

Zeynep ELİBOL

Yüksek Lisans Tezi

KÜ 2009

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DEKİ BAZI *FERULA* L. (APIACEAE) TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER TEKNİKLER KULLANARAK
TAKSONOMİK OLARAK İNCELENMESİ

ZEYNEP ELİBOL

TEMMUZ 2009

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DEKİ BAZI *FERULA* L. (APIACEAE) TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER TEKNİKLER KULLANARAK
TAKSONOMİK OLARAK İNCELENMESİ

ZEYNEP ELİBOL

TEMMUZ 2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürünün onayı

01/07/2009

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

Müdür V.

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Doç. Dr. Yusuf MENEMEN

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Perihan GÜLER

Doç. Dr. Yusuf MENEMEN

Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ BAZI *FERULA* L. (APIACEAE) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLER KULLANARAK TAKSONOMİK OLARAK İNCELENMESİ

ELİBOL, Zeynep

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yusuf Menemen

Temmuz 2009, 93 sayfa

Bu çalışmada, *Ferula* cinsine ait bazı türlerde tohumların endospermilerinden elde edilen nrDNA ITS bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltıldı; ürünlerin dizi analizi yapılarak türler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıklar ortaya konularak aralarındaki akrabalık ilişkileri taksonomik olarak araştırıldı.

nrDNA ITS çalışmalarında kullanılmak üzere bazı *Ferula* türlerinin sağlam ve olgun tohumlarından genomik DNA izolasyonu bir tür (*Ferula szowitsiana*) hariç ilk defa gerçekleştirildi. Taksonların ITS bölgeleri evrensel ITS primerleri kullanılarak PCR yoluyla çoğaltıldı. Örnekler arasında, ITS bölge uzunluğunun 692 ile 700 bp arasında değiştiği tespit edildi. Elde edilen ITS dizileri ClustalW programı yardımıyla, analiz işlemlerinde kullanılmak üzere hizalandı. Tüm örneklerle ait ITS baz dizileri PAUP 4.0b.10 programı kullanılarak analiz edildi ve

Çalışılan *Ferula* türleri arasındaki akrabalık ilişkilerini gösteren hem parsimoni hem de komşu bağlantı ağacı oluşturuldu.

Moleküler verilerden elde edilen sonuçlar morfolojik karakterlere dayalı sınıflandırma ile karşılaştırılmış ve çalışılan taksonlar arasındaki ilişkiler ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen moleküler veriler ile yapılan parsimoni analizi ve komşu bağlantı analizi ağacı bu cinsin altcins ve seksiyonlar seviyesinde ayrılarak sınıflandırılmasını desteklemiştir. Ayrıca bu çalışma cinsin monofiletik olmayıp, polifiletik olabileceği hususunda ipuçları vermiştir.

Anahtar Kelimeler: Apiaceae, *Ferula*, filogeni, ITS, kladistik analiz, PCR

ABSTRACT

A TAXONOMICAL STUDY ON SOME *FERULA* L. (APIACEAE)
SPECIES FROM TURKEY USING
MOLECULAR TECHNIQUES

ELİBOL, Zeynep

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof Dr. Yusuf Menemen

July 2009, 93 Pages

In this study, nrDNA ITS regions obtained from endosperms of seeds of some species belonging to the genus *Ferula*, were amplified by PCR; taxonomic relationships were investigated by using genetic similarities and dissimilarities of sequence analyses of the products amongst the species.

It is the first time that genomic DNA of some *Ferula* species were isolated from healthy and mature seeds to use in nrDNA ITS studies except one species (*Ferula szowitsiana*). ITS regions of the taxa were amplified by PCR using universal ITS primers. It was determined that the length of ITS regions differs between 692 and 700 bp. Obtained ITS sequences were aligned by ClustalW program to use in analyses processes. ITS base sequences belonging to all samples were analysed by using PAUP 4.0b.10 program and parsimonious and neighbour

joining trees were both generated to display relationships amongst *Ferula* species studies.

The results obtained from molecular data were compared to classification based on morphologic characters and it was performed to clarify relationships amongst the taxa studied.

Parsimonic and neighbour joining trees based on molecular data in this study supported the classification of this genus dividing in the level of subgenera and sections. Also the study gave clues about that this genus might be polyphyletic.

Key words: Apiaceae, cladistic analysis, *Ferula*, ITS, PCR, phylogeny

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın planlanması ve yűrűtűlmesinde her tűrlű yardım, űneri ve eleőtirilerini esirgemeyen tez danıőmanım Sayın Do. Dr. Yusuf Menemen'e alıőmamda gűsterdiėi ilgi ve sabrından dolayı teőekkűrlerimi sunarım.

Tezimin her aőamasında yardımlarını ve desteklerini gűrdűėűm aileme űzellikle anneme ve babama teőekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Ribozom ve Ribozomal DNA (rDNA)	15
1.2. ITS (Internal Transcribed Spacer).....	19
1.3. DNA Dizi Analizi	20
1.4. Filogenetik sistem	21
1.4.1. Parsimoni (tutarlılık)	21
1.4.2. Kladistik Analiz	23
1.4.2.1. Analiz Programının İşlemesi.....	24
1.5. Çalışmanın Amacı.	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
2.1. Örneklerin Toplanması.....	27
2.2. DNA İzolasyonu ve Koşturulması	29
2.2.1. DNA İzolasyonu	29

2.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	30
2.2.3. Jel Elektroforezi	31
2.2.4. Etidyum Bromür Boyasının Hazırlanması.....	31
2.2.5. Minijel Elektroforez İçin %1 lik Agaroz Jel Hazırlanması.....	31
2.2.6. DNA'nın Yüklenmesi	32
2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile ITS bölgesinin çoğaltılması.....	32
2.3.1. ITS5 ve ITS4 Primerlerinin Çözülmesi	34
2.3.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	34
2.3.3. Minijel Elektroforezi İçin %1.5 luk Agaroz Jel Hazırlanması....	35
2.3.4. DNA'nın Yüklenmesi	35
2.4. DNA Dizi Analizi.....	36
2.5. Filogenetik Analiz	36
2.5.1. Kladogram ve Dendrogram Oluşturulması	36
2.6. <i>Ferula</i> Meyvelerinin Fotoğraflanması	37
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
3.1.Çalışmada Kullanılan Türlerin Meyve Özellikleri	38
3.2. DNA İzolasyonu.....	40
3.3. DNA Konsantrasyonu	41
3.4. nrDNA ITS Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Çoğaltılması .	42

3.5. nrDNA ITS Bölgesinin Dizi Analizi ve Düzenlenmesi	43
3.6. ITS Dizilerindeki Nükleotidlerin Karşılaştırılması	56
3.7. <i>Ferula</i> Cinsine Ait Türlerin nrDNA ITS Baz Dizileri Kullanılarak Yapılan Kladistik Analiz.....	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

2.1. Bu çalışmada kullanılan tohum materyallerinin etiket bilgileri	27
3.1. <i>Ferula</i> türlerine ait DNA konsantrasyonları	41
3.2. Sıralanabilir DNA baz sayıları	49
3.3. Karşılaştırılan örneklerin dizilerinin içerdiği baz sayıları	57
3.4. Taksonlar arasındaki baz sıklığı	58
3.5. ITS dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen taksonların doğrudan eşleştirme değerleri (PAUP 4.0b.10 DISTANCE MATRIX seçeneği)	62
4.1. Bu çalışmada yer alan taksonların endemizm durumları ve tehlike kategorilerinin karşılaştırılması	67
4.2. <i>F. coskunii</i> ve <i>F. mervynii</i> 'nin karşılaştırılması	71
4.3. <i>F. haussknechtii</i> ve <i>F. halophila</i> 'nın karşılaştırılması	75
4.4. <i>F. longipedunculata</i> , <i>F. orientalis</i> ve <i>F. elaeochytris</i> 'in karşılaştırılması	79
4.5. <i>Ferula szowitsiana</i> ve <i>F. hermonis</i> 'in karşılaştırılması	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. <i>Ferula</i> bitkisi	5
1.2. 18S-26S nüklear ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgesi	19
2.1. Amplifikasyon reaksiyonlarında kullanılan ITS5 ve ITS4 primerlerinin rDNA 'daki yerleşimi	33
3.1. <i>Ferula</i> cinsine ait bazı türlerin meyve görüntüleri	38
3.2.a. Bazı <i>Ferula</i> türlerine ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	40
3.2.b. Bazı <i>Ferula</i> türlerine ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	40
3.3. Bazı <i>Ferula</i> türlerinin nrDNA ITS bölgelerinin PCR sonuçları	42
3.4. <i>Ferula halophila</i> 'ya ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri	43
3.5. <i>Ferula elaeochytris</i> 'e ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri	44
3.6. <i>Ferula longipedunculata</i> 'ya ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri	44
3.7. <i>Ferula</i> sp. 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri	45
3.8. <i>Ferula haussknechtii</i> 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri	45

3.9. <i>Ferula szowitsiana</i> 'ya ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri.....	46
3.10. <i>Ferula mervynii</i> 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri.....	46
3.11. <i>Ferula coskunii</i> 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri.....	47
3.12. <i>Ferula orientalis</i> 'e ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri.....	47
3.13. <i>Ferula hermonis</i> 'e ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri.....	48
3.14. <i>Heteromorpha</i> 'ya ait ITS (ITS1, ITS2) bölgesinin baz dizileri	48
3.15. <i>Ferula</i> türlerine ait dizilerin ClustalW programı ile düzenlenmiş hali.....	56
3.16. <i>Ferula</i> cinsine ait türlerin ITS dizileriyle PAUP 4.0b.10 programında yapılan kladistik analizi sonucunda Strict consensus trees seçeneğine göre elde edilen kladogram	61
3.17. İformatif diziler ile yapılan Neighbour – Joining dendrogramı	63

SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
m	Metre
μ	Mikron
mm	Milimetre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
V	Hacim (Volume)
rpm	Dakikadaki dönüş hız birimi (revolution per minute)
dk	Dakika
μ m	Mikrometre

KISALTMALAR DİZİNİ

GAZİ	Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbariumu
bp	Baz Çifti
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
dCTP	Deoksisitozintrifosfat
dGTP	Deoksiguanintrifosfat
dTTP	Deoksitimintrifosfat
ddNTP	Dideoksinükleotittrifosfat
TBE	Tris Base, Borik asit, EDTA
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ITS	İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer)
ITS1	İnternal Transcribed Spacer1
ITS2	İnternal Transcribed Spacer2
LSU	Büyük Alt Ünite (Large Subunit)
MP	Maksimum Parsimoni
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
NJ	Neighbour Joining
nrDNA	Nüklear ribozomal DNA
OD	Optik Dansite
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

MacClade	Maddison and Maddison
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SSU	Küçük Alt Ünite (Small Subunit)
TE	Tris Edta
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin
CI	Consistency Index (=tutarlılık değeri)
HI	Homoplasy Index (=karmaşıklık değeri)
sdH ₂ O	Steril distile su
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
PAUP	Phylogenetic analysis using parsimony
IGS	İntergenik ara bölgeleri (Intergenic Spacer)
CR	Kritik olarak tehlikede (Critical endangered)
EN	Tehlikede (Endangered)
VU	Zarar görebilir (Vulnerable)
LC	En az endişe verici (Least concern)

1. GİRİŞ

Türkiye, floristik çeşitlilik açısından dünyanın önde gelen ülkelerinden biridir. Bunun en önemli nedenleri; iklim, topoğrafya, jeolojik koşullar, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükseklik farklılıkları ve ekolojik başkalıklardır^(1,2).

En son 2000 yılında basılan Türkiye Florası'nın 11.cildindekiler ve daha sonra yayınlanan taksonlarla birlikte yurdumuzdaki tür sayısı yaklaşık 10.000 ve takson sayısı ise 13.000 civarındadır⁽³⁾.

Yeryüzünde 300 cins ve 3000 den fazla türle çok geniş ve yaygın bir dağılım gösteren Apiaceae familyasının alternatif adı olan Umbelliferae ismi, çiçek durumunun bileşik bir umbelladan şekil almasından türe⁽⁴⁾. Türkçede Maydanozgiller olarak bilinen bu familya, karakteristik şemsiye (umbel) tipindeki çiçek durumu ve olgunlaştığında ortadan ikiye bölünen meyvesi (şizokarp) ile doğada çok kolay tanınabilmektedir. Apiaceae, Türkiye Florası'nda 100 cins ve 435 tür ile en fazla taksona sahip üçüncü familya olarak yer almaktadır⁽⁵⁻⁷⁾. Çağın⁽⁸⁾, yurdumuz florasında Maydanozgiller familyasından 136 endemik tür bulunduğunu, bunların en yoğun olarak Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde ve en az Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösterdiğini belirtmiştir.

Apiaceae familyası, çok fazla türle temsil edildiği için yakından ilişkili cinsler ve türler arasındaki taksonomik problemleri çözmede güçlüklerle karşılaşmaktadır. Familya; tek yıllık, iki yıllık, çok yıllık otlar ve nadiren çalimsı bitkilerden oluşur.

Yapraklar, genellikle alternat (aralarında belli bir açı bulunan yaprak dizilişi), bazen karşılıklı veya halka şeklinde dizilmiş pinnat (bileşik yaprak) veya çok parçalıdır. Çiçek durumu umbella (şemsiye) şeklindedir. Brakte (taşıyıcı yaprak) ve brakteoller (çiçek sapının üzerinde bulunan küçük yaprakçık) çiçek durumunun tabanında bir halka şeklindedir. Çiçekler alt durumlu (epigin), hermafrodit veya tek eşeylidir. Sepaller (çanak yaprak) küçük veya yoktur. Petaller (taç yaprak) 5 adet olup beyaz, sarımsı yeşil, sarı, açık mavi veya pembe renkte olabilir^(6,9). Stamenler 5 adettir. Meyve şizokarp olup, 2 ya da nadiren tek karpellidir. Karpeller silindirik veya yandan ya da sırttan basık olup karpofor denilen bir sapla ayrılmışlardır. Olgunlukta merikarplar ayrılır. Her merikarpta (meyve parçası) genellikle 5 birincil kosta, bazen de primer kostalar arasında sekonder kostalar bulunur. Çıkıntılar bazen kanatlı veya dalgalı olabilir. Çıkıntılar arasında girintiler bulunur. Genellikle salgı kanalları vardır. Ovüller sarkık ve her lokulusta 1 tanedir. Stiluslar 2 tane, genellikle genişlemiş tabana sahip olup, meyve olgunlaştığında stilopodiyumu oluşturur^(9,10).

Apiaceae familyasına ait bazı bitkiler, insanlar ve hayvanlar tarafından çok yaygın olarak tüketilmektedir. *Daucus carota* L. (havuç) ve *Pastinaca sativa* L. (yabani havuç) kökleri insanlar tarafından yenen, uluslararası üne sahip bitkilerdir⁽¹¹⁾. Bu familyanın çok sayıda türü evlerimizde baharat (örneğin, *Anethum graveolens* L.=dereotu, *Cuminum cyminum* d'Urv.=kimyon) olarak, birçok türü de ilaç sanayinde (örneğin, bazı *Ferula* türleri ve *Cuminum cyminum*) kullanılmaktadır. Uçucu yağlar bakımından çok zengin olan bu familya içerisinde *Ferula sumbul* Kauffm. ve *Opopanax chironium* L. gibi bazı türler parfümeri sanayinde, *Heracleum mantegazzianum* Leiver ve çok sayıda tür süslemecilikte, *Heracleum sphondylium* L. ise alkollü içki yapımında kullanılmaktadır⁽¹²⁾.

