) Solanaceae familyasının bir üyesi olan patlıcan (*Solanum melongena*)'nın 49 genotipi arasındaki genetik ilişkileri AFLP yöntemiyle incelemiştir. Sözkonusu çalışmada 32 adet primer kombinasyonundan 8'i seçilmiş ve bunlardan da toplam 293 adet polimorfik bant elde edilmiştir.



Ferriol ve diğ. (2003) yüksek derecede polimorfizm gösteren bir tür olan kabak (*Cucurbita pepo*)’ta, 69 genotipin genetik karakterizasyonunda AFLP markör sistemini kullanmışlardır. Bu çalışma kapsamında kullandıkları 6 adet primer kombinasyonundan 253’ü polimorfik olmak üzere toplam 476 adet bant elde etmişlerdir.

Lamote ve diğ. (2002) bir nehir havzasında farklı populasyon ve ekolojik koşullarda bulunan *Iris pseudacorus* türünün 88 farklı örneğine; AFLP markör tekniğine özgü 4 primer kombinasyonu uygulamış, 148 tane skorlanabilir polimorfik bant elde etmişlerdir.

Tez çalışması kapsamında ise, AFLP analizlerinde 7 primer kombinasyonu kullanılmıştır. 25 örneğe restriksiyon-ligasyon reaksiyonlarını takiben ön çoğaltım ve seçici çoğaltım olmak üzere 2 farklı PZR analizi yapılmıştır. PZR ürünleri GeXP Genetik Analiz Sisteminde analiz edildi. Analizler sonucunda; *E-AGG/M-CAA* (B1) primer kombinasyonu ile 138, *E-AGG/ M-CTT* (B2) primer kombinasyonu ile 180, *E-AGG/M-CGA* (B3) primer kombinasyonu ile 180, *E-AGG/ M-CGT* (B4) primer kombinasyonu ile 203, *E-AGG/ M-CAT* (B5) primer kombinasyonu ile 202, *E-AGG/ M-CAC* (B6) primer kombinasyonu ile 208 ve *E-AGG/ M-CCA* (B7) primer kombinasyonu ile 221 olmak üzere toplam 1332 polimorfik bant elde edilmiştir. Bu sayı yüksek oranda bir polimorfizmin göstergesidir.

Elde edilen bantların minimum uzunluğu 54.08-58.28 bç arasında, maksimum uzunluğu 428.10- 449.47 bç arasında değişmektedir (Tablo 4.1). Polimorfik bantların skorlanması ile elde edilen Neighbour Joining ve Maksimum Parsimoni ağaçları incelendiğinde; 2 ağaçta da örnekler arası ayırım belirgin şekilde gözlemlenmektedir (Şekil 4.11-12). Bu durum markör sisteminin iyi bir ayırım yapabildiğinin göstergesidir.

Neighbour-Joining metoduyla, 100 bootstrap değeri seçilerek oluşturulan ağaç incelendiğinde (Şekil 4.11) dış grup olarak gözükten *I. barnumae* f. *urmiensis* (ICA 8) ve *I. barnumae* f. *barnumae* (ICA 9) genotiplerinin birlikte diğer örneklerle göre uzak akraba oldukları varsayılabilir. Farklı bir dalda, ilk grubu *I.iberica* subsp. *elegantissima* (ICA 3), *I. kirkwoodii* (ICA 4) ve *I.sari* (ICA 5) genotipleri oluşturmaktadır. Bu grupta *I.iberica* subsp. *elegantissima* (ICA 3) ve *I. kirkwoodii* (ICA 4) genotiplerinin yakın bir

akrabalık ilişkisine sahip olduğu bootstrap analizince % 81 olarak desteklenmektedir. Türkiye florasında her üç taksonunun da stabil generatif anahtar karakterler olarak, 3.5-8.6(-11) x 1.3-8 boyutlarında dış periant segmentlerine sahip oldukları, iç ve dış segmentlerin uç kısımlarının küt ila oval bir morfoloji gösterdikleri ve güçlü rizomlarının varlığı teşhis anahtarında belirtilmiştir. Diğer yandan, *I. sari* (ICA 5) krem veya sarı renkli yoğun tüylerle kaplı ve 1cm den daha dar dış segmentlere sahip olup, erguvan, kahverengi ve sarı renklerde yoğun tüylü ve 1 cm den daha geniş dış periant segmentleri taşıyan diğer iki takson olan *I. iberica* subsp. *elegantissima* (ICA 3) ve *I. kirkwoodii* (ICA 4)'den ayrılmaktadır. Sözkonusu iki takson ise teşhis anahtarındaki yakın benzerliklere rağmen bitki boyu, yaprak, brakte ve dış segmentlerin boyutları bakımından bir birlerinden fark göstermektedir. AFLP verilerine dayanan dendrogramlardan elde edilen sonuçlar, sözkonusu 3 taksonun morfolojik özelliklerini esas alan gruplandırmalarla örtüşmekte ve yakın ilişkilerini ortaya koymaktadır. Diğer dallarda çatallanmanın çok ve bootstrap değerlerinin düşük olduğu gözlenmektedir. Bu durum dallar arasındaki ilişkinin tam olarak netleştirilemediği anlamına gelir. En içte bir grup olan *I. reticulata* (ICA 1) ve *I. histrio* (ICA 2) genotiplerinin bulunduğu dal % 99 desteklense de, dışındaki grupları oluşturan dallardaki değerler düşüktür. Türkiye florasında çiçek rengi, periant parçalarının boyutları, yaprak gelişim dereceleri ve yeni soğan üretimleri bakımından oldukça değişken bir özellik taşıyan ve İran-Turan elementi olan *I. reticulata* ile Akdeniz elementi olan *I. histrio* türlerinin çiçeklenme evresindeki boyları ve periant tübünün boyutları açısından birbirlerine benzerlikleri vurgulanmış, diğer yandan her iki türün brakte ve brakteolün rengi, dokusu ve dış periant segmentlerinin rengi ve lamina boyutları açısından farklılık gösterdiği belirtilmiştir. AFLP verilerine dayanan her iki dendrogramda söz konusu türlerin yakın ilişkileri morfolojik gözlemlerle de desteklenmektedir. *I. xanthosporia* (ICA 6), *I. lazica* (ICA 7), *I. sintenisii* (ICA 16), ve *I. stenophylla* (ICA 17) gibi türlerin bulunduğu bu grup, melez gruplardan ayrılmış olsa da, kendi içlerindeki ilişki net değildir. Bununla birlikte Türkiye florasında, Avrupa-Sibirya elementi olarak *I. sintenisii* ve endemik Akdeniz elementi olan *I. xanthosporia*'nın bulunduğu grup, tunik ya da diken taşımayan ve yaprak kalıntılarıyla örtülmüş yatay konumlu rizomları ile diğer türlerden ayrılmaktadır. Söz konusu türler dış segmentlerin boyu ve laminanın genişliği açısından ise bir birlerinden farklı morfolojiler sergilemektedir. Tez çalışması kapsamında AFLP verilerine dayalı maksimum parsimoni analizinde her iki türün yakın ilişkili olduğu

gözlenmektedir. Neighbour Joining analizinde de aynı dalın alt gruplarında konumlanmışlardır. Morfolojik ve moleküler gözlemler, kökensel ilişkiyi açıklar niteliktedir. Soğanlı bir tür olarak endemik Akdeniz elementi *I. stenophylla* (ICA 17) ile rizom taşıyan ve Avro-Sibiryan element olan *I. lazica* (ICA 7) türleri AFLP profillerine dayanan maksimum parsimoni analizinde en erken ayrılan kladlarda yer almışlardır. Elde edilen bulgu, temel bir karakter olarak toprak altı gövde metamorfozlarındaki farklılığın atasal bir ayrılıktan türevlenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim Türkiye florasında soğan taşıyan grup *Hermodactyloides*, rizomlu grup da *Limniris* subgenusunda yer almaktadır. Neighbour Joining analiziyle üretilen dendrogramda ise söz konusu ilişkiyi belirgin şekilde gözleyebilme olanağı bulunmamaktadır.