Eski Roma ve Çin’de Apiaceae familyasına ait farklı droglar (parçalar, kuru kısımlar) kullanılmış ve bu ülke kültürlerinin gelişiminde etkili olmuştur. Apiaceae familyasına ait kullanılan droglar arasında *Ferula* cinsine ait kurutulmuş parçalar çok yaygındır⁽¹³⁾.

Ayrıca baldıranotu, subaldıranı ve bodur baldıran gibi pek çok zehirli tür dışında; maydanoz, kereviz, karakavza, rezene, anason ve kişniş gibi bitkiler vardır; bunlar, sebze, şifalı bitki ve baharat olarak kullanılmaktadır. Çadırışağı ve keçiyayağı gibi bazı türlerden de uzun süre şifalı bitki olarak yararlanılmıştır. Boğadikenini ise afrodisyak ve iştah arttırıcı özellikleri nedeniyle korumaya alınmış tıbbi bir bitkidir⁽⁸⁾.

Yurdumuzda 23 tür ve dört alt tür⁽⁷⁾ ile temsil edilen *Ferula* L. cinsi bitkileri otsu, çok yıllık, monokarpik veya polikarpik, çoğunlukla soğan (*Allium*) gibi kokan bitkilerdir. Kazık kök kuvvetli olup, odunsudur. Gövde dallanması, alternat, karşılıklı veya vertisillat olup, gövde tabanı lifsi artık kınlarla örtülüdür. Gövde 0.2-10 cm çapında, (20-)50-250(-500) cm uzunluğunda, genellikle sağlam yapılı, dik, silindirik, genellikle belirgin oluklu, yeşilimsi-mumsu veya menekşe renktedir. Tabanda bulunan alt gövde yapraklarının ayası genellikle triangular-ovat, yaprak sapı genişleyerek gövdeyi sarıcı, tüylü ya da tüysüz, yaprak sapının kınsız kısmı 0-50 cm; yaprak ayaları 3-7 pinnat, yaprak segmentleri ovat-oblong, filiform-setaceous ile linear arasında değişmekte, segmentler 1-70 mm, tüylü ya da tüysüz, uçları akut-akuminat, segment loplari bazen 1-2 pinnatisektir. Üst gövde yaprakları kınlı olup oblong-ovat ile lanseolat arasında değişmektedir; daha yukarılarda giderek küçülmektedir. Kınlar çok iyi gelişmiş, genellikle derimsi, gövdeyi sarıcıdır. Çiçek durumu panikulat-korimboz, çiçekler genellikle hermafrodit, bazen yan umbellerde erkek organlar gelişmiştir. Dallanma seyrek veya sık, tabana yakın veya uzaktır.

Merkezi umbellalar verimli, saplı veya sapsız, raylar genellikle dik yükselcidir. Yan umbellalar genellikle verimsiz, uzun saplı olup bazen yan umbel yoktur. Umbellulalar 6-55 çiçekli, olgun meyve sapı 1-20mm'dir. Brakteler yoktur. Brakteoller birkaç tane çok küçük, tüylü veya tüysüz, dökülücü bazen yoktur. Sepaller körelmiş veya yoktur. Petaller genellikle sarı renkte, tüysüz veya nadiren tüylüdür. Merikarplar; sırtta basık şekilde yassılaştırmış, eliptik-oblong ile ovat-obovat arasında değişmekte, 5-20 x 3-15 mm, olgunlaştığında kahverengiden kremi renge kadar değişiklik gösterirler. Sırttaki kanatlar genellikle filiform, yan taraftakiler 0.3-4 mm genişliğindedir. Merikarplar stilopodyuma yakın tarafta şişkin veya değil, kommissural yüzeyleri genellikle düz, nadiren asperousdur. Stilus kalıcı veya dökülücü olup genellikle başcıklı; stilopodyum konikal veya terete; reçine kanalları belirgin veya değil, sırt kısmındaki her valekulada 1-6, kommissuralda ise 2-10 reçine kanalıdır. Kommissural taraftaki reçine kanalları karpofora yakın veya uzaktır. Karpofor tabanda iki yarıklıdır. Tohum yüzeyi düz veya az konkavdır. Meyveler ve taban yaprakları tam doğru bir teşhis için çoğu zaman gereklidir^(7,14,15).



Şekil 1.1. *Ferula* bitkisi⁽¹⁶⁾

Literatürde *Ferula* isminin ilk kullanılışı Linne (1753) ile başlar. Linne, ilk olarak *Ferula communis*'i isimlendirmiştir⁽¹⁷⁾. Linne'den sonra ilk ciddi araştırmayı Boissier⁽¹⁸⁾ yapmıştır; çalışmasını 'Flora Orientalis' adlı eserde toplamıştır. Boissier, bu eserde tüm *Ferula* türlerini üç seksiyon altında toplamıştır; bu seksiyonlarda toplam 29 tür belirtmiştir. Boissier⁽¹⁹⁾ 1888'de, yayınladığı ek cilttekilerle beraber toplam 30 tür vermiştir. Boissier, bu seksiyonları yaparken merikarplardaki vittae sayıları ve petallerin şeklini temel almıştır.

Ferula cinsi, Güney-Batı Avrupa, Orta Avrupa, Orta Asya, Çin, Afganistan, Suriye, Filistin-İsrail, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'ya kadar geniş bir coğrafyada yayılış gösterir. *Ferula* cinsinin gen merkezi Orta Asyadır. *Ferula* cinsi, Apiaceae familyasından dünyada en fazla tür içeren üçüncü cins olması yönü ile de ilginçtir. Dünyada şu ana kadar yaklaşık 445 *Ferula* taksonu yayınlanmıştır; bunların büyük bir kısmı sinonimdir⁽²⁰⁾. *Ferula* cinsi, günümüz dünyasında yaklaşık 180-185 tür ile temsil edilir⁽²⁰⁻²²⁾.

Ferula cinsi ile ilgili 1947 yılında Korovin tarafından yapılmış bir monograf çalışması vardır. Korovin, tüm *Ferula*'ları altı altcinsle ayırmıştır. Korovin'den sonra yazılan Filistin florasında sekiz *Ferula* türü belirtilmiştir. Ancak burada bu altcinsler kullanılmamıştır. Türler seksiyon adı altında verilmiştir. Seksiyonlar ise Boissier'in sınıflandırması dikkate alınarak sunulmuştur^(23,24). Suriye florasında da sekiz *Ferula* türü vardır. Buradaki türlerin verilisinde herhangi bir altcins ve seksiyon ayırımı yapılmamıştır^(25,26). İran Florasında ise 53 tür vardır. Bu bitkiler, altcins kullanılarak Korovin'in Monografına uygun şekilde verilmiştir^(27,28).

Sağiroğlu (2005)⁽⁷⁾, doktora çalışmasında Türkiye'deki *Ferula* cinsinin revizyonunu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada *Ferula* cinsi yeni tanımlanan türler de dahil edilerek altcins ve seksiyonlara ayrılmıştır.

Sağiroğlu (2005)⁽⁷⁾, cinsin ülkemizde 23 tür ve dört alt tür olmak üzere 27 taksonla temsil edildiğini belirtmiş; bunların ülkemizdeki yayılışlarını göstermiştir. Buna göre *Ferula* türleri genelde Akdeniz bölgesi, Antitoroslar, Tuz Gölü ve çevresindeki lokal alanlar, Amanos Dağları, Anadolu diagonalı ve Doğu Anadolu bölgesinde yayılış gösterirler. Endemizm açısından değerlendirildiğinde ise Amanos Dağları, Antalya-Akseki bölgesi, Karaman-Ermenek çevresi, Manisa-Bozdağı, Tuz

Gözü çevresi, Maraş-Binboğa Dağları, Erzincan-Malatya çevreleri, Muş-Bingöl ve Bitlis yöreleri bu cinsin farklılaşma merkezleridir.

Ferula taksonlarında yapılan çalışmalarda; benzoik asit, metanolik, kumarinler, antibakterial sesquiterpenoidler, terpenoidler, ferulenol, esterler, metanol, etanol, sülfidler, fosfolipidler, germacrane alcohol, 13 hidroksimetilen 12 tetradecatrien gibi kimyasallar tespit edilmiştir⁽²⁹⁾.

Ferula cinsinin bazı türleri insanlar tarafından tüketilmektedir. *Ferula meifoliae* türü çok eski tarihlerden beri bilinen ve kullanılan bir bitkidir. Doğu Anadolu'da haşlanıp acılığı giderildikten sonra gıda olarak kullanılır, turşusu yapılır. Ayrıca hayvan yemi olarak da kullanılır. Çakşır otu, kökleri toz edilip bal ile karıştırılıp kudreti arttırıcı olarak da kullanılmaktadır. Orta ve Doğu Anadolu dağlarında yetişen diğer bir *Ferula* türü, *F. rigidula* "suyabu" adıyla tanınır. Rayları (ışınları), Van bölgesinde hazırlanan, çok sevilen ve yenen meşhur "Otlu peyniri"nin içine konmakta ve özel bir tad vermektedir. Ülkemizde yetişmeyen, İran ve Türkistan'da yetişen *Ferula assa-foetida* türünün köklerinden elde edilen usâre "şeytan tersi" adını alır. Bu madde sarımsı esmer renkte, sarımsak kokusunda, soğukta sertleşen, sıcakta yumuşayan ve acı lezzettedir. İçerisinde, zambak, uçucu yağ ve organik asitler vardır. Sinir sistemini yatıştırıcı, hazmı kolaylaştırıcı ve kurt düşürücü etkileri görülür. Baharat olarak da Doğu ülkelerinde kullanılır⁽³⁰⁾. Ege bölgesinde ise kuru gövdesi baston olarak kullanılır. Orta Asya ve diğer bölgelerde kökleri kaynatılarak elde edilen süt sonradan hava ile temasta kahverenk alır ve donar. Bu, içecek olarak kullanılır. Köklerinden elde edilen özüt su ile karıştırılarak lapa yapılır ve yenir. Güzel kokulu ve ekşimsi bir tadı vardır⁽³¹⁾.

Anadolu'nun farklı bölgelerinde *Ferula* türlerine değişik isimler verilmektedir. Bunların başlıcaları çakşır, çağşır, çanşur, hiltik, hitik, asa otu, helizan, kerkur, siyabo ve kasnıdır⁽¹⁷⁾.

Ferula drogları, geçmişte insanlar tarafından çok değişik amaçlarla kullanılmıştır. Günümüzde de değişik şekillerde kullanıldığı görülmektedir. Günümüzde *Ferula* drogları; kuvvet verici (afrodizyak), vücudu güçlendirici, mikrop öldürücü, öksürük sökücü, kabızlıkta gevşetici olarak, hemoroid tedavisinde, idrar yolu hastalıklarında ve zehirlenmelere karşı panzehir olarak kullanılmaktadır⁽³²⁾.

Sistemik çalışmalar, diğer bitki gruplarında da olduğu gibi klasik olarak daha çok morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaya göre yapılmaktadır. Morfolojik karakterlerin yanında, kemotaksonomik yöntemler de kullanılmaktadır. Ancak bu çalışmaların bitki sistemik kategorilerini tanımlamakta yetersiz oluşu, son yıllarda taksonomi çalışmalarında daha çok moleküler yöntemlere ağırlık verilmesi ile sonuçlanmıştır⁽³³⁾.

DNA'nın yapısının ortaya çıkarılması ile başlayan ve 20. yüzyıla damgasını vuran "Gen Devrimi" pek çok disiplinde olduğu gibi bitki sistematiğinde de çok önemli yararlar sağlamıştır^(34,35). Günümüzde bitki türlerinin tanımlanmasında ve genetik varyasyonun araştırılmasında moleküler teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son 20 yıl içerisinde hızla gelişen moleküler teknoloji; çeşitlerin birbirleri arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi, kromozom haritalamaları, gen kaynaklarının karakterize edilmesi ve evrimsel gelişim analizi çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu yöntemler, klasik yöntemlere göre büyük avantajlar sağlamaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal tekniklerin uygulamadaki yetersizlikleri, moleküler tekniklerin uygulanmasıyla ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır.

Moleküler teknikler, diğer tekniklere göre daha fazla avantajlara sahip olup, evre faktörlerinden etkilenmezler ve polimorfizm oranları yüksektir. Aynı zamanda pleotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermediği ve son derece stabil olduğu belirtilmiştir⁽³⁶⁻³⁹⁾.

Bitki teşhisleri için geleneksel teşhis anahtarları, organizmaların morfolojik, anatomik ve nadiren kimyasal özelliklerine göre çalışırlar. Öncelikle organizmaların kesin belirlenebilmesi için değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmayabilir. Ayrıca, farklı habitatlarda yaşayınca organizmalar oldukça sık, birbirinden farklı, değişimler gösterebilirler. Böylece aynı türlere ait organizmalar farklı morfolojik ve anatomik özellikler kazanabilirler. Bu nedenle genotip, fenotipten daha stabildir. Morfolojik olarak ortaya çıkan çeşitlilik, genetik çeşitliliğin ancak küçük bir yüzdesini oluşturur. Genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı da morfolojiye yansımamaktadır. Morfolojiden elde edilen bilgiler, genetik farklılıkları belirlemede kullanılsa da genotip-evre etkileşimi, bir karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi ve bir genin birden fazla karakteri etkilemesi gibi nedenlerden dolayı her zaman yeterli olmamaktadır. Bu nedenle genotipleme konusunda DNA'ya bağlı olarak gelişmiş olan moleküler teknolojilerin çözüm olabileceği belirtilmiştir⁽³³⁾.

Soltis ve arkadaşları (1999)⁽⁴⁰⁾, moleküler filogeninin taksonomik problemleri zmeninin yanı sıra, taksonun coğrafik dağılım yerlerini test etmeye de imkan verdiğini, yüksek bitkilerin sınıflandırılmasında karşılaşılan sorunların, klasik

sınıflandırma yöntemlerinin yanı sıra filogenetik verilerin kullanılmasıyla da çözümlenebileceğini belirtmişlerdir.

Lowe ve arkadaşları (1996)⁽⁴¹⁾, nükleik asit temeline dayalı genetik markörlerin genom analizlerinde kullanımının ıslahçılar için ihtiyaç duyulan bir alan olduğunu, markörler kullanılarak genetik varyasyonun araştırılabileceğini (örneğin, birbirine çok yakın olan kültür çeşitlerinin ayrılıp tanımlanabileceğini) ve türlerin taksonomik tanımlamasının yapılarak filogenetik akrabalıkların bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Saiki ve arkadaşları (1985)⁽⁴²⁾, mevcut yöntemleri geliştirerek, duyarlılıklarını artırarak ve DNA'nın aslına sadık kalarak *in vitro* çoğaltma esasına dayalı bir teknik olan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'ı geliştirmişlerdir. Bu teknik, bitkisel ve hayvansal organizmaların filogenetik (akrabalık ilişkisi) sınıflandırmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

PCR ile spesifik DNA parçacıklarının çoğaltılması sağlanarak DNA polimorfizmi belirlenebilmektedir. Protein veya DNA markörlerine dayanan haritalar "moleküler haritalar" olarak adlandırılmaktadır. Birçok bitkide genetik uzaklık, moleküler, kimyasal ve morfolojik özellikler kullanılarak belirlenebilmektedir. Organizmalar arasındaki genetik varyasyonun daha iyi anlaşılabilmesi için bu araçların tamamına ihtiyaç duyulmaktadır^(43,44).

Baldwin ve arkadaşları (1995)⁽⁴⁵⁾, hiyerarşik düzeydeki değişikliğin çoğunlukla nükleotid polimorfizminden ya da insersiyon ve delesyonlardan kaynaklandığını ve nüklear ribozomal DNA'nın (nrDNA) Internal transcribed spacer (ITS) bölgelerinin öncü rRNA'nın işlenmesinde önemli düzenleyici (regülatör) bölgeler içerdiğini, bu nedenle de evrimsel olarak korunduklarını belirtmişlerdir. rRNA'nın olgunlaşması,

ITS dizilerindeki ve ikincil yapısındaki değişimlerle sağlanmaktadır. rDNA'nın ITS bölgesindeki ardışık tekrarların sayısı (tandem repeat) ve nükleotid değişimleri, türlerin tanımlanması, belirlenmesi ve ayrılmasında kullanılmaktadır. Morfoloji ve fizyoloji üzerine yapılan araştırmalarla birlikte, ITS dizi verileri de taksonlar üzerinde değerli bilgiler edinilmesini kolaylaştırmaktadır^(46,47).

Baldwin ve arkadaşları (1995)⁽⁴⁵⁾, Angiosperm filogenisi üzerine yapılan araştırmaların, 18S-26S nrDNA'nın, ITS bölgesi için çoğu angiosperm familyalarında filogenetik çalışmalar için karakterlerin yararlı bir kaynak olduğunu kanıtladığını ifade etmişlerdir. Bu bölgenin iki spacer'ı ITS-1 ve ITS-2 (her biri < 300bp) nin kolayca pcr ile amplifiye olan ve evrensel primerler kullanarak sekanslanan yapılar olduğunu, ayrıca yakın akraba angiospermilerin araştırılmış grupları içinde ITS1 ve ITS2'nin G+C içeriği benzerliğinin uygun olduğunu ve umulduğu gibi ITS sekans varyasyon düzeylerinin, filogenetik analiz için uygun, soya bağlı familyalar içinde çeşitli taksonomik düzeylerde bulunduğunu belirtmişlerdir.

Son yıllarda Apiaceae familyası üzerine filogenetik çalışmalar artmıştır. Downie ve arkadaşlarının⁽⁴⁸⁾ 2001'de Apiaceae familyasının altfamilyası olan Apioideae üzerine yaptıkları geniş bir filogenetik çalışma vardır. Bu çalışmada 55 cinse ait 74 tür incelenmiştir. Bu türler içinde üç *Ferula* türü (*F. communis*, *F. tingitana* ve *F. assafoiteda*)'de bulunmaktadır. Bu çalışmada, o ana kadar yapılan diğer çalışmalar da değerlendirilmiştir. Burada, Apioideae altfamilyası şu gruplara ayrılmıştır: Acipphyllae M.F. Watson & S.R. Downie, Bupleureae Spreng., Careae Baill., Echinophoreae Benth., Heteromorphae M.F. Watson S.R. Downie, Oenantheae Dumort., Pleurospermeae M.F. Watson S.R. Downie Pyramidopterae Boiss.,

Scandiceae Spreng ve Smyrnieae Spreng. Bu çalışmada, üç *Ferula* türü çalışılmış olmasına rağmen *Ferula* cinsi herhangi bir gruba koyulamayan cinsler arasında yer almıştır. Moleküler filogenetik çalışmalar sonucu *Ferula* ile birlikte herhangi bir gruba koyulamayan cinslerden ülkemizde bulunanlar şunlardır: *Ferulago* W.J. Koch, *Symirniopsis* Boiss., *Prangos* Lindl., *Opopanax* W.J.Koch, *Ligusticum* L., *Conium* L., *Cnidium* Cuss., *Bifora* Hoffm., *Azilia* Hedge & Lamond, *Levisticum* Hill.

Młynik ve arkadaşları (2008)⁽⁴⁹⁾, *Ferula*'nın taksonomik pozisyonunu belirlemek, cins altı akrabalıkları anlamak ve kladların sınırlandırılmasında bazı morfolojik ve fitokimyasal karakterlerin kullanımını değerlendirmek için nrDNA ITS sekanslarının sonuçlarını kullanmışlardır. Bunlara ek olarak sonuçlar *Ferula*'nın geleneksel sınıflandırma sistemine karşı kıyaslanmıştır. *Ferula* cinsi, cins tipi *F. communis* üzerine yerleşen ve onun varsayılan yakın türleri ile örneklenmiştir. Młynik ve arkadaşları (2008)⁽⁴⁹⁾, önceki moleküler sistematik çalışmalarda cinsin polifiletik olarak ifade edildiğini, kendilerinin nrDNA ITS sekanslarına bağlı olarak yaptıkları Maksimum parsimoni, Bayesian ve neighbour-joining analizlerinde *Ferula* (sensu lato)'nın monofiletik olarak ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

Ajani ve arkadaşları (2008)⁽⁵⁰⁾, İran Apiaceae'nin altfamilyası olan Apioideae'nin beş grubu içindeki akrabalıkları, nrDNA ITS sekanslarının filogenetik analizine dayanarak inceleyen bir çalışma yapmışlardır. İran florası'nın Apiaceae'nin endemik türlerince zengin olduğunu, çoğunun pek az araştırıldığını ve filogenetik akrabalıklarının bilinmediğini belirtmişlerdir.

Valiejo-Roman ve arkadaşları (2006)⁽⁵¹⁾, endemik ve ikinci derecede endemik İran Apiaceae taksonlarının çoğunluğunun filogenetik olarak incelenmediğini belirterek moleküler bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada, Apiaceae'nin bu

bölgede bulunan 28 cinsine ait 36 türün sistematüğını aydınlatmak için ITS sekans dizilerini kullanmışlardır.

Downie ve arkadaşları (2000)⁽⁵²⁾, hem Apiaceae'nin üyeleri hem de Scandiceae oymağı ve Apioideae'nin tüm büyük grupları arasında ITS(ITS1 ve ITS2) nükleotid sekans varyasyonunu kullanarak filogenetik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, 18 cinsi temsil eden 134 dizi analizi yaparak kladistik analiz yapmışlardır.

Bunların dışında, ITS (ITS1 ve ITS2) dizilerini temel alan, Apiaceae familyasına ait bir dizi moleküler filogenetik çalışma gerçekleştirilmiştir. Katz-Downie ve arkadaşları (1999)⁽⁵³⁾, Apioideae altfamilyasında 80 cinse ve 116 örneğe ait ITS çalışmasıyla evrimsel akrabalık çalışması yapmışlardır. Yazarlar, maksimum parsimoni ve neighbour-joining metotları kullanarak elde ettikleri sonuçlarla, şimdiye kadar filogenetik yerleşimleri sorunlu olan birkaç cinsin akrabalıklarının da açıklığa kavuştuğunu belirtmişlerdir.

Wang ve arkadaşları (2008)⁽⁵⁴⁾, Hengduan adalarında *Bupleurum* (Apiaceae) cinsinin kromozom sayımları ve nrDNA ITS sekanslarına bağlı olarak yaptıkları çalışmada, bu adaların, Çin'de Apiaceae'nin *Bupleurum* cinsi için çeşitlilik merkezi olduğunu belirtmişlerdir. Yang ve arkadaşları (2007)⁽⁵⁵⁾, Kuzey batı Çin'den *Bupleurum* türlerinin moleküler teşhisi için ITS sekans analizini kullanmışlardır. Spalik ve arkadaşları (2004)⁽⁵⁶⁾, geniş anlamda *Peucedanum*'un filogenetik pozisyonu, yakın cinsler ve onların Selineae (Apiaceae, altfamilyası Apioideae) oymağı içinde yerleşimi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Neves ve Watson (2004)⁽⁵⁷⁾, nrDNA ITS sekans bilgisine bağlı *Bupleurum* (Apiaceae) içinde filogenetik akrabalıklar üzerine bir çalışma yaparak, bu cinsin, uzun süredir doğal bir grup olarak tanıtıldığını, ancak cins altı sınıflandırmasının tartışmalı ve henüz sekans

bilgisinin ışığında çalışılmamış olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, *Bupleurum* cinsinin 32 türü (35 takson) arasındaki filogenetik akrabalıklar 18-26S nrDNA ITS bölgesinin karşılaştırmalı sekansı ile incelenmiştir.

Kabaoğlu (2007)⁽⁵⁸⁾, Türkiye’de bulunan *Hypogymnia* (Nyl.) türlerinde, rDNA ITS bölgesi dizi analizi ile çeşitliliğin tanımlanması amacıyla bir tez çalışması yapmıştır. Bu çalışmada, Türkiye’nin farklı illerinden toplanan *Hypogymnia* cinsine ait *Hypogymnia physodes*, *Hypogymnia tubulosa* türlerinin rDNA ITS bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yardımıyla çoğaltılmış ve ilgili bölgeleri dizi analiziyle incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, *Hypogymnia physodes* (Gümüşhane), *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) türlerinden elde edilen ITS dizileri, gen bankasından elde edilmiş iki *Hypogymnia* türü (H4phyAF141368 (İsveç), (H6phyAF058036 (İsveç) ve bu gruba yakınlığıyla bilinen Türkiye’den toplanmış farklı üç liken (*Neofuscelia pulla* (Bolu, Mengen), (*Melanelia septentrionalis* (Karabük), (*Parmelina tiliaceae* (Karabük) türünün dizileri referans alınarak incelenmiş ve dendrogram oluşturulmuştur. Bu dendrogramda, Gümüşhane ve İsveç kökenli *Hypogymnia physodes* örnekleri bir grup, *Hypogymnia tubulosa* (Antalya) türü ise tek başına ayrı bir grup oluşturmuştur. Grup dışı türler de ayrı bir grupta toplanmıştır. Bu çalışmada, Türkiye’de bulunan *Hypogymnia* cinsine ait 2 farklı türün (*Hypogymnia physodes*, *Hypogymnia tubulosa*) rDNA ITS bölgesi dizi analizi ile bu türler arasındaki muhtemel farklılıkların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Maraş (2008)⁽⁵⁹⁾, Türkiye Florasındaki bazı *Heracleum* L. (Umbelliferae) türlerinin tohumlarından elde edilen ITS DNA dizilerini temel alan filogenik bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, *Heracleum* türlerinin tanımlanmalarının, morfolojilerindeki küçük farklılıklardan dolayı zor olduğunu ve nükleer ribozomal

DNA'nın transcribe edilen dizilerinden (ITS) sağlanan verilerin türler arası karşılaştırmalara çok uygun düştüğünü ifade etmiştir. Maraş, gen bankasında sınırlı sayıda nükleotid dizi verilerinin yer aldığı, ayrıca bu verilerin çok geniş ve taksonomik olarak çok karmaşık olan Apiaceae familyasına ait bazı *Heracleum* cinsi türlerin tarihsel akrabalığını daha iyi anlamaya yardım edebildiği sonucuna varmıştır.

1.1. Ribozom ve Ribozomal DNA (rDNA)

Genetik bilginin ifadesindeki önemli rolünden dolayı, ribozomlar ayrıntılı olarak incelenmiştir. Prokaryot hücrelerde bu yapılardan yaklaşık 10.000 tane bulunur. Ökaryotik bir hücrede ise çok daha fazla sayıda ribozom vardır. Elektron mikroskobu ile bakteri ribozom çapının 12-20 nm olduğu ve bir büyük bir de küçük olmak üzere iki alt birimden oluştuğu gösterilmiştir. Her iki alt birim de bir ya da daha fazla rRNA ve çeşitli ribozomal proteinler içermektedir. İki alt birimin birleşerek tek bir ribozomu oluşturduğu yapı bazen monozom olarak adlandırılır. Prokaryotlarda monozom 70S'lik bir yapı iken, ökaryotlarda yaklaşık 80S'dir. Farklı büyüklükteki taneciklerin ve moleküllerin değişik hareket hızını yansıtan çökeltme katsayıları birbirinin toplamı değildir. Örneğin, prokaryotlardaki 70S monozomu 50S ve 30S alt birimlerinden, ökaryotlardaki 80S monozomu ise 60S ve 40S alt birimlerinden oluşmaktadır.

Prokaryotlarda, ribozomun büyük alt birimi bir 23S rRNA molekülü, bir 5S rRNA molekülü ve 31 farklı ribozomal proteinden oluşmuştur. Ökaryotik ribozomun büyük alt birimlerinde ise bir 28S rRNA molekülü, 5.8S ve 5S rRNA molekülü ve yaklaşık 50 farklı protein bulunur. Küçük prokaryotik alt birimler, bir 16S rRNA

bileşeni ve 21 protein içerir. Ökaryotik ribozomun küçük alt biriminde ise bir 18S rRNA bileşeni ve yaklaşık 33 protein bulunmaktadır.

Hücre, metabolik olarak ne kadar aktif ise ribozomun bir bileşeni olan ribozomal RNA'ya o kadar çok ihtiyacı vardır. Moleküler hibridizasyon çalışmaları, rRNA bileşenlerini kodlayan genlerin kopya sayısının kaç tane olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemle, özgül RNA dizilerini kodlayan genom yüzdesi tayin edilir. *E. coli* genomu, 23S, 16S ve 5S bileşenlerini şifreleyen tek bir DNA diziliminin yedi kopyasını bulundurur. Bu genlerin ilk transkripsiyon ürünü (transkript) 30S RNA olup, enzimatik olarak parçalanarak bu küçük bileşenlerine ayrılır. Bu üç RNA bileşeninin şifrenmesi ile ilgili genetik bilgiler bir araya getirildiğinde, birçok transkripsiyonel olayın ardından ribozomal yapı oluşturulur; üç bileşenin eşit miktarlarda ortamda bulunması sağlanır.

Ökaryotlarda, 28S ve 18S rRNA'larını kodlayan DNA dizisinin çok daha fazla kopya sayısı bulunmaktadır. *Drosophila*'da, haploit genom başına 120 kopya bulunur; bunların ilk transkriptleri 34S RNA molekülüdür. Bu RNA'nın işlem görmesi sonucu, 28S, 18S ve 5.8S rRNA'lar meydana gelir. Bunlar *E. coli*'deki üç RNA bileşeninin homologlarıdır. *Xenopus laevis*'de, genom başına 500'ün üstünde kopya bulunur. Memeli hücrelerinde oluşan ilk transkript 45S RNA'dır⁽⁶⁰⁾. Bu rRNA'ları kodlayan genler ribozomal DNA (rDNA) üzerinde bulunur. rDNA, ılımlı tekrarlanan DNA dizilerinin bir grubudur ve çeşitli kromozom bölgelerinde kümeler halinde bulunur. Ökaryotlarda, her bir gen kümesinde ardışık tekrarlar (tandem repeats) yer alır ve her birim, kodlayıcı olmayan aralayıcı DNA (spacer DNA) dizileri ile birbirinden ayrılmıştır⁽⁶¹⁾.

Bütün nrDNA lar; funguslar, bitkiler ve metazoada değişik sistematik düzeylerde filogenetik akrabalığı çözümede sıklıkla kullanılır. Ribozomal RNA (rRNA) genleri gibi bazı genler, hem yüksek değişkenlik gösterirler, hem korunmuş bölgeler içerirler hem de geniş bir filogenetik bilgi sağlarlar^(62,63). Ribozomal RNA genlerinin karşılaştırmalı nükleotit dizi çalışmaları, taksonomik basamaklardaki filogenetik yakınlıkların incelenmesinde yeni olanaklar sağlamıştır. Nükleer küçük alt ünite (Small Subunit : SSU) rDNA dizileri (16S gibi) oldukça yavaş evrimleşir ve uzaktan ilişkili organizmaların filogeni çalışmalarında kullanılabilirler. Mitokondriyal rRNA genleri ise daha hızlı evrimleşir ve ordo veya familya düzeyinde kullanışlı olabilir. Nükleer rRNA tekrar ünitelerinin internal ara bölgeleri (Internal Transcribed Spacer: ITS) ve intergenik ara bölgeleri (Intergenic Spacer: IGS) çok hızlı evrimleşirler. Aynı cins içerisindeki türler arasında ve hatta populasyon içerisinde çeşitlilik oluştururlar.