Melez genotiplerin buldukları dallar incelendiğinde; ICA 14 ve ICA 15 gibi ortak ebeveyine sahip genotiplerin bulunduğu grup %99 desteklenmektedir. Endemik İran-Turan elementleri olan *I. sari* x *I. schachtii* melez örneklerini içeren bu grup, AFLP'den üretilen her iki dendrogramda da benzer genotipleriyle aynı dalda konumlanmışlardır. Diğer ortak ataya sahip melezlerden *I. germanica* x *I. albicans* (ICA 10), *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 11) ve *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 12) genotipleri bir grup oluşturmuşlardır. Bu grubun bulunduğu dalın bootstrap analizi ile %100 desteklendiği görülmektedir. Avrupa ve batı asyada geniş yayılış gösteren *I. germanica*'nın düşük fertiliteye sahip ve doğada yabancı olarak rastlanmayan, tespit edilememiş ve atasal orijine sahip çok sayıda hibrit formu bulunmaktadır. *I. germanica*'nın oluşturduğu hibritler AFLP analizinden üretilen dendrogramlarda genellikle ortak kladlarda konumlanmışlardır. *I. sari* x *I. albicans* (ICA 24) ve *I. sari*-Doğal Melez (ICA 26) genotiplerinin bulunduğu dal incelendiğinde, iki genotipin ortak ataya sahip oluşunun % 100 desteklendiği gözlenmektedir. Endemik bir tür olan *I. sari* Türkiye'de geniş yayılışa sahip olup, gerek bitki boyu, gerekse çiçeklerin boyutları açısından yaşadığı habitat koşullarına göre oldukça yüksek oranda varyasyon göstermektedir. Söz konusu tür ile oluşturduğu hibrit genotip ve doğal melez genotipi her iki dendrogramda da birlikte kümelenildiği görülmektedir. Diğer bir ortak ataya sahip melez grup olan *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 25) ve *I. germanica* x *I. albicans* (ICA 22) genotiplerinin bulunduğu dalın da neighbour joining analizinde % 94, maksimum parsimoni analizinde % 65 desteklendiği görülmektedir. Neighbour joining analizinde bu dala en yakın *I. suaveolens* (ICA 18), *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 19), *I. purpureobracteata* x *I.*

*schactii* (ICA 20), *I. germanica* x *I. albicans* (ICA 21) ve *I. purpureobracteata*-Kolşisin Mutantı (ICA 23) genotipleri incelendiğinde, birbirleriyle, diğer örneklere göre daha yakın bir akrabalık ilişkileri olduğu sonucu çıkarılabilir. Türkiye florası teşhis anahtarında, diğer türlerden ayırıcı karakterler olarak birbiriyle ilişkili *I. suaveolens* ve *I. germanica* ve endemik *I. purpureobracteata* türlerinin bulunduğu grubun gövde yapraklarının taban kısımlarının belirgin bir kın ile örtülü olmadığı ve uçlarının iç doğru kıvrık bir morfoloji göstermediği belirtilmektedir. Söz konusu türlerin bulunduğu grupta *I. suaveolens* ile *I. germanica* ve *I. purpureobracteata*'nın bulunduğu alt grup bir birlerinden gövdenin basit ya da dallanmış olması özelliği ile ayrılmaktadır. Yakın ilişkili türler olarak *I. germanica* ve *I. purpureobracteata* ise çiçek rengi, brakte ve brakteolün morfolojisi gibi özelliklerin yanısıra doğal habitatlarında çiçeklenme evresindeki boyutları ile de fark göstermektedir. Dolayısıyla bu taksonların hibritleri de yakın gruplar halinde kümelenmişlerdir. Maksimum parsimoni analizinde ise yukarıda adı geçen örneklerin ilişkisi daha zayıf oranlarda gözlenmektedir. Morfolojik verilerle karşılaştırıldığında ilgili taksonların kendi aralarındaki ilişkileri bir ölçüde paralellik göstermektedir.

Maksimum Parsimoni metoduyla, 100 bootstrap değeri seçilerek oluşturulan ağaç incelendiğinde (Şekil 4.12), Soğanlı *I. stenophylla* (ICA 17) ile rizomlu *I. lazica* (ICA 7) genotiplerinin diğer örneklerden ayrıldığını gözlenmektedir. Morfolojik temel farklılıklar taşıyan iki tür, Türkiye florasının verilerine göre de teşhis anahtarında karşıt gruplarda tanımlanmış filogenetik olarak farklı atasal kökenli taksonlardır. Diğer yandan, ilk oluşan *I. reticulata* (ICA 1) ve *I. histrio* (ICA 2) grubunun buldukları dal her iki analizde % 98 ve % 99 oranında desteklenmektedir. Ağacın orta dallarındaki bootstrap değerleri düşüktür. Bu durum, dallar arasındaki ilişkinin tam olarak netleştirilemediği sonucunu düşündürmektedir. Türkiye florasında ortak karakterler olarak yakın ilişkili olan her iki türün çiçeklenme evresinde 7-15 cm boylarında olduğu ve periant tübünün ise yaklaşık 4-7 cm arasında değiştiği belirtilmektedir. Ayırt edici anahtar karakterler olarak da brakte ve brakteolün rengi ve dokusu ile periant dış segmentlerinin lamina boyutları arasındaki farklılıklar vurgulanmıştır. *I. barnumae* f. *urmiensis* (ICA 8) ve *I. barnumae* f. *barnumae* (ICA 9) genotiplerinin bulunduğu dal bootstrap analizince % 100 desteklenmekte ve bu gruba yakın akraba olarak *I. iberica* subsp. *elegantissima* (ICA 3), *I. kirkwoodii* (ICA 4) ve *I. sari* (ICA 5) genotiplerinin

bulunduğu grup görülmektedir. Bu grubun içinde, *I. iberica* subsp. *elegantissima* (ICA 3) ve *I. kirkwoodii* (ICA 4) arasındaki yakınlık ilişkisi %89 desteklenmektedir. Bu durum da 2 türün yakın akraba olduğu sonucu çıkarılabilir. Türkiye florasındaki veriler dikkate alındığında iki takson genel karakterler bakımından bir birine çok benzer olmakla birlikte, çiçeklenme evresinde bitki boyu, yaprak, brakte ve periant dış segmentlerinin boyutları açısından küçük farklılıklar göstermektedir. Ortak ataya sahip örneklerden *I. germanica* x *I. albicans* (ICA 10), *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 11) ve *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 12) örnekleri bootstrap analizlerinde % 100 desteklenen bir grup oluşturmuşlardır. Diğer oluşan melez gruplardan *I. sari* x *I. schachtii* (ICA 14) ve *I. sari* x *I. schachtii* (ICA 15) genotiplerinin bulunduğu grubun % 95, *I. sari* x *I. albicans* (ICA 24) ve *I. sari*-Doğal Melez (ICA 26) genotiplerinin bulunduğu grubun AFLP verilerine dayanan her iki analizinde %100 desteklendiğini görülmektedir.