Birçok rRNA dizisi, belli klonlanmış genlerin izolasyonu ve dizi analizi ile elde edilmiştir. Direk rRNA dizi analizi, yüksek miktarlarda RNA gerektirdiği ve yalnızca bir zincir dizisi hatalara yatkın olduğu halde dizi bilgisi elde etmek için de kullanılmıştır. PCR ve direk dizi analizi, klonlama ve direk dizi analizinden daha iyi avantajlar sunar. Bu metod, DNA'yı kaba haliyle kullanır ve çok az miktarlarda DNA (her amplifikasyon için 0.1-10 ng) gerektirir. Her iki zincirin de dizi analizini gerçekleştirerek hata oranını düşürür ve floresan işaretli dizi primerleri veya dioksinükleotit trifosfataz enzimi kullanan otomatik DNA dizi analizi aletleriyle uyumlu çalışabilir⁽⁶¹⁾. Örneğin, Bruns ve arkadaşları (1990)⁽⁶⁴⁾, dört farklı herbaryumdan elde ettikleri 1-50 yıla kadar saklanmış otuz beş kuru mantar örneğinin 5-30mg öğütülmüş dokularından DNA izole etmişlerdir. Mitokondriyal

rRNA LSU genlerinin özgül bir parçasını çoğaltmışlardır ve 16 örneğin dizi analizini gerçekleştirmişlerdir.

Belirli döngü parametreleri kullanılarak yapılan kalıp genlerin amplifikasyonunda primerlerin spesifitesi kusursuzdur. Bağlanma sıcaklığını değiştirerek çalışılabilecek organizmaların alanı bazı miktarlarda arttırılabilir veya kısıtlanabilir⁽⁶⁵⁾.

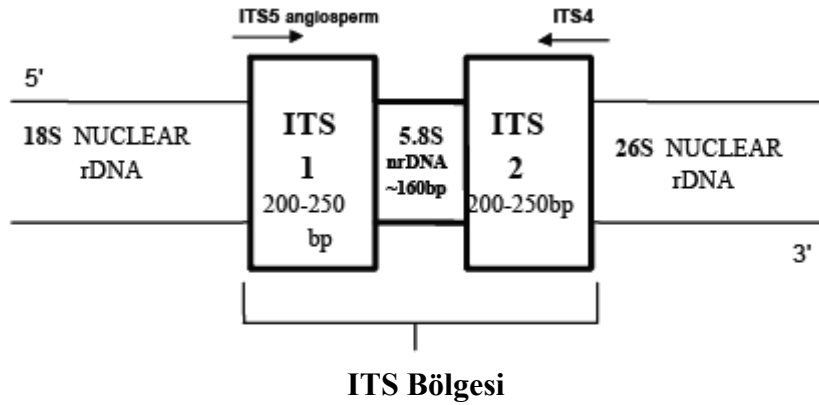
ITS bölgeleri, öncül mRNA da bulunan, olgun mRNA oluşurken splayla uzaklaştırılan bölgelerdir. Bu diziler rDNA tarafından kodlanır. Ribozomal genler ve spacerlar, binlerce kopya uzunluğundaki tekrarlanan dizilerde (tendon tekrarlarda) bulunur⁽⁶⁶⁾.

ITS primerleri ökaryotlarda, 18S, 5.8S ve 28S rRNA genlerinin korunmuş bölgelerini ve bunlar arasındaki kodlanmayan kısımları çoğaltmak için kullanılırlar.

Ribozomal RNA'ları kodlayan genler, sistematik çalışmalar açısından birçok avantaj sağlar. Hücrede çok sayıda kopyasının bulunması, ihtiyaç duyulan hücre miktarını en aza indirir ve materyalin az bulunduğu hallerde önemli bir avantaj olabilir. Filogenetik amaçlarla rRNA genlerinin kullanımı, total hücre genomik DNA'sının restriksiyon enzimleriyle kesilmesini, klonlanmamış problemlerin hazırlanmasını ya da PCR ile çoğaltılmasını ve sonucun otoradyografi ile görüntülenmesini gerektirir⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

1.2. ITS (Internal Transcribed Spacer)

ITS bölgesi, bakterilerde 16S ve 23S rRNAları kodlayan genler arasında bulunan bir diziden oluşmaktadır. Hem tür hem de alttür seviyesinde tanımlama yapabilmek için ITS bölgelerinin dizi analizinden yararlanır. Bu bölgelerin çeşitliliği, rDNA'nın diğer bölgelerinden daha fazladır. Bu dizide, her türe özgü farklı nükleotidlerin bulunması nedeniyle yapılan çalışmalarda mikobakterilerin identifikasyonu sağlanabilmiştir⁽⁷⁰⁾. rDNA'nın SSU ve LSU gibi diğer gen bölgelerine kıyasla, yüksek düzeydeki çeşitliliğinden dolayı rDNA tekrarlarındaki çeşitlilik bazen ITS ve IGS bölgelerinin her ikisinde de gözlemlenebilir. Ökaryotik organizmalar, 2 tane ITS bölgesi içerirler. ITS1, 18S-5.8S genleri arasında, ITS2 ise 5.8S-26S genleri arasında bulunur⁽⁶¹⁾. (Şekil 1.2)



Şekil 1.2. 18S-26S nüklear ribozomal DNA (nrDNA)'nın Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgesi. Primer pozisyonları '[' ile gösterilmiştir⁽⁶¹⁾

nrDNA tekrarları ribozomun küçük ve büyük alt ünitelerinin RNA'larını kodlayan genleri, ITS bölgesini, 5.8S genini ve ardışık iki tekrar bölgesini ayıran IGS

bölgesini içerir⁽⁷¹⁾. ITS4 primeri, üniversal bir primer olarak tanımlanmıştır ve Büyük Alt Ünite (LSU: Large Subunit:) geninin 5' ucuyla hibritleşir⁽⁶¹⁾. (Şekil 1.2) Grube ve Kroken (2000)⁽⁷²⁾, ITS çeşitliliğinin türlerin tanımlanmasında da kullanılabildiğini, ITS veya herhangi bir lokus bilgisinin bir filogenetik hipotezi desteklemeye yeterli olduğunu, fenotipik veya biyocoğrafik karakterlere dayalı filogenetik hipotezle, bir gene ait verilerle elde edilmiş soyağacının uyuşmasının, filogenetik türler arasında ayırım sağlayabileceğini ifade etmişlerdir.

1.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi tespiti (sekans, sequence) moleküler biyoloji kapsamında geliştirilen en önemli tekniklerden biri olarak bilinir. Gen DNA'sını teşkil eden baz dizisinde meydana gelebilecek herhangi bir yanlış kodlama, elde edilecek ürünün farklı bir şekilde oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle söz konusu genden ürün sentezine başlamadan önce baz dizisinin belirlenmesi zorunludur. Taşıyıcı vektöre klonlanan yabancı genin baz sırasının doğru olup olmadığı, Frederick Sanger ve A. R. Coulson (1975) veya Alan Maxam ve Walter Gilbert (1977) metotlarından biri kullanılarak belirlenebilmektedir^(73,74).

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. Genlerin organizasyonu, doğası ve ayrıca gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların sayısı, yeri, çeşidi ile ilgili bilgiler verir. Ayrıca prokaryotik ve ökaryotik genlerde yer alan kontrol bölgelerinin organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin aminoasit dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılır. Nükleotid dizilerinin bilgisayar analizleri,

klonlanmış parçanın bir genin tamamını mı yoksa bir kısmını mı içerdiğini belirlemeye yarar⁽⁶⁰⁾.

1.4. Filogenetik Sistem

Biyolojide filogeni, türlerin ortaya çıkışını inceleyen bilim dalı olarak ortaya çıkmıştır. Filogenetik sistem, canlıların muhtemel soyağacını ortaya çıkarmayı amaçlar; canlıların geçmişten günümüze geçirmiş oldukları değişimi bulmaya çalışır. Bu sistemde, akrabalık terimi, birbiriyle çok yakından ilişkili ve birbirlerine çok benzer olan taksonların evrimsel ifadesi anlamına gelmektedir. Atasal akrabalık, paylaşılan, türemiş olduğu varsayılan karakterleri oluşturma (sinapomorfi) ile sağlanmaktadır.

Filogenetik sistemde monofiletik bir grup, atasal türleri ve onların soyundan gelenleri ifade etmektedir. Her bir monofiletik grupta tek bir tür, monofiletik grubun kendinden sonra gelen bütün üyelerin atası olarak değerlendirilir. Sisteme göre homolog nitelikteki apomorfik (atasal karakterden türeyen) karakterleri taşıyan taksonlar monofiletik grubu oluşturur; hem apomorfik hem de plesiomorfik (atasal karakter) karakterleri taşıyan taksonlar, monofiletik grubu oluşturmazlar. Bir taksonun kardeş grubu (sister grup), çalışılan taksona en yakın taksondur ve monofiletik gruptan daha eskidir⁽⁷⁵⁾.

1.4.1. Parsimoni (tutarlılık)

Parsimoni kriteri, karakterlerin çalışılan organizmalar arasındaki dağılımını açıklamak için yapılan en kısa ağaçtır. Evrimsel akrabalık ilişkisini belirlemenin

temel mantığı şudur; en yakın akraba taksonlar en fazla ortak özelliğe sahip olmalıdır. Üzerinde çalışılan taksonlar arasındaki değişken, kalıtsal ve biri diğerinden bağımsız her bir özellik ya da karakter olarak ele alınır. Bu değişken karakter, kimin kimden evrimleştiğini anlamak için kullanılmaktadır. Karakter, organizmanın gözlenebilen bir özelliğidir. Filogenide, aynı atadan farklılaştığı düşünülen karakterler homologtur; atasal karakter plesiomorfik karakter olarak; nesil karakteri ise apomorfik karakter olarak isimlendirilir. Çalışılan gruptaki karakterler, ya çalışma grubunun bütün üyelerinde mevcuttur ya da gruplaşmış bir dağılım sergiler. Paylaşılan karakterler, kalıtımın bir yansıması olarak değerlendirilir. Analizde kullanılacak karakterler; DNA dizisi, belli iskelet elementleri, çiçek kısımlarının varlığı ya da yokluğu gibi özellikler olabilir. Hangi karakterin analizde kullanılacağını seçmenin tek koşulu, farklı karakterlerin birbirlerinden bağımsız ve her birinin çalışılan tüm türlerde homolog karakter olmasıdır. Paylaşılan türemiş karakter durumları, grubun tüm üyelerinin ortak atasındaki karakterin bir değişime uğramasıyla ortaya çıkan benzerlikler olarak değerlendirilir⁽⁷⁶⁾.

Parsimoni, birçok olasılık arasından hangi dallanma modellerinin evrimsel süreci en doğru biçimde yansıttığını bulmak için kullanılır. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, ortaya çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır⁽⁷⁷⁾.

Filogenetik sınıflandırmada, homolojinin en büyük değere, homoplazinin ise en küçük değere sahip olduğu parsimoni ağacı tercih edilmektedir. Sinapomorfinin en büyük değerine sahip bir ağaç, homoplazinin en düşük olduğu ağaçtır⁽⁷⁵⁾.

1.4.2. Kladistik Analiz

Atasal akrabalığı kurmak için muhtemel türemiş karakterleri kullanarak verileri analiz eden ve objektif bir filogenetik ağaç oluşturmayı amaçlayan bir çözümleme yöntemidir. Kladistik metodlar, Alman entomolog Hennig (1950) tarafından formüle edilmiş, Phylogenetic Systematics (1966) adlı kitapta tanıtılmış, geniş oranda kabul görmüş ve sonradan daha da geliştirilmiştir. Bu analiz yöntemi, filogenetik olarak canlılar arasındaki yakınlıkları ortaya çıkarmak için taksonların karakter benzerliklerinden yararlanarak karşılaştırır. Geleneksel sistematikten farkı, ölçülebilen verileri kullanması ve sezgilerden çok evrimsel ilkeleri göz önüne alarak düzenlenmiş bir sınıflandırma yapıyor olmasıdır.

Bu analiz metodunda, nesillerin akrabalık ilişkisini belirlemek amacıyla morfolojik, fizyolojik, ekolojik veya moleküler karakterler kullanılır. Gözlenen verileri açıklamak için en az sayıdaki değişikliğin olduğu varsayılan ağacı oluşturmayı hedefler⁽⁷⁸⁾. Bunun nedeni ise evrimin, en kısa yolu tercih ettiği düşüncesidir. Kladistik analizin numerik analizden farkı, çalışılan grup içinden monofiletik grubu yani orijini belirlemeye yönelik olmasıdır⁽⁷⁷⁾.

Ağaç üzerindeki her dal, türemiş grupları ayırt eden bir ya da daha fazla sinapomorfiye karşılık gelmektedir. Dal uzunlukları, taksonlar tarafından paylaşılan türemiş karakterlerin bir yansıması olarak ifade edilmektedir. Eşit olmayan dal uzunlukları, evrimsel hızın da eşit olmadığı anlamına gelmektedir.

Kladistik metodlar için geliştirilen bilgisayar programları kullanılırken bir veri seti oluşturulur. Veri seti oluşturulurken, karakterlerin durumuna bağlı olarak bütün

karakterler 0 ve 1 (binary) veya 2'den daha fazla (multistate) numara ile kodlanır; moleküler veri setlerinde doğrudan sekans dizileri yazılabilir⁽⁷⁶⁾.

1.4.2.1. Analiz Programının İşlemesi

Analiz için farklı bilgisayar programları kullanılabilir. Bunlardan PAUP ve Hennig 86 en çok kullanılanlarıdır. Analizler; saniyeler, bazen de saatler, hatta günler sürebilmektedir. Veriyi analiz etmede harcanan zaman, uygun ölçütler kullanılarak ağaç topolojisini değerlendirmeye harcanmaktadır. Eğer veri seti yeterliyse “branch and bound search” kullanılarak en az uzunluktaki ağaç oluşturulur.

Branch and bound search: Bütün mümkün olabilen ağaçlarda verileri değerlendirir. En kısa ağaç veya ağaçlar seti bulunur. Olası ağaç topoloji sayısı çok hızlı oranda artar.

PAUP, heuristik search'ı kullanır. Ağacı kurmayla işe başlar. Elde edilen ağaç optimal olabilir. Gelişmekte olan ağaca takson eklenir. Ağaç uzunluğu, onun internod ve dalları arasındaki karakter değişikliklerinin sayısı toplanarak hesaplanır. Bütün mümkün olan ağaçlar değerlendirildiğinde optimumu veren ağaç elde edilir. Bu işlemin tekrar sayısına replikant denir⁽⁷⁵⁾.

Addition sequences (Stepwise addition): Gelişmekte olan ağaca taksonun eklenmesidir. Önce üç taksonluk bir ağaç seçilir. Sonra 4. takson seçilir ve başlangıç ağacına eklenir. Bütün taksonlar sırasıyla gelişmekte olan ağaca eklenir. Hangi taksonun hangi düzeyde eklendiğini, hangi üç taksonun ve sonraki taksonların seçildiğini belirlemede genellikle random (rastgele) yöntemi kullanılır.

Random yöntemiyle çalışılan taksonlardan herhangi biri rastgele seçilir. Bu takson muhtemel ata olarak kabul edilir. Sonra bu takson ve geri kalan taksonların her biri arasındaki uzaklık hesaplanır. Başlangıç ağaç, referans takson için kurulur ve ona en yakın olan iki takson eklenir. Sonra geri kalan taksonlar gelişmekte olan ağaca eklenir ve optimal ağaç oluşturulur. Optimal ağaca diğer ağaçların eklenmesiyle oluşan ağaçlara parsimoni ağaçları denir. Homoplaziler azaltılıp, apomorfi artırılmaya çalışılır. Bütün orijinal ağaçlar tarafından desteklenen monofiletik grupları belirlemek için en son olarak consensus ağaç oluşturulmaktadır. En optimum ağaç (consensus ağaç), topolojik olarak farklı olan parsimonik ağaçlardan gelen bütün bilgileri içermektedir.

En parsimonik ağaç oluşturulduktan sonra her bir karakterin tutarlılık indeksi (consistency index, CI) hesaplanır. CI, uygun ağaç topolojisinin ve transformasyon serilerinin ölçüsü olarak ifade edilir. CI, bütün veri seti ve ağaç topolojisi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için kullanılmaktadır. Homoplazi ne kadar düşük ve CI ne kadar yüksekse o karakter o kadar informatiftir. Genlerdeki baz dizileri informatif karakterlerdir. Ancak bir karakter, organizmanın belirli bir özelliğini veriyor ve ayırdedici bir özellik taşıyorsa daha yüksek değerde görülür; yani informatiftir. % homoloji ne kadar azalırse iki tür arasındaki fark o kadar artmaktadır. Fakat her zaman homoplazi görüntüsü oluşur. Yani informatif ve informatif olmayan karakterler her zaman bir arada bulunur. Analiz sırasında ilk ağaç ile son ağaç karşılaştırılır. Eğer ağaçların CI'sı farklı ise ağaç kurulmaya devam edilir. Aralarında CI farkı kalmayana kadar işlem devam eder. Bu nedenle analizler bazen saatler, bazen de günler almaktadır. 0,5 ve daha yüksek CI değerleri, en güvenilir değerler olarak kabul edilmektedir^(76,78,79).

1.5. Çalışmanın Amacı

Apiaceae familyası üyeleri, kolayca tanınabilmelerine rağmen cinsler veya türler arasında doğal bir sınıflandırmanın yapılmasında ciddi problemler vardır⁽⁸⁰⁾. Bu familyaya ait bireyler, bazen çok karmaşık karakter taşırlar; bu nedenle cins düzeyinde dahi ayırt edilmeleri oldukça zordur⁽⁸¹⁾.

Bu çalışmanın temel amacı *Ferula* cinsine ait türlerin nrDNA'larındaki ITS bölgesinin dizi analizi ile ortaya çıkan veriler sayesinde uygun analiz teknikleri kullanarak aralarındaki yakınlık derecelerini ve filogenetik ilişkileri aydınlatmaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma kapsamında incelenen tohum örneklerine ait detaylar Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2. 1. Bu çalışmada kullanılan tohum materyallerinin etiket bilgileri⁽⁷⁾

Tür adı	Toplandığı bölgeler ve toplayıcılar	Yükseklik (m)	Toplama tarihi
<i>F. halophila</i> Peşmen	B4 Konya: Cihanbeyli-Tuz Gölü tuz fabrikası yanı (Yavşan Tuzlası) M. Sağıroğlu 2146 (GAZİ), ibid.,	900	15.07.2002
<i>F. elaeochytris</i> Korovin	C5 Hatay: Yayladağı Akra (Casius) dağı M. Sağıroğlu 2227 (GAZİ).	1200	06.07.2003
<i>F. longipedunculata</i> Peşmen	B6 Maraş: Göksun-Keklikoluk Köyü Işık Dağı, M. Sağıroğlu 2235 (GAZİ).	1900	04.08.2002
<i>F. sp.</i>	M. Sağıroğlu 2181 (GAZİ).		
<i>F. haussknechtii</i> Wolff ex Rech	B9 Bitlis: Tatvan-Van yolu 66.km, M. Sağıroğlu 2255 (GAZİ).	1950	01.09.2002

Çizelge 2. 1. (devam ediyor)

<i>F. szowitsiana</i> DC	B4 Konya: Cihanbeyli, Tuz Gölü, Yavşan Tuzlası, M. Sağıroğlu 2147 (GAZİ)	900	15.07.2002
<i>F. mervynii</i> M. Sağıroğlu & H.Duman	A9 Erzurum: Uzundere-Yusufeli Yolu 10.km Tortum barajı üstü, M. Sağıroğlu 2262 (GAZİ).	1100	02.09.2002
<i>F. coskunii</i> H.Duman& M. Sağıroğlu	C6 Hatay: Yayladağı, Şenköy- Ziyaret Dağı, M. Sağıroğlu 2270 (GAZİ).	1100	20.09.2002
<i>F. orientalis</i> L.	B6 Malatya: Darende-Malatya yolu 2 km, M. Sağıroğlu 2170 (GAZİ).	2000	23.07.2002
<i>F. hermonis</i> Boiss.	C6 Maraş: Çağlayancerit Öksüz Dağı kuzey yamaçları, M. Sağıroğlu 2246 (GAZİ).	1450	30.08.2002

2.2. DNA İzolasyonu ve Koşturulması

2.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, çalışılan türlerin tohumlarındaki endospermden McDonald ve arkadaşlarının (1994)⁽⁸²⁾, uyguladığı metod modifiye edilerek, aşağıdaki sıra ile gerçekleştirilmiştir.

- 1- *Ferula* cinsine ait türlerin tohumlarının endosperm tabakaları havanda ezildi.
- 2- Ezilen tohumlar mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 3- Üzerine 400 µl ekstraksiyon tamponu eklendi
- 4- Megagametofitler plastik çubukla ezildi
- 5- 400 µl daha ekstraksiyon tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. 65 °C de 30 dakika inkübe edildi.
- 6- 250 µl 5 M potasyum asetat eklenerek karıştırıldıktan sonra, buz içinde 30 dakika bekletildi.
- 7- Örnekler 0 °C'de 13000 r.p.m'de 16 dk. santrifüj edildi
- 8- Dökelti temiz bir tüpe aktarılarak üzerine 500 µl kloroform solüsyonu + 17 µl izoamil alkol + 250 µl fenol eklenerek karıştırıldı. 14.000 r.p.m. de, 12 dakika santrifüj edildi.

- 9- Üstte kalan sıvı kısım yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl oda sıcaklığındaki % 70'lik etanol ve 250 µl 0,3 M sodyum asetat çözeltisi eklendi. En az 40 dk. -20 °C'de bekletildi.
- 10- Örnekler 14000 r.p.m'de 12 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- 11- Elde edilen çökelti 400 µl soğuk %70 lik etanol ile yıkandı. Üst kısım döküldü.
- 12- Çökelti 10-15dk. kurutuldu ve 50 µl Tris-EDTA tamponunda 10 dk. içinde yeniden çözüldü ve -20 °C'de saklandı.

2.2.2. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen DNA miktarı ve saflığı, Eppendorf marka spektrofotometre'de (BIOPHOTOMETER) spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemlerle belirlendi. DNA konsantrasyonu, 260 nm'de 1 OD'nin 50 Xg/ml çift zincir DNA'nın absorpsiyon değeri olduğu göz önüne alınarak hesaplandı ve DNA'nın varlığı agaroz jelinde elektroforetik olarak da gözlemlendi.

Bu çalışmada izole edilen DNA çift iplikli olduğundan miktar tayininde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD (Absorbans değeri)} \times \text{sulandırma oranı} \times 50.$$

5µl DNA, 995 µl TE içinde seyreltilmiştir.

2.2.3. Jel Elektroforezi

Jel Elektroforezi için yürütme tamponu (TBE tamponu (10x, pH=8) şu şekilde hazırlanmıştır:

121.10 gr Tris Base, 61.83 gr Borik asit ve 5.84 gr EDTA tartılarak distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH=8' e ayarlanarak buzdolabında saklandı.

Hazırlanan 10xTBE tamponunu 1xTBE tamponu yapmak için 10xTBE'den 100 ml alınarak toplam hacim 1000 ml'ye tamamlamak için üzerine 900 ml saf su ilave edildi.

Jel elektroforezi için 1xTBE tamponu kullanılır.

2.2.4. Etidyum Bromür Boyasının Hazırlanması

Etidyum Bromür (5mg/ ml stok) hazırlamak için Etidyum Bromür'den 50 mg alınarak 10 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

2.2.5. Minijel Elektroforez İçin %1 lik Agaroz Jel Hazırlanması

0.2 gr Agaroz tartıldı ve 20 ml 1x TBE tamponu içerisinde eritildi. Jelin sıcaklığı düşünce 2 µl Etidyum Bromür çözeltisinden eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra jel kabına dökülerek, jel yaklaşık 30–40 dk. soğuduktan sonra koşturmaya hazır hale geldi.

2.2.6. DNA'nın Yüklmesi

1,5 ml'lik ependorf tüpü içine 3 µl yükleme boyası, 10 µl intak DNA koyup, jel içindeki kuyucuklara (tarak ucuyla açılan) yüklendi. Yaklaşık 30 dk. 100 volt'ta örnekler yürütülüp, oluşan bantların Biometra marka BioDock Analyse cihazında fotoğrafları çekildi.

2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile ITS bölgesinin çoğaltılması

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı in vitro DNA sentezi yöntemidir. PCR'ın prensibi, tekrarlanan üç basamağa dayanır:

- 1- DNA'nın yüksek sıcaklıkta tamamen denatüre edilmesi,
- 2- Özgül bir PCR için, primerlerin hedef bölge ile uygun sıcaklıkta birleşmesi (annealing),
- 3- Taq DNA Polimeraz enziminin 72 °C'de, primerlerden başlayarak, zincir uzatması.

Primer oligonükleotidlerinin bağlanma bölgesine komplementer olacak şekilde seçilmesi reaksiyonun özgüllüğünü sağlar. Primerin uzaması, termofilik bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ve ısıya dayanıklı bir enzim olan Taq DNA Polimeraz ile katalizlenir. Bu enzim, 85.000 Da moleküler ağırlığında olup, polimerizasyon aktivitesini 72 °C'de gösterir ve 94 °C'de inkübe edildikten sonra bile aktivitesini kaybetmez. Bu reaksiyonlar, özgül bir DNA parçasının sayıca artmasını sağlar. Hedef DNA, her döngüde kopya sayısını ikiye katlar. Böylece 20

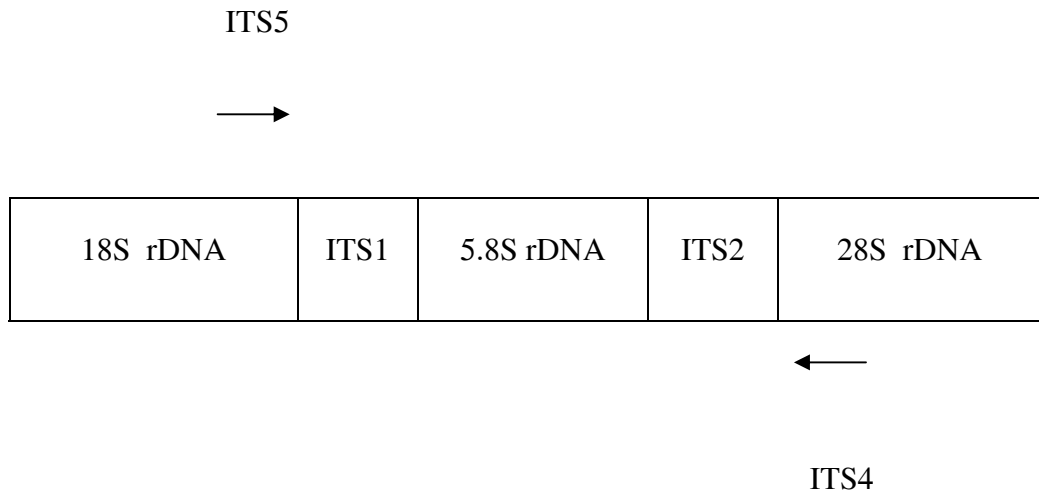
döngü sonunda hedef DNA'nın yaklaşık 1 milyon kopyası oluşur. Polimeraz enzimleri, aktivite göstermek için serbest magnezyum iyonlarına gereksinim duyarlar⁽⁸³⁾. Uygun MgCl₂ konsantrasyonu 0,5 mM–5 mM arasında değişebilir.

Bu çalışmada, dizi analizinde kullanılacak DNA parçalarını oluşturmak için ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgelerini içine alan, yaklaşık 700 bç'lik bölge çoğaltılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonlarında kullanılan ITS5 ve ITS4 primerlerinin nükleotid dizileri aşağıdaki gibidir:

ITS5 (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3')

ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')

Bu primerlerin yerleşimi Şekil 2.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Amplifikasyon reaksiyonlarında kullanılan ITS5 ve ITS4 primerlerinin rDNA 'daki yerleşimi⁽⁶¹⁾

ITS primerleri, amplifikasyon için 18S-5.8S-28S rRNA genlerinin uygun bölgelerine bağlanır. ITS5 primeri 18S rDNA bölgesine, ITS4 primeri ise 28S rDNA bölgesine komplementerdir⁽⁶¹⁾ (Şekil 2.1).

2.3.1. ITS5 ve ITS4 Primerlerinin Çözülmesi

ITS5 (5'-GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G-3') e 1020.41 µl

saf su konularak çözdürülmüştür.

ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e 1020.41 µl

saf su konularak çözdürülmüştür.

2.3.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

70.13 µl sdH₂O(Steril distile su) X 4= 280.52 µl ~ 281 µl

10 µl Buffer X 4= 40 µl

14 µl MgCl₂ X 4= 56 µl

2.5 µl d NTP karışımı X 4= 10 µl

1.75 µl Primer ITS5 X 4= 7µl

1.62 µl Primer ITS4 X 4= 6.48 µl ~ 6.5 µl kullanılarak toplam 400 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım dört ependorf tüpüne bölündü. Her tüpe 97.5 µl karışım ve 1/20 sulandırılmış DNA örneğinden 2 µl alınıp, reaksiyon

karışımına eklendi. Bu karışıma 0,5 µl (2,5 U) Taq DNA Polimeraz eklenerek aşağıdaki PCR programı başlatıldı. PCR aleti aşağıdaki şekilde programlandı:

94 °C’de 1 dakika denatürasyon

53 °C’de 1 dakika annealing

72 °C’de 1 dakika uzama

72 °C’de 10 dakika son uzama.

35 döngü sonunda ~700 bç’lik PCR ürünleri % 1,5’luk agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılır.

2.3.3. Minijel Elektroforezi İçin %1.5 luk Agaroz Jel Hazırlanması

0.3 gr Agaroz tartılır ve 20 ml 1xTBE tamponu içerisinde eritilir. Jelin sıcaklığı düşünce 2µl etidyum bromür çözeltisinden eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra jel kabına dökülür. Jel, yaklaşık 30-40 dk. soğuduktan sonra koşturmaya hazırdır.

2.3.4. DNA’nın Yüklenmesi

1.5 ml’lik Ependorf tüpü içine 3 µl yükleme boyası, 3 µl PCR DNA sı kondu. Bu karışım jel içinde tarak ucuyla açılan kuyucuklara konduktan sonra, yaklaşık 30 dk. 100 volt’ta örnekler yürütülerek oluşan bantlar “Biometra” marka BioDock Analyse cihazında fotoğraflandı.