AFLP verileri ile 2 farklı metod kullanılarak elde edilen ağaçlar arasında büyük benzerlik vardır. Filogenik ilişkilerin doğru olarak tanımlanabileceği yüksek değerlere sahip gruplar her iki ağaçta da aynıdır. AFLP markör sisteminden elde edilen sonuçlar Türkiye florasındaki veriler ışığında değerlendirildiğinde, taksonlar arasındaki ilişkiler açısından, benzerlik ve farklılıkların büyük oranda örtüştüğü görülmekte ve söz konusu verilerin, *Iris* taksonlarının sınırlandırılmasında etkin ve güvenilir parametreler olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Diğer yandan, kloroplast genomuna ait markör niteliği taşıyan diziler, çeşitli bitki gruplarında filogenetik ilişkilerin aydınlatılması amacıyla güvenilir ve stabil karakterler olarak kullanılmaktadır. Makarevitch ve diğ. (2003), Sibirya'da yayılış gösteren 22 *Iris* L. taksonunun *trnL* intron ve *trnL-F* genler arası boşluk bölgelerinin sekanslarını elde etmişler ve bu sekanslar ile türler arasında doğal akrabalık ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç oluşturmuşlardır.

Benzer şekilde, Kozyrenko ve diğ. (2009) 3 *Iris* L. taksonunun 46 örneğinde populasyon içindeki kloroplast genom varyasyonlarını incelemişlerdir. Kloroplast genomu analizlerinde *trnH-psbA*, *atpB-rbcL*, *rps4*, *trnL-trnF* ve *trnS-trnG* olmak



DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Ab	
1. ICA 11	...
2. ICA 12	...
3. ICA 19	...
4. ICA 25	...

Şekil 5.2- *Iris germanica* x *Iris schachtii* melezine ait 4 genotip olan ICA 11, ICA 12, ICA 19 ve ICA 25 kodlu genotiplerin dizileri arasındaki örnek baz farklılığı.

Diğer yandan, *I. sari* x *I. schachtii* melezlemesine ait 2 genotip olan ICA 14 ve ICA 15 arasında hiçbir baz farklılığı tespit edilememiştir. *I. sari* (Doğal Melez) genotipine ait ICA 26 kodlu örnek ve *I. sari* x *I. albicans* melezine ait ICA 24 kodlu örneğin dizilerinin aynı olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu söz konusu türlerdeki melezlemenin, kloroplastın ilgili markör bölgesinde herhangi bir değişime neden olmadığını, *Iris sari*'nin kloroplast genomunun, hibrit genotipte korunduğunu göstermektedir. Bu 2 genotipin, ICA 14 ve ICA 15 kodlu *I. sari* x *I. schachtii* kökenli melezler ile arasında büyük benzerlik olsa da 2 baz çifti farklılık tespit edilmiştir (Şekil 5.3). Genel olarak ifade edilirse, maternal kalıtım gösteren kloroplast genomundaki markör dizilerdeki değişimin, ortaya çıkan yeni döllerden çok, filogenetik süreçlerdeki varyasyonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Ab	
1. ICA 14	...
2. ICA 15	...
3. ICA 24	...
4. ICA 26	...

Şekil 5.3- ICA 14- 15 ve ICA 24-25 genotipleri arasındaki 2 baz çiftlik farklılık.

Bunun yanı sıra, *I. germanica* x *I. albicans* melezlemesine ait 3 genotip olan ICA 10, ICA 21 ve ICA 22 kodlu örnekler arasında herhangi bir baz farklılığı tespit edilememiştir.

Elde edilen *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi dizileri ile, Neighbour Joining ve Maksimum Parsimoni metodları kullanılarak oluşturulan ağaçlar incelendiğinde, iki ana grup olduğu ve birbirinden yüksek bootstrap değeri ile ayrıldığı (Şekil 4.21-22), melezler ve bazı türlerin bulunduğu gruplarda dallanma olmadığı görülmektedir. Bu durumda markör sisteminin yetersiz kaldığı ve incelenen örnekler arasında melez ve tür düzeyinde ayırım yapamadığı sonucunu çıkarabilir. Bununla birlikte, sekans verilerine

dayanan her iki kladistik analizde, ayrılan iki ana grubun aynı taksonları kapsadığı görülmektedir.

Neighbour Joining metodu ile 100 bootstrap değeri seçilerek yapılan ağaç incelendiğinde (Şekil 4.21), göze çarpan ilk grup *I. xanthospuria* (ICA 6) ve *I. sintenisii* (ICA 16) genotiplerinin bulunduğu bootstrap analizince %99 desteklenen dış daldadır. Türkiye florasında *Iris* tür tayin anahtarında ayırt edici temel karakter olarak kullanılan ve toprak altı gövde metamorfozu olan rizomlara, yassı ve şeritsi yaprak morfolojisine sahip ve dış periant segmentleri tüysüz olan *Limniris* subgenusuna ait her iki tür, yaprak kalıntılarıyla kaplanmış, ağsı tunik yapısı göstermeyen ve diken taşımayan dik konumlu rizomlara sahip ortak karakterleri ile diğer taksonlardan ayrılmakta ve kendi aralarında dış periant segmentlerinin boyutları açısından küçük farklılıklara rağmen yakın benzerlikler göstermektedir. Benzer şekilde, bu dala eş, *I. reticulata* (ICA 1) ve *I. histrio* (ICA 2) genotiplerinin bulunduğu grup da % 99 desteklenmektedir. Soğan formunda toprak altı gövdesi ve dört köşeli yapraklarıyla *Hermodactyloides* subgenusuna mensup olan söz konusu iki tür, Türkiye florası teşhis anahtarında, sinapomorfik karakterler olarak değerlendirilebilen 4-7 cm'lik periant tübü ve çiçeklenme evresinde 7-15 cm'lik uzunluğu ile incelenen diğer türlerden ayrılmaktadır. Sekans verilerine dayanılarak yapılan her iki kladistik analizde morfolojik verilerle örtüşen yakın ilişkiler tesbit edilmiştir. *I. lazica* (ICA 7) ve *I. stenophylla* (ICA 17) genotiplerinin bulunduğu grup incelendiğinde, dallardaki yüksek değerler iki genotipin yakınlık ilişkisini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte Türkiye florasındaki teşhis anahtarında bu iki tür tamamen karşıt olan iki grupta tanımlanmış, *I. lazica*'nın rizomlu, *I. stenophylla*'nın ise soğanlı toprak altı gövdelerine sahip oldukları belirtilmiştir. Avro-sibiryan element olan *I. lazica*, sinapomorfik karakter olarak periant tübünün boyutları açısından *I. unguicularis* ile birlikte rizomlu taksonlar grubundan ayrılan ilk tür olup, soğanlı *Iris* türleri grubuna filogenetik olarak en yakın tür olduğu düşünülebilir. Diğer yandan endemik Akdeniz elementi olan *I. stenophylla* sekans verilerine dayanan her iki dendrogramda rizomlu türlerden en uzak pozisyonda konumlanmış olup soğanlı türlere geçiş formu olarak değerlendirilebilir. Ancak söz konusu ilişkileri aydınlatılabilmek için, ilgili türlerin geniş örneklemelere dayanan morfolojik özelliklerinin gözlenmesi ve populasyon analizlerinin yapılması gerekmektedir. Gerek AFLP ve gerekse sekans verilerinden üretilen dendrogramlar yukarıda sözü edilen ilişkiler açısından genel olarak



paralellik göstermektedir. Filogenetik ağacı oluşturan diğer dallar incelendiğinde bazı grupların dallanma göstermediği saptanmıştır.