2.4. DNA Dizi Analizi

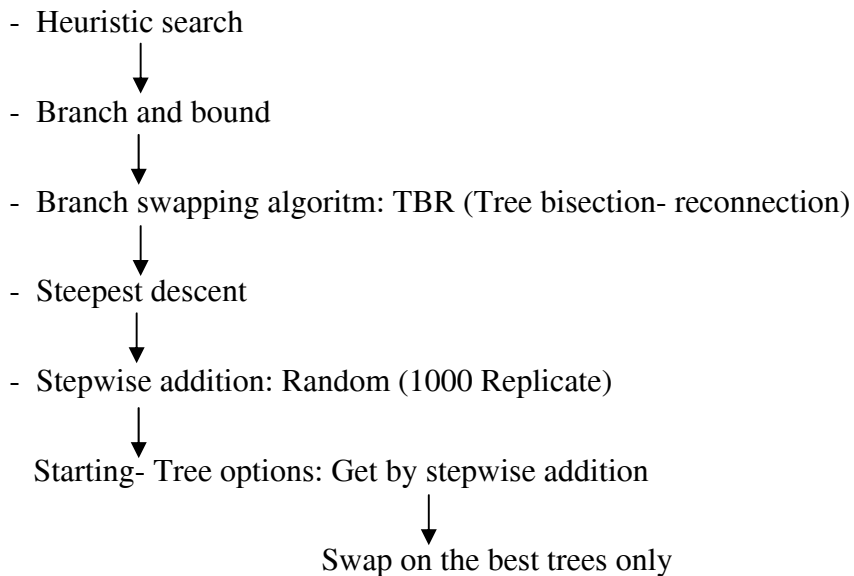
PCR ürünlerinin enzimatik temizlenmesi ve dizilerinin çıkarılması, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ITS bölgesinin tamamı Otomatik sekans cihazında ITS5 primeri temel alınarak ortaya çıkarılmıştır.

2.5. Filogenetik Analiz

Ferula cinsine ait türlerin ITS DNA bölgelerinin dizi analizi verileri, MacClade 4.03 (Maddison ve Maddison, 2003⁽⁸⁴⁾) bilgisayar programına yüklendi. Yüklenen veriler, PAUP 4.0b.10. versiyon (Swafford, 2002⁽⁸⁵⁾) (Phylogenetic analysis using parsimony) kladistik analiz programı ile analiz edildi.

2.5.1. Kladogram ve Dendrogram Oluşturulması

PAUP 4.0b.10. versiyon (Swafford, 2002⁽⁸⁵⁾) programı, kladistik analiz için aşağıdaki sıra takip edilerek kullanılmış ve kladogram elde edilmiştir.



Heuristic search sonucu oluşan en parsimonik ağağların tutarlılık indeksi (Consistency index, CI) ve karmaşıklık indeksi (Homoplazi index, HI) hesaplanmıştır. Daha sonra Strict consensus ağacı oluşturulmuştur. Ayrıca taksonlar arasında baz sıklığı (Baz Frequency) ve uzaklık matrisi hesaplanmış ve komşu bağlantı analizi (Neighbour Joining Trees) PAUP 4.0b.10 programında geręekleřtirilmiřtir.

2.6. *Ferula* Meyvelerinin Fotoğraflanması

Çalışılan türlere ait meyveler, beyaz kağıt üzerine konularak Nikon 5000 fotoğraf makinesiyle x5 bütmede fotoğraflanmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1.Çalışmada kullanılan türlerin meyve özellikleri

Bu çalışmada kullanılan *Ferula* cinsine ait bitkilerin meyveleri x5 büyütmede fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Ferula* cinsine ait bazı türlerin meyve görüntüleri

1). *Ferula* sp. 2). *Ferula elaeochytris* 3). *Ferula szowitsiana* 4). *Ferula haussknechtii*



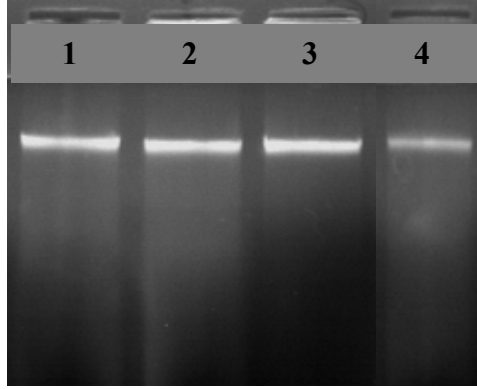
Şekil 3.1. (devam ediyor)

5). *Ferula coskunii* 6). *Ferula halophila* 7). *Ferula hermonis*

8). *Ferula orientalis* 9). *Ferula longipedunculata* 10). *Ferula mervynii*

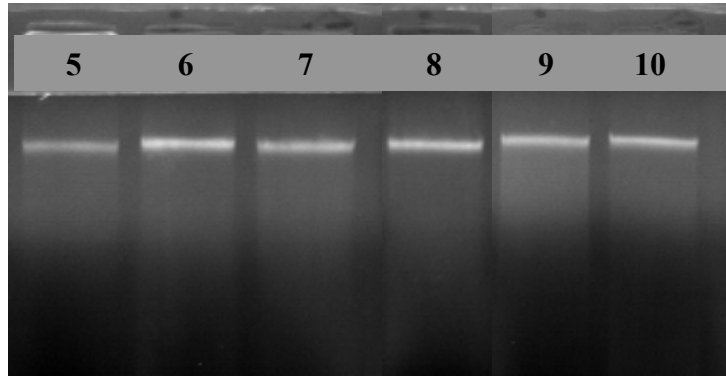
3.2. DNA İzolasyonu

Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanmış *Ferula* cinsine ait türlerin DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'larının agaroz jel elektroforezinde gözlenebilen bantları Şekil 3.2.a ve Şekil 3.2.b' de verilmiştir.



Şekil 3.2.a Bazı *Ferula* türlerine ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

- 1) *Ferula halophila* 2). *Ferula elaeochytris* 3). *Ferula longipedunculata* 4). *Ferula* sp.



Şekil 3.2.b Bazı *Ferula* türlerine ait genomik DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

- 5). *Ferula haussknechtii* 6). *Ferula szowitsiana* 7). *Ferula mervynii*
8). *Ferula coskunii* 9). *Ferula orientalis* 10). *Ferula hermonis*

3.3. DNA Konsantrasyonu

DNA' nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmiştir. µg/ml olarak hesaplanan sonuçlar mg/ml'ye çevrilmiştir.

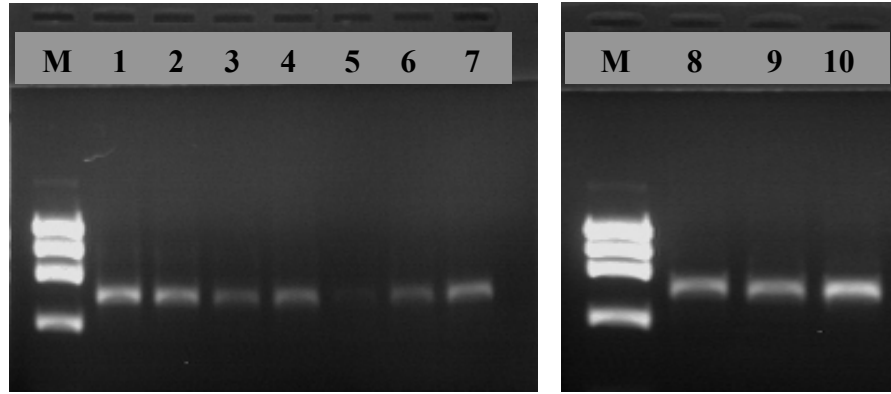
Çizelge 3. 1. *Ferula* türlerine ait DNA konsantrasyonları

Türler	DNA miktarları
<i>Ferula halophila</i> (2146)	3.15 mg/ml
<i>Ferula szowitsiana</i> (2147)	0.92 mg/ml
<i>Ferula longipedunculata</i> (2235)	0.12 mg/ml
<i>Ferula haussknechtii</i> (2255)	0.88 mg/ml
<i>Ferula mervynii</i> (2262)	0.18 mg/ml
<i>Ferula coskunii</i> (2270)	0.29 mg/ml
<i>Ferula orientalis</i> (2170)	0.25 mg/ml
<i>Ferula hermonis</i> (2246)	1.21 mg/ml
<i>Ferula elaeochytris</i> (2227)	0.39 mg/ml
<i>Ferula</i> sp. (2181)	1.21 mg/ml

3.4. nrDNA ITS Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Çoğaltılması

nrDNA ITS bölgesini çoğaltmak amacıyla ITS5 ve ITS4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR'da *Ferula* türlerinin uzunluğu yaklaşık 700bp olarak tespit edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, %1,5'lük agaroz jel elektroforezinde 1x TBE tamponu ile yürütülerek kontrol edilmiştir.

Şekil 3.2.a ve Şekil 3.2.b'de DNA bantlarının varlığı gösterilen *Ferula* örneklerinin ITS bölgelerini çoğaltmak için PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda çoğaltılan DNA'ların, agaroz jel elektroforezinde gözlenen bantları Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Bazı *Ferula* türlerinin nrDNA ITS bölgelerinin PCR sonuçları

- 1). *Ferula halophila* 2). *Ferula elaeochytris* 3). *Ferula longipedunculata*
- 4). *Ferula* sp. 5). *Ferula orientalis* 6). *Ferula hermonis* 7). *Ferula haussknechtii*
- 8). *Ferula szowitsiana* 9). *Ferula mervynii* 10). *Ferula coskunii*

3.5. nrDNA ITS Bölgelerinin Dizi Analizi ve Düzenlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu nrDNA ITS bölgesini içine alan yaklaşık 700 bazlık PCR ürünü elde edilmiştir. *Heteromorpha* cinsine ait ITS1 ve ITS2 bölgesinin dizisi (GenBank no:U27578 ve U30314) referans olarak alınmış ve okunan diziler bu dizi ile karşılaştırılmıştır⁽⁸⁶⁾ (Şekil 3.4- Şekil 3.14).

PCR ve saflaştırma işlemleri sonucunda elde edilen bantlardan farklı *Ferula* türlerine ait örneklerin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu ile elde edilen hedef dizilerin çift yönlü dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen diziler, ClustalW⁽⁸⁷⁾ programı ile düzenlenerek mutasyonik görünümlü bölgeler tespit edilmiştir.

Dizi analizi sonucunda *Ferula* örneklerinden sıralanabilir yaklaşık 700 nükleotid elde edilmiştir. Bu bölgelerden 587 nükleotidin sabit, 93 nükleotidin değişken olduğu bulunmuştur. Elde edilen ITS dizileri aşağıdaki gibidir.

Ferula halophila

```
GCTCGGTAGTGACTGCGGAGGATCATTGTCGAATCCTGCATAGCAGAATGACCCGTTAACACGTAA
AATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCCCTC
ACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAACTAATACCGAATT
GTTTCGTCGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTG
GGTGTACGCATCGTGTGGCCCCGACCAAACATCTCTCTTTAGGAGATGTTCCGGTTTGGGGGCGG
ATACTGGCCTCCCGTGCCTTGTTGGCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTGCGGA
CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTGTCTTGTCTGTATGCCCGTCACCTTAGTCAGCTCAAGGA
CCCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTCACGCGGGACTACCCGCT
GAGTTAGATCTCAAGCGGGGAAAAAAA
```

Şekil 3.4. *Ferula halophila*'ya ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula elaeochytris

GCTCAGTAGTGACTGCGGAGGATCATTGTCGAATCCTGCATAGCAGAATGACCCGTTAACACGTAA
AATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCCCTC
ACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAACTAATACCGAATT
GTTTCGTCGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTG
GGTGTACGCATCGTGTGTCGCCCCGACCAAACATCTCTTTAGGAGATGTTCCGGTTTGGGGGCGGAT
ACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGAC
ATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTGTCTTGTGCGTGTATGCCCCGTCACCTTAGTCAGCTCAAGGAC
CCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTG
AGTTAGATCATAAAAAAGAGGAGAGAGAGAGAA

Şekil 3.5. *Ferula elaeochytris*'e ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula longipedunculata

GCTCAGTAGTGACTGCGGAGGATCATTGTCGATCCTGCATAGCAGAATGACCCGTTAACACGTAAA
ATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCCCTCA
CGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAACTAATACCGAATT
GTTTCGTCGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTG
GGTGTACGCATCGTGTGTCGCCCCGACCAAACATCTCTTTAGGAGATGTTCCGGTTTGGGGGCGGAT
ACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA
CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTGTCTTGTGCGTGTATGCCCCGTCACCTTAGTCAGCTCAAGGA
CCCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCT
GAGTTAGATCAATAAAAAAAGGAGAGAGAGAGAA

Şekil 3.6. *Ferula longipedunculata* 'ya ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula sp.

GTCAGTAGTGACTGCGGAGGATCATTGTGCAATCCTGCATAGCAGAATGACCCGTTAACACGTAAA
ATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCCCTCA
CGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAACTAATACCGAATT
GTTTCGTGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTG
GGTGTACGCATCGTGTGCCCCGACCAAACATCTCTTTAGGAGATGTTCCGGTTTGGGGGCGGAT
ACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA
CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTGTCTTGTGCGTGTATGCCCCGCACCTTAGTCAGCTCAAGGA
CCCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGC
TGAGTTAGATCTTAACAGGGGGGGGAGGAC

Şekil 3.7. *Ferula sp.* 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula haussknechtii

CTCGGGTAGAGTGACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGCAATAGCAGAATGACCCGTTAACA
CGTAAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTA
CCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAACTAATA
CGAATTGTTTCGTGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCA
ACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAG
AATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTC
TGCCTGGGTGTCACGCATCGTGTGCCCCGACCAAACATCTCTTTAGGAGATGTTCCGGTTTGGGG
GCGGATACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGT
CGCGACATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTGTCTTGTGCGTGTATGCCCCGCACCTTAGTCAGCTC
AAGGACCCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTA
CCCCTGAGTTTAGATCTAAAAAAGGGGGGAGAGAA

Şekil 3.8. *Ferula haussknechtii* 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula szowitsiana

GCTCAGTGGTGACTGCGGAGGATCATTGTCGAATCCTGCATAGCAGAATGACCCGTTAACACGTAA
AAACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCCCT
CACGGGTGTCCACCGGCAACGAAATCAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAAATTAATACTGAAT
TGTTTCGTGCTTCTCGTTTCGCGGGCAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTG
GGTGTACGCATCGTGTGCCCCGACCAAACATCCCTCTAGGAGATGTTCTGTGTTGGGGGCGGAT
ACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTGCGGA
CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTGTCTTGTGCGTGTATGCCCGTCACTTTAGTCAGCTCAAGGA
CCCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTCACGCGGGACTACCCGCT
GAGTTAGATCAAAAAAAGGGGGGAGAAAAC

Şekil 3.9. *Ferula szowitsiana*'ya ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula mervynii

GCTTCAGTAGTGACTGACGGAGGATCATTGTCGAATCCTGCACAGCAGAATGACCCGTTAACACGT
AAAAACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCC
CTCACGGGTGTCCACCGGCAATGAAATCAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAAATTAATACTGA
ATTGTTTCGTGCTTCTCGTTTCGCGGGCAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGG
ATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATC
CCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCC
TGGGTGTCACGCATCGTGTGCCCCGACCAAACATCTCTTTAGGAGATGTTCCGATTTGGGGGCGG
ATACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTGCGGA
CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTGTCTTGTGCGTGTATGCCCGTCACTTTAGTAAGCTCAAGGA
CCCTTACGCGCCACAAAATGTGGGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTCACGCGGGACTACCCGCTGA
GTTTAGCATCAATAAGAGCGCGAGAGAAA