En fazla genotipi içeren grupta *I. iberica subsp. elegantissima* (ICA 3), *I. kirkwoodii* (ICA 4), *I. sari* (ICA 5), *I. barnumae f. barnumae* (ICA 8), *I. barnumae f. urmiensis* (ICA 9), *I. sari x I. schachtii* (ICA 14), *I. sari x I. schachtii* (ICA 15), *I. germanica x I. schachtii* (ICA 19), *I. sari x I. albicans* (ICA 24) ve *I. sari*-Doğal Melez (ICA 26) genotipleri arasında bir ayırım yapılamamıştır. Grup, diğer gruplardan ayrılmış olmasına rağmen, bulunduğu dalın % 56 bootstrap değeri yüksek kabul edilemez. Dallanmanın olmadığı bu gruplarda markör sistemi takson düzeyinde ayırımda yetersiz kalmıştır. Ancak, aynı grupta toplanan taksonların Türkiye florasında ortak anahtar karakter olarak tüylü tırnaklı (claw) dış periant segmentlerine sahip *Iris* subgenusuna mensup oldukları dikkate alındığında, sekans verilerinin tür üstü kategorilerde daha güvenilir ayırımlar için kullanılabileceği, dolayısı ile söz konusu verilerin ancak filogenetik süreçlerde ana stoktan daha erken ayrılan türler arasında ayırım sağlayabileceği düşünülmektedir. Diğer iç gruplara bakıldığında, ortak ataya sahip melez genotiplerden *I. germanica x I. albicans* (ICA 10) ve *I. germanica x I. schachtii* (ICA 11) dallanmadan bir grup, *I. purpureobracteata*-Kolşisin Mutantı (ICA 23) ve *I. germanica x I. schachtii* (ICA 25) dallanmadan başka bir grup oluşturmuşlardır. Dallanmanın olmadığı yerler yakın ilişkili taksonlar ve ortak ebeveyne sahip melezler olduğundan filogenetik ayrılmadan söz etmek olası değildir. Benzer kökenlere sahip *I. germanica x I. schachtii* (ICA 12), *I. purpureobracteata x I. schachtii* (ICA 20), *I. germanica x I. albicans* (ICA 21) ve *I. germanica x I. albicans* (ICA 22) genotipleri de kendi içlerinde, ayırım yapılamayan bir grup oluşturmuşlardır. *I. suaveolens* (ICA 18) ise bu grupların dışında ayrı bir dalda yer almıştır. İncelenen taksonlar arasında *I. germanica*'ya en yakın tür olan ve Balkanlarda yayılış gösteren doğu Akdeniz elementi *I. suaveolens*, bulunduğu *Iris* subgenusunda *I. attica* ile birlikte tek çiçek taşıyan bir türdür. Temel bir karakter olarak çiçek yapısı ve çiçek durumundaki (infloresans) farklılıklar, filogenetik ayrılıkların zamanlamasını göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Dolayısı ile, *I. suaveolens*'in bulunduğu ortak ataya sahip gruptan en erken ayrılan tür olduğu düşünülebilir.

Maksimum Parsimoni metodu ile 100 bootstrap değeri seçilerek yapılan ağaç incelendiğinde (Şekil 4.22) *I. reticulata* (ICA 1), *I. histrio* (ICA 2), *I. xanthospuria* (ICA 6), *I. lazica* (ICA 7), *I. sintenisii* (ICA 16) ve *I. stenophylla* (ICA17) genotipleri Neighbour Joining ağacında olduğu gibi yine yüksek bootstrap değerleri ile birbirinden ayrılmışlardır. İç gruplarda da yine dallanma olmamasına rağmen bazı farklılıklar mevcuttur. *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 12), *I. germanica* x *I. albicans* (ICA 21), *I. germanica* x *I. albicans* (ICA 22) genotipleri bir grup oluştururken; *I. germanica* x *I. albicans* (ICA 10), *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 11), *I. purpureobracteata* x *I. schachtii* (ICA 20) genotipleri başka bir grup oluşturmuştur. *I. purpureobracteata*-Kolşisin Mutantı (ICA 23) ve *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 25) genotipleri ise yine birlikte bir grup oluşturmuşlardır. Dallanma, yani ayırımın olmadığı en büyük grupta ise Neighbour Joining analizine paralel olarak *I. iberica subsp. elegantissima* (ICA 3), *I. kirkwoodii* (ICA 4), *I. sari* (ICA 5), *I. barnumae f. barnumae* (ICA 8), *I. barnumae f. urmiensis* (ICA 9), *I. sari* x *I. schachtii* (ICA 14), *I. sari* x *I. schachtii* (ICA 15), *I. germanica* x *I. schachtii* (ICA 19), *I. sari* x *I. albicans* (ICA 24) ve *I. sari*-Doğal Melez (ICA 26) genotipleri bulunmaktadır.

Bu verilerden, *trnL-F* bölgesi analizlerinin, tür üstü kategorilere mensup türlerin gruplandırılmasında kullanılabileceği fakat yakın ilişkili türler ile bireyler arasındaki polimorfizmin tespitinde, çözünürlüğünün ve ayırım yapma kapasitesinin yetersiz olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada AFLP ve sekans analizlerini kapsayan her iki teknikle de dikkate değer oranda genetik çeşitlilik (polimorfizm) gözlenmiştir. Her iki teknik de türleri ayırmada göreceli olarak başarılı olsa da, yakın ilişkili türlerle benzer melez genotiplere sahip bireylerin sınırlandırılmasında cpDNA markör sistemi yetersiz kalmıştır. Ancak yüksek taksonomik kategorileri içeren atasal ilişkilerin analizinde daha güvenilir veriler sunduğu düşünülmektedir. Buna karşın, AFLP markör sisteminin çalışmamızdan elde edilen veriler ışığında, cins altı kategorilerde daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğu görülmektedir. Bu kapsamdaki gözlemler, her iki teknikten elde edilen verilerin genetik polimorfizmin ve filogenetik süreçlerin farklı boyutlarını aydınlatan analiz sonuçları olarak değerlendirilmesi gerektiğini, literatür verileriyle desteklendiği gibi, çeşitliliğin ve filogenetik ilişkilerin tespit edilmesinde sabit ve güvenilir karakterler olarak

kullanılabileceğini göstermektedir. İlk defa sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen söz konusu veriler, *Iris*'in revizyonuna, taksonomik ve filogenetik ilişkilerinin aydınlatılmasına katkı sağlayacağı gibi, endemik ve nadir türleri de içeren çalışma materyalinin kimliklendirilmesi, veri bankalarının kurulması, doğal çevrelerinde (in-situ) ve ex-situ koşullarda korunması, değerli genotiplerin seleksiyonu ile süs bitkisi ya da gıda ve sağlık alanlarındaki endüstriyel ürün potansiyeline sahip materyalin genitor olarak kullanımı amaçlarına da hizmet edeceği düşünülmektedir.

Çalışma sonucunda elde edilen *Iris* L. cinsine ait 25 genotipin *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi DNA dizileri NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veri bankasına yüklenmiş ve ileriki çalışmalarda araştırmacıların kullanımına uygun olarak sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

1. AGGARWAL, R. K., SHENOY, V. V., RAMADEVI, J., RAJKUMAR, R. & SINGH, L., 2002, Molecular Characterization of Some Indian *Basmati* and Other Elite Rice Genotypes Using Fluorescent-AFLP, *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 680-690.
2. AKYOL, Y., YETİŞEN, K., ÖZDEMİR, C., BOZDAĞ, B., KOCABAŞ, O., 2012, Türkiye'deki *Crocus biflorus* Miller subsp. *tauri* (Maw) Mathew (*Iridaceae*) Üzerine Morfolojik ve Anatomik Bir Çalışma, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (1,Ek:A),15-20.
3. ALTINKUT UNCUOĞLU, A., 2009, Genetik Markörler, Floresan Temelli Yeni Nesil Genetik Analiz Uygulamaları: DNA Dizi Analizi Moleküler Markör Uygulamaları Ve Çoklu Gen Anlatım Analizleri Uygulamalı Eğitimi Kurs Kitabı, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze-Kocaeli, 8-23.
4. ALTINKUT UNCUOĞLU, A., 2010, Moleküler Markörler ve Haritalama, Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları, Erciyes Üniversitesi, Yayın no: 180.
5. Angiosperm Phylogeny Website, Version 12, 2012 [online], <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>, [Ziyaret Tarihi: 25.12.2012]
6. BAŞTUĞ, N. & ÜNAL, S., 1997. Türkiye'den İhraç Edilen Geofitler (Çiçek Soğanları), Antalya Tarım, Sayı: 1, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı İl Müdürlüğü, Antalya.
7. Beckman Coulter Website, Technical Documents, GenomeLab Genetic Analysis System [online], <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/page>, [Ziyaret Tarihi: 15.01.2013].

8. BURKE, J.M. & ARNOLD, M.L., 1999, Isolation and Characterization of Microsatellites in *Iris*, Department of Genetics, University of Georgia, Athens, GA 30602-7223, USA.
9. CLEGG, M.T. & ZURAWSKI G., 1992, Chloroplast DNA and the Study of Plant Phylogeny: Present Status and Future Prospects, *Molecular Systematics of Plants*, 1-13.
10. CURTIS, S.E. & CLEGG, M.T., 1984, Molecular Evolution of Chloroplast DNA Sequences, *Molecular Biology And Evolution*, 1 (4), 291-301
11. DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L., 1990, Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue, *Focus*, 12: 13-15.
12. EKİM, T., KOYUNCU, M., GÜNER, A., ERİK, S., YILDIZ, B. & VURAL, M., 1991, Türkiye'nin Ekonomik Değer Taşıyan Geofitleri Üzerinde Taksonomik ve Ekolojik Araştırmalar, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, İşletme ve Pazarlama Dairesi Başkanlığı, Ankara.
13. FELSENSTEIN, J., 1989, PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.
14. FERRIOL, M., PICO, B. & NUEZ, F., 2003, Genetic Diversity of a Germplasm Collection of *Cucurbita pepo* Using SRAP and AFLP Markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 271-282.
15. FREEMAN, S. & HERRON, J. C., 2009, Evolutionary Analysis, Fourth Edition, Pearson Education, Chapter 4, Estimating Evolutionary Trees, 124-130.
16. GOLDBLATT, P., GREEVES, G., CHASE, M. W., RUDALL P., FAY, M. F., COX, A. V., LEJEUNE, B. & SOUZA-CHIES, T., 2001, Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions, *American Journal of Botany*, 88 (11),2074-2087.
17. GÜLŞEN, O. & MUTLU, N., 2005, Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markörler ve Kullanım Alanları, *Alatarım*, 4 (2), 27-37.
18. HASANÇEBİ, S., 2009, Kapiler Jel Elektforezi ve DNA Fragment Analizi, Floresan Temelli Yeni Nesil Genetik Analiz Uygulamaları: DNA Dizi Analizi Moleküler Markör Uygulamaları Ve Çoklu Gen Anlatım Analizleri Uygulamalı Eğitimi Kurs Kitabı, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze-Kocaeli, 41-54.

19. IRMAK, M. A. & YILMAZ, H., 2011, Flora Turizmine Bakıç Açısının Anketlerle Belirlenmesi, *Biological Diverstiy and Conservation*, 4 (1), 99-106.
20. JOHNSTON, J.A., WESSELINGH, R.A., BOUCK, A.C., DONOVAN, L.A. & ARNOLD, M. L., 2001, The Relationship Between Genotype and Environmental Gradients in a Louisiana *Iris* Hybrid Population, *Molecular Ecology*, 10, 673-681.
21. KANDEMİR, N. & ENGİN, A., 2000, Orta Karadeniz Bölgesinde Yayılış Gösteren *Iris histrioides* Foster (*Iridaceae*) Üzerinde Otekolojik Bir Araştırma, *Turkish Journal of Botany*, 24, 347-354.
22. KARAGÜZEL, Ö., AYDINŞAKİR, K. & KAYA, A. S., 2007, Dünyada ve Türkiye’de Çiçek Soğanları Sektörünün Durumu, *Derim Dergisi*, 24 (1), 1-10.
23. KİBAROĞLU, A., 2009, Kapiler Elektroforez Temelli Kantitatif Gen Anlatım Analizleri: GenomeLab™ GeXP Genetik Analiz Sistemi, Floresan Temelli Yeni Nesil Genetik Analiz Uygulamaları: DNA Dizi Analizi Moleküler Markör Uygulamaları Ve Çoklu Gen Anlatım Analizleri Uygulamalı Eğitimi Kurs Kitabı, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze-Kocaeli, 24-25.
24. KLUG, W. S., CUMMINGS, M. R. & SPENCER, C. A., 2009, Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, Ankara, Bölüm 9, Çekirdek Dışı Kalıtım, 218-220.
25. KOYUNCU, M., 2007, Türkiye Geofitleri, Doğal Süs Bitkilerinin Kültüre Alınması ve Herbaryum Teknikleri Kurs Notları, Bazı Doğal Bitkilerin Kültüre Alınması, Yeni Tür ve Çeşitlerin Süs Bitkileri Sektörüne Kazandırılması Projesi.
26. KOZYRENKO, M. M., ARTYUKOVA, E. V. & ZHURAVLEV, Y. N., 2009, Independent Species Status of *Iris vorobievii* N.S. Pavlova, *Iris mandshurica* Maxim., and *Iris humilis* Georgi (*Iridaceae*): Evidence From the Nuclear and Chloroplast Genomes, *Russian Journal of Genetics*, 45 (11), 1394-1402.
27. LAMOTE, V., ROLAN-RUIZ, I., COART, E., DE LOOSE, M. & VAN BOCKSTAELE, E., 2002, A Study of Genetic Variation in *Iris pseudacorus* Populations Using Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), *Aquatic Botany*, 73 (1), 19-31.