Şekil 3.10. *Ferula mervynii* 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula coskunii

GTCAGTAAGTGACTGCGGAGGATCATTGTCGATCCTGCACAGCAGAATGACCCGTTAACACGTAAA
AACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCCCTC
ACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAATCAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAAATTAATACTGAATT
GTTTCGTCGCTTCTCGTTCGCGGGCAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTG
GGTGTACGCATCGTGTGCCCCGACCAAACATCTCTTTAGGAGATGTTCCGATTTGGGGGCGGAT
ACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTGCGGA
CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTGTCTTGTCTGTATGCCCGTCACCTTAGTAAGCTCCAGGA
ACCTTAAGGCCACAAAATGTGGGCCGCTTCAATGTGACCCCGAGTCCAGGCGGGACTAACCGCTG
AGTTACACTTAAAATGGGGGGGAGAGAGAAAAT

Şekil 3.11. *Ferula coskunii* 'ye ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula orientalis

GCTAAGATACGTGACTGCGGAGGATCATTGTCGAATCCTGCATAGCAGAATGACCCGTTAACACGT
AAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCC
CTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAACTAATACCG
AATTGTTTCGTCGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAAC
GGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA
TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTG
CCTGGGTGTACGCATCGTGTGCCCCGACCAAACATCTCTTTAGGAGATGTTCCGGTTTGGGGGC
GGATACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTGCGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTGCG
GACATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTGTCTTGTCTGTATGCCCGTCACCTTAGTCAGCTCAAG
GACCCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCCGAGTCCAGGCGGGACTACCC
GCTGAGTTTAGCACATAAAAAAAGGCGGGAAAA

Şekil 3.12. *Ferula orientalis* 'e ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Ferula hermonis

TTCAGTAGTGACTGCGGAGGATCATTGTGCGAATCCTGCATAGCAGAATGACCCGTTAACACGTAAA
AACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTCGCGAACCCAAGGTAGGTGTACCCCTC
ACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAATCAACCGGGCGCTGACTGCGCCAAGGAAATTAATACTGAATT
GTTTCGTGCTTCTCGTTCGCGGGCAGCGGCGTCAGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGAT
ATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC
GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTG
GGTGTACGCATCATGTTGCCCCGACCAAACATCCCTCTAGGAGATGTTCCGGTTTGGGGGCGGAT
ACTGGCCTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGCAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTGCGGA
CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTGGTCTTGTGCGTGTTCGCCGTCACCTTAGTCAGCTCAAGG
ACCCTTAGGCGCCACAAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCCAAGTCAGGCGGGGACTACCCG
CTGAGTTAGATCTTAATGGGGGGGGGAGGAC

Şekil 3.13. *Ferula hermonis* 'e ait ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) bölgesinin baz dizileri

Heteromorpha

TCGAATCCTGCGATAGCAGAATGACCCGCTAACTCGTAAACACATTGGGCAAGCGTCAGAGGGCTT
CGGTCCCCTGTTTGCGAACCCTTGGTAGGTGGCCCTCTGTAGTGGCCACCGGCTNCAAAATCATC
CGGGCGCGAATGCGCCAAGGAACTTTAAATTGAATTGTACGTTTCGCTTCCCGTTAGCGGGCAGCG
GTGTCAATTCAAAACACATTTACTTGCCCCCAACCACTCACTTCCTTTGGATATGTGCCGGTTTCGGG
GCGGATATTGGCCTCCCGTGCCTTGTGCGTGGCGCAAAAATGAGTCATTGGTGTGACGTT
GCGACATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTCGTCTTGTGCGTGTGAATGCCCGTCACCTTAGTCGGCT
CAAGGACCCCTTAGGCGCCACAACCTCTGTGTGCTTCGA

Şekil 3.14. *Heteromorpha*'ya ait ITS (ITS1, ITS2) bölgesinin baz dizileri⁽⁸⁶⁾

Çizelge 3.2. Sıralanabilir DNA baz sayıları

<i>Ferula halophila</i>	692
<i>Ferula elaeochytris</i>	698
<i>Ferula longipedunculata</i>	697
<i>Ferula</i> sp.	692
<i>Ferula haussknechtii</i>	700
<i>Ferula szowitsiana</i>	694
<i>Ferula mervynii</i>	693
<i>Ferula coskunii</i>	694
<i>Ferula orientalis</i>	696
<i>Ferula hermonis</i>	694
<i>Heteromorpha</i>	438

Hizalama, dizilerin hangi pozisyonunun korunmuş ve hangilerinin ortak diziden farklılaşmış olabileceği hakkında bilgi verir⁽⁸⁸⁾.

Hizalama sırasında eşleşen ve eşleşmeyen nükleotidler çeşitli işaretler ile gösterilebilir. Sıklıkla tercih edilen, eşleşen nükleotidlerin yıldız(*) ile eşleşmeyenlerin ise boşluk ile gösterilmesi şekli(-) ile gösterilen boşluk (gap), evrim süresince bir ya da daha fazla dizi karakterlerinin insersiyon ya da delesyonları olabilir. Bu boşlukların, dizideki insersiyonları mı yoksa delesyonları mı gösterdiği bilinemeyeceğinden nötral bir terim olan 'indel' (insersiyon-delesyon) kullanılmaktadır.

Diziler ve dizi gruplarındaki değişikliklerin saptanmasında en görsel yol ağaç oluşturmaktır⁽⁸⁹⁾. Burada doğru hizalamanın yapılmış olması başlangıç noktasını oluşturur. Yapılan yanlış bir hizalama, filogenetik ağacın yanlış oluşturulmasına neden olur ve bu durum çok uzun dalların varlığı ile kendini gösterir⁽⁹⁰⁾.

Elde edilen dizilerin ClustalW⁽⁸⁷⁾ programı ile düzenlenmiş olan mutasyonik görünümü bölgeleri aşağıda verilmiştir.

```
sequence7      GCTTCAGT--A-GTGACTGACGGA-GGATCATTGTGCGAATCCTGCA-CAGCAGAATGACC 55
sequence8      --GTCAGT--AAGTGA CTG-CGGA-GGATCATTGTGCGA-TCCTGCA-CAGCAGAATGACC 52
sequence1      -GCTCGGT---AGTGAC-TGCGGA-GGATCATTGTGCGAATCCTGCA-TAGCAGAATGACC 53
sequence5      --CTCGGGTAGAGTGACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAATCCTGCAATAGCAGAATGACC 58
sequence4      --GTCAGT---AGTGAC-TGCGGA-GGATCATTGTGCGAATCCTGCA-TAGCAGAATGACC 52
sequence10     --TTCAGT---AGTGAC-TGCGGA-GGATCATTGTGCGAATCCTGCA-TAGCAGAATGACC 52
sequence6      -GCTCAGT---GGTGAC-TGCGGA-GGATCATTGTGCGAATCCTGCA-TAGCAGAATGACC 53
sequence2      -GCTCAGT---AGTGAC-TGCGGA-GGATCATTGTGCGAATCCTGCA-TAGCAGAATGACC 53
sequence3      -GCTCAGT---AGTGAC-TGCGGA-GGATCATTGTGCGA-TCCTGCA-TAGCAGAATGACC 52
sequence9      -GCTAAGAT-ACGTGAC-TGCGGA-GGATCATTGTGCGAATCCTGCA-TAGCAGAATGACC 55
sequence11     -----TCGAA TCCTGCGATAGCAGAATGACC 26
```

*** *****

sequence7 CGTTAACACGTAAAAACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 115
sequence8 CGTTAACACGTAAAAACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 112
sequence1 CGTTAACACGTAAAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 113
sequence5 CGTTAACACGTAAAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 118
sequence4 CGTTAACACGTAAAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 112
sequence10 CGTTAACACGTAAAAACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTCGCGAAC 112
sequence6 CGTTAACACGTAAAAACATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 113
sequence2 CGTTAACACGTAAAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 113
sequence3 CGTTAACACGTAAAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 112
sequence9 CGTTAACACGTAAAAATCATCGGGCAAGCTTCGGGGGGCCTATGGTCCCCTATTTGCGAAC 115
sequence11 CGCTAACTCGTAAACACATTGGGCAGCGTCAGAGGGCTT-CGGTCCCCTGTTTTCGAA 85

** **** * ***** ** * ***** * ***** ** *****

sequence7 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAATGAAATCAACCGGGCGCTGAC 175
sequence8 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAATCAACCGGGCGCTGAC 172
sequence1 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGAC 173
sequence5 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGAC 178
sequence4 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGAC 172
sequence10 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAATCAACCGGGCGCTGAC 172
sequence6 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAATCAACCGGGCGCTGAC 173
sequence2 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGAC 173
sequence3 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGAC 172
sequence9 CCAAGGTAGGTGTACCCCTCACGGGTGTCCACCGGCCAACGAAAACAACCGGGCGCTGAC 175
sequence11 CCTTGGTAGGTG-GCCCTCTGTAGTGCCACCGGCCTNCAAAATCATCCGGGCGCGAA 144

** ***** ***** ** ***** ***** ** * ***** **

sequence7 TGCGCCAAGGAAATTAATACTGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGCAGCGGCGTC 234
sequence8 TGCGCCAAGGAAATTAATACTGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGCAGCGGCGTC 231
sequence1 TGCGCCAAGGAACTAATACCGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTC 232
sequence5 TGCGCCAAGGAACTAATACCGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTC 237
sequence4 TGCGCCAAGGAACTAATACCGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTC 231
sequence10 TGCGCCAAGGAAATTAATACTGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGCAGCGGCGTC 231
sequence6 TGCGCCAAGGAAATTAATACTGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGCAGCGGCGTC 232
sequence2 TGCGCCAAGGAACTAATACCGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTC 232
sequence3 TGCGCCAAGGAACTAATACCGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTC 231
sequence9 TGCGCCAAGGAACTAATACCGAATTGTTTCGT-CGCTTCTCGTTCGCGGGGAGCGGCGTC 234
sequence11 TGCGCCAAGGAACTTTAAATTGAATTGTACGTTTCGCTTCCCGTTAGCGGGCAGCGGTGTC 204
***** * * * ***** ** ***** ***** ***** *****

sequence7 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 294
sequence8 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 291
sequence1 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 292
sequence5 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 297
sequence4 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 291
sequence10 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 291
sequence6 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 292
sequence2 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 292
sequence3 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 291
sequence9 AGTCTGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCCCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC 294
sequence11 ATTCCAAAACACA----- 217
* * * *****

sequence7 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 354
sequence8 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 351
sequence1 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 352
sequence5 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 357
sequence4 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 351
sequence10 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 351
sequence6 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 352
sequence2 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 352
sequence3 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 351
sequence9 GTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA 354
sequence11 -----

sequence7 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 414
sequence8 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 411
sequence1 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 412
sequence5 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 417
sequence4 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 411
sequence10 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCAT 411
sequence6 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 412
sequence2 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 412
sequence3 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 411
sequence9 CGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGT 414
sequence11 -----TTTAC----- 222

* * *

sequence7 GTTGCCCCGACCAAAATCTCT--TTAGGAGATGTTCCGATTTGGGGCGGATACTGGC 472
sequence8 GTTGCCCCGACCAAAATCTCT--TTAGGAGATGTTCCGATTTGGGGCGGATACTGGC 469
sequence1 GTTGCCCCGACCAAAATCTCTCTTTAGGAGATGTTCCGTTTGGGGCGGATACTGGC 472
sequence5 GTTGCCCCGACCAAAATCTCT--TTAGGAGATGTTCCGTTTGGGGCGGATACTGGC 475
sequence4 GTTGCCCCGACCAAAATCTCT--TTAGGAGATGTTCCGTTTGGGGCGGATACTGGC 469
sequence10 GTTGCCCCGACCAAAATCCCT--CTAGGAGATGTTCCGTTTGGGGCGGATACTGGC 469
sequence6 GTTGCCCCGACCAAAATCCCT--CTAGGAGATGTTCCCTGTTTGGGGCGGATACTGGC 470
sequence2 GTTGCCCCGACCAAAATCTCT--TTAGGAGATGTTCCGTTTGGGGCGGATACTGGC 470
sequence3 GTTGCCCCGACCAAAATCTCT--TTAGGAGATGTTCCGTTTGGGGCGGATACTGGC 469
sequence9 GTTGCCCCGACCAAAATCTCT--TTAGGAGATGTTCCGTTTGGGGCGGATACTGGC 472
sequence11 -TTGCCCCAACCACTCACTTCC--TTTGGATATGTGCCGTTTCGGGG--CGGATATTGGC 278

***** ** * * * ** ** * ** ** ** **

sequence7 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGG-CTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 531
sequence8 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 529
sequence1 CTCCCGTGCCTTGTG-GCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 531
sequence5 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 535
sequence4 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 529
sequence10 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 529
sequence6 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 530
sequence2 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 530
sequence3 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGGGCTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 529
sequence9 CTCCCGTGCCTTGTGTGCGG-CTGGCGAAAAATGAGTCTCTGGCGATGGACGTCGCGA 531
sequence11 CTCCCGTGCCTTGTCTGTGCGG-CTGGCGAAAAATGAGTCAATTGGTGAATGGACGTTGCGA 337

***** * ***** **

sequence7 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTA 588
sequence8 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTA 586
sequence1 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTC 588
sequence5 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTC 592
sequence4 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTC 586
sequence10 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTGGTCTTGTCTGT--TTGCCCGTCACCTTAGTC 587
sequence6 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACTTAGTC 587
sequence2 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTC 587
sequence3 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTC 586
sequence9 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTTG-TCTTGTCTGT--ATGCCCGTCACCTTAGTC 588
sequence11 CATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTTCTCG-TCTTGTCTGTGAATGCCCGTCACCTTAGTC 396

***** * *****

sequence7 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGGG---CGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 645
sequence8 AGCTCCAGGAACCTTAAGGCCACAAATGTGGG---CCGCTTCAATGTGACCCAGTC 643
sequence1 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 648
sequence5 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 652
sequence4 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 646
sequence10 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 647
sequence6 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 647
sequence2 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 647
sequence3 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 646
sequence9 AGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAAATGTGTGATGCGCTTCGATTGTGACCCAGGTC 648
sequence11 GGCTCAAGGACCCTTAGGCGCCACAACCTCTGTG---TGCTTCGA----- 438

**** * * * * * * * * * * * * * * *


```

sequence7      -ACGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAGCATCAA-TAAGAGCGCGAGAGAAA--- 693
sequence8      CAGGCGGGACTAACCGCTGAGTTACACTTAAATGGGGGGGAGAGAGAAAT-- 694
sequence1      -ACGCGGGACTACCCGCTGAGTT-AGATCTCAAGCGGGGAAAAAAA----- 692
sequence5      -AGGCGGGACTACCCGCTGAGTTAGATCTAAAAAAGGGGGGAGAGAA---- 700
sequence4      -AGGCGGGACTACCCGCTGAGTT-AGATCTTAACAGGGGGGGG-AGGAC---- 692
sequence10     -AGGCGGGACTACCCGCTGAGTT-AGATCTTAAATGGGGGGGGGAGGAC---- 694
sequence6      -ACGCGGGACTACCCGCTGAGTT-AGATCAAAAAAGGGGGGAGAAAAC---- 694
sequence2      -AGGCGGGACTACCCGCTGAGTT-AGATCATAAAAAAGAGGAGAGAGAGAA 698
sequence3      -ACGCGGGACTACCCGCTGAGTT-AGATCAATAAAAAAAGGAGAGAGAGAA 697
sequence9      -AGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAGCACATAAAAAAAGGCGGGAAAA---- 696
sequence11     -----