28. MACE, E. S., LESTER, R. N. & GEBHARDT, C. G., 1999, AFLP Analysis of Genetic Relationships Among the Cultivated Eggplant, *Solanum melongena* L., and Wild Relatives (Solanaceae), *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 626-633.
29. MAKAREVITCH, I., GOLOVNINA, K., SCHERBIK, S. & BLINOV, A., 2003, Phylogenetic Relationships of the Siberian *Iris* Species Inferred From Noncoding Chloroplast DNA Sequences, *International Journal of Plant Science*, 164 (2), 229-237.
30. MATHEW, B., 1984, *Iris* L. In: DAVIS, P.H. (eds), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 8, University Press, Edinburgh, 381-410.
31. MAXAM, A. M. ve GILBERT, W., 1977, A New Method For Sequencing DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74, 560-564.
32. MEUDT, M.H. & CLARKE, A.C., 2007, Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP Applications Analyses and Advances, *Trends in Plant Science*, Vol.12 No.3.
33. MOUNT, D. W., 2001, Bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Chapter 6, Phylogenetic Prediction, 240-264.
34. National Geographic Website, Photos: Life-Changing Nobel Chemistry Breakthroughs [online] <http://news.nationalgeographic.com/news/2011> [Ziyaret Tarihi:10.03.2013 ].
35. ORHAN, I., ŞENER, B., HASHIMOTO, T., ASAKAWA, Y., ÖZGÜVEN, M. & AYANOĞLU, F., 2002, Iristectorone K: A Novel Monocyclic Triterpene Ester From *Iris germanica* Rhizomes Growing in Turkey, *Fitoterapia*, 73, 316-319.
36. ÖZCAN, T., 2013, Molecular (RAPDs and fatty acid) and micromorphological variations of *Echium italicum* L. populations from Turkey, *Plant Systematics and Evolution*, 299 (3), 631-641.
37. PHARMAWATI, M., Yan, G. & FINNEGAN, P.M., 2005, Molecular Variation and Fingerprinting of *Leucadendron* Cultivars (*Proteaceae*) by ISSR Markers, School of Plant Biology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Western Australia, *Annals of Botany*, 95, 1163-1170.
38. QUANDT, D., MÜLLER, K., STECH, M., FRAHM, J.P. & FREY, W., 2004, Molecular Evolution of the Chloroplast trnL-F region in Land Plants, *Monographs in Systematic Botany from Missouri Botanic Garden*, 98, 13-37

39. QUERCI, M., JERMINI, M. & VAN DEN EEDE, G., 2006, Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Kurs El Kitabı, ISBN 978-92-79-13574-3.
40. RUDALL, P. & GOLDBLATT, P., 1991, Leaf anatomy and phylogenys of Ixioideae (Iridaceae), *Botanical Journal of Linnean Society*, 106, 329-345.
41. RUDALL, P., 1994, Anatomy and Systematics of Iridaceae, *Botanical Journal of The Linnean Society*, 114, 1 – 21.
42. SANGER, F. ve COULSON, A. R., 1975, A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase, *Journal of Molecular Biology*, 94, 441-448.
43. SELVİ, S., 2005, Balıkesir İlindeki *Crocus* sp. Türlerinin Taksonomisi, Morfoloji ve Anatomisi, Yüksek lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi.
44. SEMAGN, K., BJØRNSTAD, Å. & NDJIONDJOP, M.N., 2006, An Overview Of Molecular Marker Methods For Plants, *African Journal of Biotechnology*, 5 (25), 2540-2568.
45. SEVİNDİK, E., 2011, Türkiye’de Yetişen *Silene* L. Cinsinin *Auriculatae* ve *Brachypodeae* Seksiyonlarına Ait Türlerin ITS nrDNA Dizilerine Dayalı Filogenetik İlişkileri, Yüksek lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi, 98 s.
46. ŞAHİN, N., 2011, Türkiye’de Yetişen *Serratula* L. (*Asteraceae*) Cinsine Ait Taksonların ITS nrDNA ve *trnL-F* cpDNA Dizileriyle Moleküler Sistemik Analizi, Yüksek lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi, 92 s.
47. TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G. & BOUVET, J., 1991, Universal Primers for Amplification of Three Non-coding Regions of Chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
48. TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHNER, G., NEİ, M. & KUMAR, S., 2011, MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Likelihood, Distance And Parsimony Methods, *Molecular Biology And Evolution*, 28 (10), 2731–2739.
49. TEZ, C., 2011, Türkiye’de yayılış gösteren *Sideritis* L. (*Lamiaceae*) Cinsinin *Empedoclia* Seksiyonuna ait taksonların ITS Çekirdek Ribozomal DNA



Dizilerine Dayalı Filogenetik Analiz, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi, 126 s.

50. TİTİZ, S., ÇAKIROĞLU, N., YILDIRIM, T. B. & ÇAKMAK, S., 2000, Süs Bitkileri Üretim ve Ticaretindeki Gelişmeler Türkiye Ziraat Mühendisliği 5. Teknik Kongresi, Ankara, Yayın No:38, Cilt 2, 709-740.
51. Türkiye Geofitleri Web Sitesi [online] <http://turkiyegeofitleri.com/> [ziyaret tarihi: 02.01.2012].
52. TÜRKTAŞ, M., 2011, DNA Dizi Analizi, Floresan Temelli Yeni Nesil Genetik Analiz Uygulamaları: DNA Dizi Analizi Moleküler Markör Uygulamaları Ve Çoklu Gen Anlatım Analizleri Uygulamalı Eğitimi Kurs Kitabı, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze-Kocaeli, 68-74.
53. ÜLGER, M., 2007, Mersin İlinde İzole Edilen Streptomisin Dirençli Mycobacterium Tuberculosis Kompleksi İzolatların *Rpsl* Ve *Rrs* Gen Bölgesi Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi İle Gösterilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin Üniversitesi.
54. VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M., 1995, AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting, *Nucleic Acid Research*, 23 (21), 4407-4417.
55. WILSON, C. A., 2004, Phylogeny of *Iris* Based on Chloroplast *matK* Gene and *trnK* Intron Sequence Data, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33 (2), 402-412.
56. WOLFE, K.H., Lİ W.H. & SHARP, P.M., 1987, Rates of Nucleotide Substitution Vary Greatly Among Plant Mitochondrial Chloroplast and Nuclear DNAs, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 84 (24), 9054-9058.
57. YAŞA, Z., 2005, Asma (*Vitis vinifera* L.)'da Önemli Vegetatif ve Generatif Karakterler İle Hastalıklara Dayanım Özelliklerine Yönelik Genom Haritalaması, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 132 s.
58. YILDIRIM, A., KANDEMİR, N., 2001, Genetik Markörler ve Analiz Metodları, Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Editörler; ÖZCAN, S., GÜREL, E., BABAOĞLU M., Selçuk Üniversitesi Basımevi, 334-363, Konya.

59. ZOMLEFER, W. B., 1994, Guide to Flowering Plant Families, The University of North Carolina.
60. ZURAWSKI G., & CLEGG M.T., 1987, Evolution of Higher-Plant Chloroplast DNA-Encoded Genes: Implications for Structure-Function and Phylogenetic Studies, *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 391-418.

## EKLER

>**ICA 1 - *Iris reticulata* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**  
 GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAGGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTT  
 ATTTTGAGAAAACGAGCAGAGGTTTCAAACCTAGAATAAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAACGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATATATGCAAAATTCAGGGCTATTGTGGATCTATTCCAATCGAAGT  
 TGAAGGAAGAATCGATCGGCGATCAAATCATTCAATCCAGAGTTTGATAGA  
 TCTTTTGAAAAACGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCCCGTTCT  
 ACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATCCGTCG  
 ACTTTATAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGTCCAT  
 TTGACTTCCTAACTATTGAGTTTCTTTTTTTTTTCATATTCATCCATCAATGGTT  
 CAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATCTACTCTTTCCCAAAAAGGATC  
 CCGACTGAAATCTTTAGATCGATCTTATCCCAATTTGGTTTGGATAGATATG  
 ATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTATTGAATCAT  
 TCACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAATAAAGTCTTCCTTTTGAAT  
 GAAGATCTAAACTAAGAAATTATGGGAACTATGTCAAATTTGTTAATGTTT  
 TGGTAGTTTCTTTAATTTACATAGATACAAACAAGTACTCGACTAGGATAAT  
 GCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAA  
 TC

>**ICA 2 - *Iris histrio* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**  
 GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAGGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAGAGGTTTCAAACCTAGAATAAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAACGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATATATGCAAAATTCAGGGCTATTGTGGATCTATTCCAATCGAAGT  
 TGAAGGAAGAATCGATCGGTGATCAAATCATTCAATCCAGAGTTTGATAGA  
 TTTTTTGAAAAACGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCCCATTCT

ACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATCCGTCG  
 ACTTTATAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAGTCCAT  
 TTGACTTCCTAACTATTGAGTTTCTTTTTTTTCATATTCATCCATCAATGGTTC  
 AAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTTCCCAAAGGATCC  
 CGACTGAAATCTTTGGATCGATCTTATCCCAATTTAGTTTGGATAGATATGA  
 TACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTATTGAATCATT  
 CACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTCCTTTTGAAT  
 GAAGATCTAAAATAAGAAATTACGGGAACTATGTCAAATTTGTTAATGTTT  
 TGGTAGTTTCTTTAATTTACATAGATACAAACAAGTACTCGACTAGGATAAT  
 GCGCGGTAAAAGGTTGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAAT  
 C

**>ICA 3 - *Iris iberica* subsp. *elegantissima* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATAATTATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
 CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAATCCAGAGTTT  
 GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
 CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
 CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAA  
 GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATC  
 AATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTT  
 TCACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGG  
 ATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATT  
 ATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCT  
 TCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATT  
 TGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTA  
 GGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGA  
 CTGAAAATC

**>ICA 4 - *Iris kirkwoodii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATAATTATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
 CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCCATTCCAGAGTTT  
 GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
 CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
 CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAA  
 GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCA  
 ATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTT  
 CACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGGGA  
 TAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATCCCATTAT  
 TGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTC  
 TTTTTGAATGAAGATCTAAACTAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATTT  
 GTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTAG  
 GATGGTGCGCGGTAAAAGGTTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACT  
 GAAAATC

**>ICA 5 - *Iris sari* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATAATTATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
 CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCCATTCCAGAGTTT  
 GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
 CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
 CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAA  
 GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCA  
 ATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTT

CACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGGA  
 TAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTAT  
 TGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTC  
 TTTTGAATGAAGATCTAAACTAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATTT  
 GTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTAG  
 GATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACT  
 GAAAATC

**>ICA 6 - *Iris xanthospuria* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTGGGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACAAACAGGGGTTTAAAACTAGAATAAAAGGGGATAGG  
 TGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAACGATTAATCACGACCTGA  
 ATCCATTATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAATCGAAG  
 TTGAAGGAAGAATCGATCAGTGATCAAATCATTATTCCAGAGTTTGATAG  
 ATCTTTTGAAAAACGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCCCGTTC  
 TACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATCCGTC  
 GACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAGTCCA  
 TTTTACTTCCTAACTATACTATTTAGTTTCTTTTTTTTCATCTTCATCCATCAA  
 TGGTCCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATCTACTCTTTCCAAAA  
 GGATCCAGACTGAAATCTTTGGATCGATCTTATCCCAATTTGGTTTGGATAG  
 ATATGATACCTGTACAAATAAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTATTGA  
 ATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTATGTTTACTACAAAGAAAGTCTTC  
 CTTTTGAATGAAGATCTAAACTAAGAAATTACAGGAACTATGTCAAATTT  
 GTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAACAAGTACTCGA  
 CTGGGATAGTGCGTGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAG  
 GACTGAAAATC

**>ICA 7 - *Iris lazica* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGTAATCCTGAGCCAAATCTT  
 TATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATAAAAAAGGATAG

GTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAACGATTAATCACGACCTG  
AATCCATTATATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAATCGAA  
GTTGAAGGAAGAATTGATCAGTGATCAAATCATTCCATTCCAGAGTTTGATA  
GATCTTTTGAAAACTAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCCCATT  
CTACATGTCAATACTGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATCCGT  
CGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAGGTCC  
ATTTTACCTCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCGCTGG  
TTTGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCC  
CATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAA  
GTCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTGCAGGGACTATGCCA  
AATTTGTTAATACTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCG  
ACTAGGATGGTGC GCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGA  
GGACTGAAAATC

**>ICA 8 - *Iris barnumae* f. *barnumae* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
TCCATTATAATTATATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCCATTCCAGAGTTT  
GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
CCGTGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAA  
GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATC  
AATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTT  
TCACAAAAGGATCTAAAATAAAATCTTTGGATCTTATCCAATCTGGTTTGG  
ATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATT  
ATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCT  
TCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATT  
TGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTA

GGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGA  
CTGAAAATC

**>ICA 9 - *Iris barnumae* f. *urmiensis* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
TCCATTATAATTATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAATCCAGAGTTT  
GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAA  
GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCA  
ATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTT  
CACAAAAGGATCTAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGGGA  
TAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTAT  
TGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTC  
TTTTTGAATGAAGATCTAACTAAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATTT  
GTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTAG  
GATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACT  
GAAAATC

**>ICA 10 - *Iris germanica* x *Iris albicans* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAAT  
CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG



AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
 AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
 CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTCATC  
 TTCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACT  
 CTTTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTT  
 TGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCC  
 ATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAG  
 TCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAA  
 ATTTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGAC  
 TAGGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGG  
 ACTGAAAATC

**>ICA 11 - *Iris germanica* x *Iris schachtii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
 CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAAT  
 CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
 AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
 AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
 CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTCATCTT  
 CATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCT  
 TTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTG  
 GATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCAT  
 TATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTC  
 TTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAAT  
 TTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTA  
 GGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGA  
 CTGAAAATC

**>ICA 12 - *Iris germanica x Iris schachtii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAAT  
CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTCATC  
TTCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACT  
CTTTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTT  
TGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCC  
ATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAG  
TCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAA  
ATTTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGAC  
TAGGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCTGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGG  
ACTGAAAATC

**>ICA 14 - *Iris sari x Iris schachtii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
TCCATTATAATTATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAATCCAGAGTTT  
GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAA  
GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCA

ATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTT  
CACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGG  
TAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTAT  
TGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTC  
TTTTGAATGAAGATCTAAACTAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATTT  
GTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTAG  
GATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACT  
GAAAATC

**>ICA 15 - *Iris sari x Iris schachtii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

ACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCAA  
ATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTTA  
TTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGTG  
CAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAAT  
CCATTATAATTATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAATC  
GAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCCAGAGTTTG  
ATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCCC  
ATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATC  
CGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAG  
TCCATTTTATTCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCAA  
TGGTTCAAACAAAATTCAATATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTTC  
ACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGGAT  
AGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTATT  
GAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTCT  
TTTTGAATGAAGATCTAAACTAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATTTG  
TTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTAGG  
ATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTG  
AAAATC

**>ICA 16 - *Iris sintenisii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTGGGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT

ATTTTGAGAAAACAAACAGGAGTTTAAAACTAGAATAAAAAGGGGATAGG  
 TGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAACGATTAATCACGACCTGA  
 ATCCATTATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGATTTATTCCAATCGAAG  
 TTGAAGGAAGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCCAGAGTTTGATAG  
 ATCTTTTGAAAAACGAATTAATCAGAAAAGAATAAAGAGAGAGTCCCATTCC  
 TACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATCCGTC  
 GACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAGTCCA  
 TTTTACTTCCTAACTATTTAGTTTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCAATGGT  
 TCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTTCCCAAAAAGGAT  
 CCAGACTGAAATCTTTGGATCGATCTTATCCCAATTTGGTTTGGATAGATAT  
 GATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTATTGAATCA  
 TTCACAGTCCATATCATTATCCTTATGTTTACTACAAAGAAAGTCTTCCTTTT  
 GAATGAAGATCTAAACTAAGAAATTACAGGAACTATGTCAAATTTGTTAA  
 TGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAACAAGTACTCGACTAGG  
 ATAGTGCGTGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTG  
 AAAATC

**>ICA 17 - *Iris stenophylla* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTACGGAAACCTGCTAATTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTTA  
 TTTTGAGAAAACGAACACGGATTTAAAACTAGAATAAAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAACGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATCATTATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
 CAAAGTTGAAGGAAGAATAGATCAGTGATCAAATCATTCCGGAGTTT  
 GATAGATCTTTTGAAAAACGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
 CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
 CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAA  
 GTCCATTTGACTTCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCA  
 ATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTTCACAAA  
 AGGATACGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGGATAGATA  
 TGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTATTGAATC  
 ATTCACAATCCATATCATTATTCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTCTTTTTGA

ATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGTCAAATTTGTTAATG  
 CTTTGGCAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTAGGATGTCCG  
 CGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAATC

**>ICA 18 - *Iris suaveolens* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACAAACAAGGGTTTAAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
 CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAAT  
 CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
 AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
 AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
 CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCTAACTATTTATATCTTTTTTTTTTTTTTCA  
 TCTTCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTA  
 CTCTTTCACAAAAGGATCCGAACTCAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGG  
 TTTGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCC  
 CATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAA  
 GTCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCA  
 AATTTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCG  
 ACTAGGATGGTGC GCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGA  
 GGACTGAAAATC

**>ICA 19 - *Iris germanica* x *Iris schachtii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATAATTATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
 CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAATCCAGAGTTT

GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
 CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
 CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAA  
 GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCTTCATCCATCA  
 ATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCTTT  
 CACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTGGGA  
 TAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCATTAT  
 TGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTCTTC  
 TTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAATTT  
 GTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTAG  
 GATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACT  
 GAAAATC

**>ICA 20 - *Iris purpureobracteata* x *Iris schachtii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATCATGATATATGCAAATATATGCAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
 CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAAT  
 CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
 AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
 AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
 CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTCATC  
 TTCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACT  
 CTTTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTT  
 TGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCC  
 ATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAG  
 TCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAA  
 ATTTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGAC  
 TAGGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGG  
 ACTGAAAATC

**>ICA 21 - *Iris germanica x Iris albicans* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTATT  
CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTCATC  
TTCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACT  
CTTTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTT  
TGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCC  
ATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAG  
TCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAA  
ATTTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGAC  
TAGGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCTGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGG  
ACTGAAAATC

**>ICA 22 - *Iris germanica x Iris albicans* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTATT  
CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC

CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTTCATC  
 TTCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACT  
 CTTTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTT  
 TGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCC  
 ATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAG  
 TCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAA  
 ATTTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGAC  
 TAGGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGG  
 ACTGAAAATC

**>ICA 23 - *Iris purpureobractea* (Kolşisin Mutantı) örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAATACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
 CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTATT  
 CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
 AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
 AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
 CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTTTTCA  
 TCTTCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTA  
 CTCTTTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGG  
 TTTGGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCC  
 CATTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAA  
 GTCTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCA  
 AATTTGTTAATGCTTTTGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGA  
 CTAGGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAG  
 GACTGAAAATC

**>ICA 24 - *Iris sari* x *Iris albicans* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL*-F bölgesi baz dizisi**



GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCGAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATAATTATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
 CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAATCCAGAGTTT  
 GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
 CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
 CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAA  
 GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTTCATCTTCATCCAT  
 CAATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCT  
 TTCACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTG  
 GATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCAT  
 TATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTC  
 TTCTTTTTGAATGAAGATCTAAACTAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAAT  
 TTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATAACAAGTACTCGACTA  
 GGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGA  
 CTGAAAATC

**>ICA 25 - *Iris germanica* x *Iris schactii* örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi baz dizisi**

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAACTAGAATCAAAAAGGATAGGT  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATCATTATATATGCAAATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGAT  
 CTATTCCAATCGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTCAAT  
 CCAGAGTTTGATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAG  
 AGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAA  
 AAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCC  
 CAATAAAAAGTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTCATCT  
 TCATCCATCAATGGTTCAAACAAAATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTC  
 TTTCACAAAAGGATCCGAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTT

GGATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCA  
 TTATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGT  
 CTTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAA  
 ATTTGTTAATGCTTTTGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGAC  
 TAGGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCTGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGG  
 ACTGAAAATC

>ICA 26 - *Iris sari* (Doğal Melez) örneğine ait cpDNA *trnL* intron ve *trnL-F* bölgesi  
 baz dizisi

GACTTGATTGAATTGAGCTTTAGTATGGAAACCTGCTAAGTGGTAACTTCCA  
 AATTCAGAGAAACCCTGGAAAAAAGGGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTT  
 ATTTGAGAAAACGAACAAGGGTTTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAA  
 GCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAATCAAATGATTAATCACGACCTGAA  
 TCCATTATAATTATATATGCAAAATTCAGAGCTATTGTGGATCTATTCCAAT  
 CGAAGTTGAAGGAGGAATCGATCAGTGATCAAATCATTATTCCAGAGTTT  
 GATAGATCTTTTGAAAAATGAATTAATCAGAAGAGAATAAAGAGAGAGTCC  
 CATTCTACATGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAAT  
 CCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAA  
 GTCCATTTTATTTCCCTAACTATTTATATTCTTTTTTTTTTTTCATCTTCATCCAT  
 CAATGGTTCAAACAAAATTCAATATTCAATATCTTTCTCATTAAATTCTACTCT  
 TTCACAAAAGGATCTAAACTAAAATCTTTGGATCTTATCCCAATCTGGTTTG  
 GATAGATATGATACCTGTACAAATGAACATGTATGGGCAAGTAATTCCCAT  
 TATTGAATCATTACAGTCCATATCATTATCCTTACGTTTACAAAGAAAGTC  
 TTCTTTTTGAATGAAGATCTAAAATAAGAAATTACAGGGACTATGCCAAAT  
 TTGTTAATGCTTTGGTAGTCTCTTTAATTTACATAGATACAAGTACTCGACTA  
 GGATGGTGCGCGGTAAAAGGTCTGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGA  
 CTGAAAATC

## ÖZGEÇMİŞ

20.07.1986 tarihinde Adana’da doğdu. Orta öğretimini Antalya Anadolu Lisesi’nde 2004 yılında tamamladı. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne girip, son sene tercih ettiği Bitki Biyoteknolojisi Kümesi’nden 2010 yılında mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Botanik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

### **Kongre Katılımı**

**Berk Baştuğ**, Mine Türktaş, Fahriye Ertuğrul, Özge Karakaş Metin, Tamer Özcan, Tijen Oğraş, Erdal Kaya. Phylogenetic Analysis of Turkish *Iris* Species inferred from non-coding chloroplast region. 15. European Biotechnology Congress Proceeding Book. *New Biotechnology* vol.295 p. 131. 23-26 September 2012, Istanbul-TURKEY, (Poster).

### **Yayın**

TÜRKTAŞ M., KARAKAŞ METİN Ö., BAŞTUĞ B., ERTUĞRUL F., İZGİ SARAÇ Y. KAYA E., Molecular Phylogenetic Analysis of *Tulipa* (Liliaceae) Based on Noncoding Plastid and Nuclear DNA Sequences with an Emphasis on Turkey, *Botanical Journal of Linnean Society*, 4 Şubat 2013 tarihinde basım için kabul edildi.