```

Şekil 3.15. *Ferula* türlerine ait dizilerin ClustalW⁽⁸⁷⁾ programı ile düzenlenmiş hali

3.6. ITS Dizilerindeki Nükleotidlerin Karşılaştırılması

Çalışılan türlerde nükleotidler incelendiğinde Adenin nükleotidin 152-163 Sitozinin 181-185, Guaninin 194-203 ve Timinin 153-156 arasında olduğu görülmüştür. Türlerde en fazla Guanin bulunduğu ikinci olarak Sitozin olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Karşılaştırılan örneklerin dizilerinin içerdiği baz sayıları

Takson	A	C	G	T	Toplam
1. <i>F. mervynii</i>	160	184	194	155	693
2. <i>F. coskunii</i>	162	182	197	153	694
3. <i>F. halophila</i>	156	185	198	153	692
4. <i>F. haussknechtii</i>	161	182	203	154	700
5. <i>F. sp.</i>	153	182	203	154	692
6. <i>F. hermonis</i>	152	183	203	156	694
7. <i>F. szowitsiana</i>	159	183	198	154	694
8. <i>F. elaeochytris</i>	163	181	201	153	698
9. <i>F. longipedunculata</i>	163	182	199	153	697
10. <i>F. orientalis</i>	163	183	197	153	696
Ortalama	159.2	182.7	199.3	153.8	695

Çizelge 3.4. Taksonlar arasındaki baz sıklığı

Baz sıklıklarının homojenitesinin Ki- kare testi Ki- kare= 5,611412

<df= 30>, P= 0,99999971

Takson	A	C	G	T	Toplam Baz sayısı
<i>F. mervynii</i>	0.23088	0.26551	0.27994	0.22367	693
<i>F. coskunii</i>	0.23343	0.26225	0.28386	0.22046	694
<i>F. halophila</i>	0.22543	0.26734	0.28613	0.22110	692
<i>F. haussknechtii</i>	0.23000	0.26000	0.29000	0.22000	700
<i>F. sp.</i>	0.22110	0.26301	0.29335	0.22254	692
<i>F. hermonis</i>	0.21902	0.26369	0.29251	0.22478	694
<i>F. szowitsiana</i>	0.22911	0.26369	0.28530	0.22190	694
<i>F. elaeochytris</i>	0.23352	0.25931	0.28797	0.21920	698
<i>F. longipedunculata</i>	0.23386	0.26112	0.28551	0.21951	697
<i>F. orientalis</i>	0.23420	0.26293	0.28305	0.21983	696
Ortalama	0.22905	0.26288	0.28676	0.22129	695

3.7. *Ferula* Cinsine Ait Türlerin nrDNA ITS Baz Dizileri Kullanılarak Yapılan Kladistik Analiz

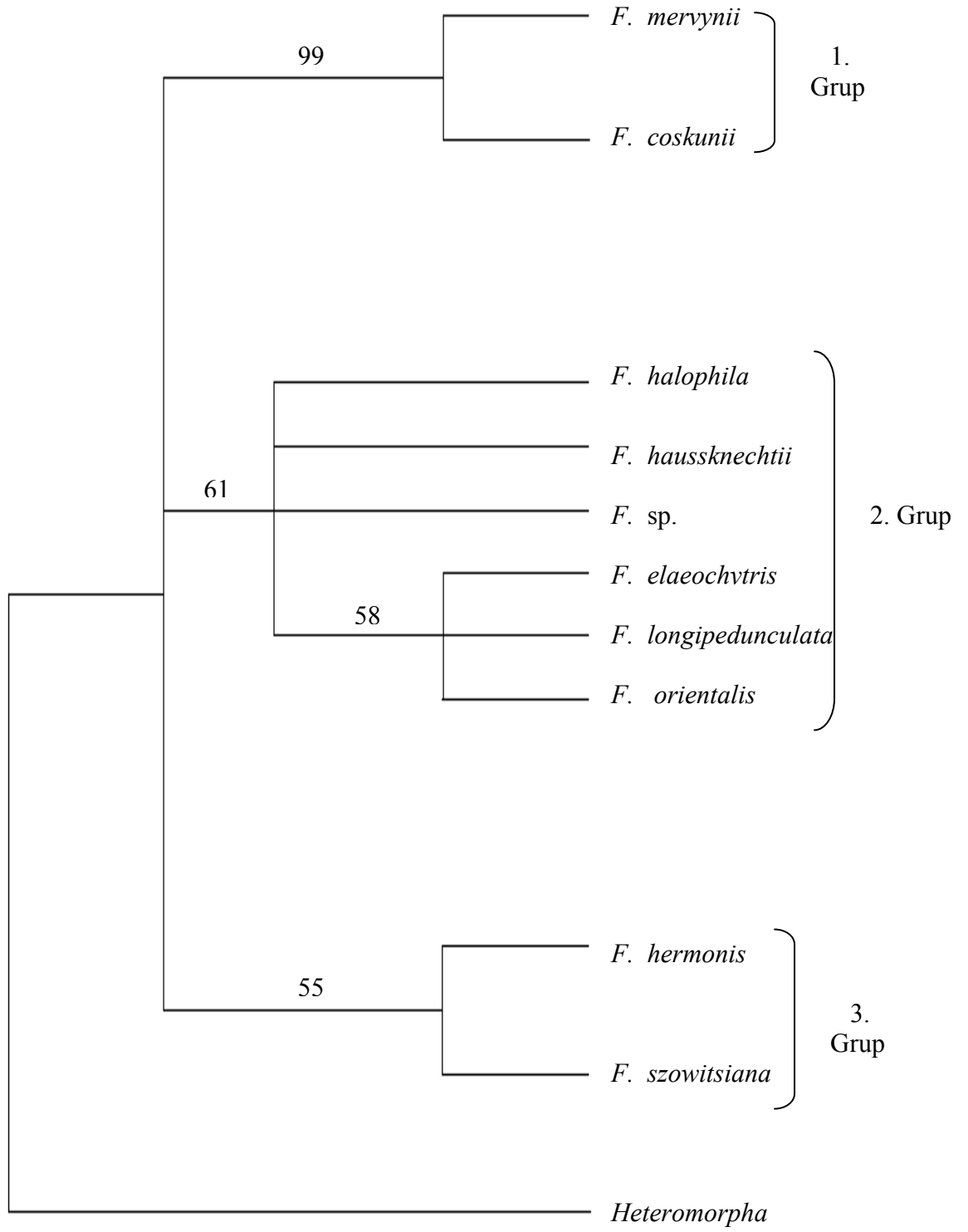
Kladogram temelli analizler, DNA dizilerindeki nükleotid farklılaşmalarını en iyi ifade eden yöntemlerdir⁽⁹¹⁾. Parsimoni analizleri, filogenetiğin kararlılığını ölçmede oldukça kullanışlıdır⁽⁹²⁾. PAUP, filogeniyi oluşturmak üzere geliştirilmiş bir bilgisayar programıdır^(75,76). Filogeniyi oluştururken tutarlılık analizi (Parsimoni) ve uzaklık matrisi metotları (Distance matrix) kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, ITS dizi analizi sonucunda elde edilen baz dizileri MacClade 4.03 (Maddison ve Maddison, 2003⁽⁸⁴⁾) bilgisayar programına veri olarak yüklendi. *Ferula* cinsine ait türler arasındaki genetik varyasyonu ve filogenetik ilişkiyi belirleyebilmek için bir kladistik analiz programı olan PAUP 4.0b.10 (Swafford, 2002⁽⁸⁵⁾) kullanıldı.

Yapılan kladistik analizde, maksimum parsimoni kriter olarak alınmıştır. Bu analize göre, 69 parsimoni ağaç topolojisi oluşmuş olup bunlardan 42 si korunmuştur. Oluşan Strict consensus ağaç, 69 basamaklık (step) bir uzunluğa sahiptir (Şekil 3.16). Yapılan çalışmada, 10 taksonun her birine ait 713 karakterden 587 karakter sabit, 93 karakter değişken ve 33 karakter parsimoni açısından bilgi verici (informatif) dir. *Heteromorpha*⁽⁸⁶⁾ cinsi outgroup olarak alınmıştır. Bütün veri seti ve ağaç topolojisi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için en parsimonik ağaç oluşturulduktan sonra oluşan ağaçların doğruluk indeksi (Consistency index, CI) program tarafından hesaplandı. CI değeri 0,5 ve daha büyük olan değerler, en güvenilir ve kabul gören değerlerdir. Heuristic search analizi sonucu elde edilen kladogramların tutarlılık indeksi (CI) CI: 0.5942 olarak hesaplanmıştır. Bitki genomlarının bir çoğunda dizi varyasyonları ve baz değişimlerinden dolayı, analiz

sırasında karmaşıklıklar (homoplazi=HI) gözlenir. Homoplazi ne kadar düşük ve CI ne kadar yüksekse, oluşan kladogram o kadar bilgi vericidir⁽⁷⁶⁾. Yapılan analizde HI: 0.4058 olarak hesaplanmıştır.

Heuristic search sonucu elde edilen 42 adet ağaç Strict consensus tree seçeneğiyle birleştirilmiştir (Şekil 3.16).



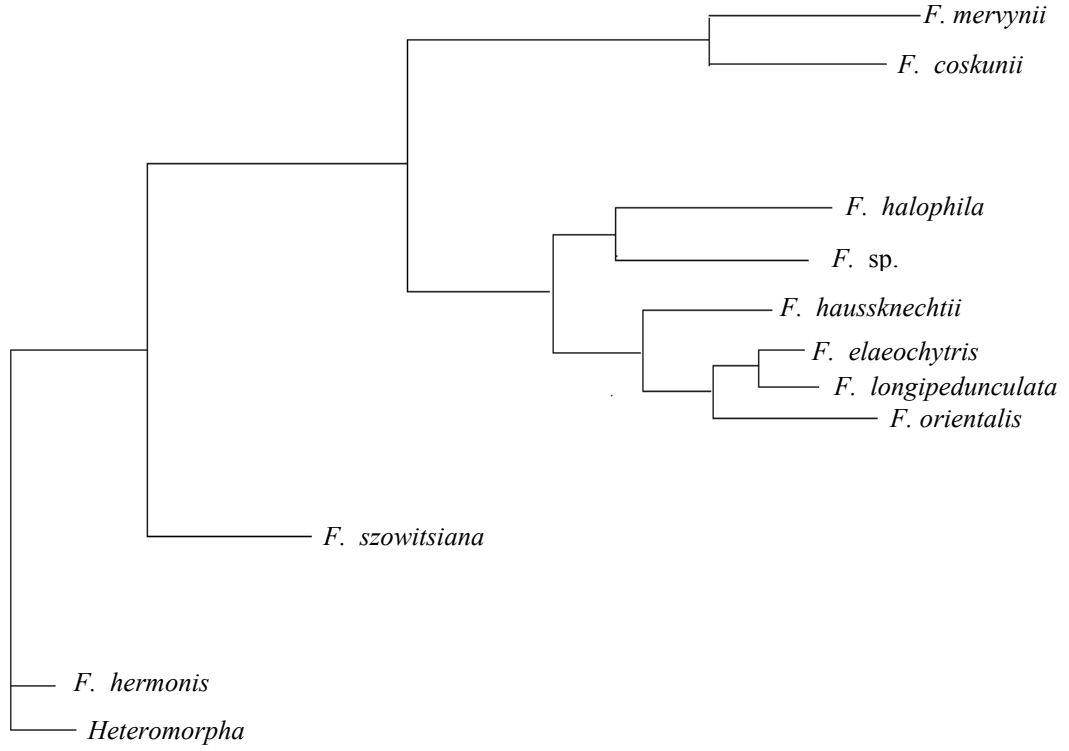
Şekil 3.16. *Ferula* cinsine ait türlerin ITS dizileriyle PAUP 4.0b.10 programında yapılan kladistik analizi sonucunda Strict consensus trees seçeneğine göre elde edilen kladogram (CI: 0.5942, HI: 0.4058) Klad üzerindeki sayılar bootstrap değerleridir

Nümerik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için türler arası uzaklık/yakınlık matrisinin hesaplanması gereklidir. Bu amaçla türler arası uzaklık matrisi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5. ITS dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen taksonların doğrudan eşleştirme değerleri (PAUP 4.0b.10 DISTANCE MATRIX seçeneği)

Türler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>F. mervynii</i>	-										
2. <i>F. coskunii</i>	0.03923	-									
3. <i>F. halophila</i>	0.04394	0.05705	-								
4. <i>F. haussknechtii</i>	0.04047	0.05791	0.01745	-							
5. <i>F. sp.</i>	0.04085	0.05255	0.01598	0.01453	-						
6. <i>F. hermonis</i>	0.04078	0.05241	0.03192	0.03182	0.01875	-					
7. <i>F. szowitsiana</i>	0.03925	0.05668	0.02901	0.02884	0.02739	0.02309	-				
8. <i>F. elaeochytris</i>	0.04068	0.05369	0.01897	0.01015	0.01461	0.03188	0.02886	-			
9. <i>F. longipedunculata</i>	0.03785	0.05655	0.02049	0.01305	0.02043	0.03770	0.02893	0.00574	-		
10. <i>F. orientalis</i>	0.03913	0.06237	0.03057	0.02014	0.02457	0.04046	0.03318	0.01447	0.01741	-	
11. <i>Heteromorpha</i>	0.15088	0.16962	0.14888	0.14803	0.14787	0.14526	0.14568	0.14886	0.14953	0.14909	-

Sıralanan informatif dizilerin PAUP programında Uzaklık matrisine dayalı olarak Komşu bağlantı ağaçları (Neighbour Joining Trees) analizi sonucunda Şekil 3.17 'de gösterilen dendrogram elde edilmiştir.



Şekil 3.17. İformatif diziler ile yapılan Neighbour – Joining dendrogramı

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *Ferula* cinsine ait bazı türlerde tohumların endospermlerinden elde edilen nrDNA ITS bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltılmış; bunların dizi analizi yapılarak türler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıklar ortaya konularak aralarındaki akrabalık ilişkileri araştırılmıştır.

Çizelge 3.5’de, nrDNA ITS dizi analizine dayalı türler arası uzaklık indeksi verilmiştir. Türler arasındaki benzerliği de anlamamıza yarayan bu indeks, PAUP 4.0b.10 programında hesaplanmıştır. Elde edilen bu indekse bağlı olarak yapılan Komşu Bağlantı Ağacı (Neighbour Joining Trees) Şekil 3.17’de gösterilmiştir. Elde edilen bu dendrogram, görsel olarak türler arasındaki yakınlık ve uzaklıkları, aynı zamanda da grup oluşumlarını göstermektedir.

Ayrıca nrDNA ITS dizi analizine dayalı olarak kladistik analizi yine PAUP 4.0b.10 programında gerçekleştirilmiştir. Yapılan kladistik analizde, maksimum parsimoni kriter olarak alınmıştır. Bu analize göre, 69 parsimoni ağaç topolojisi oluşmuştur. Oluşan Strict consensus ağaç, 69 basamaklık (step) bir uzunluğa sahiptir (Şekil 3.16). Analizde kullanılan DNA nükleotid dizisi karakterlerinden 587 karakter sabit, 93 karakter değişken ve 33 karakter tutarlılık (parsimoni) açısından bilgi verici (informatif) dir. *Heteromorpha* cinsi, dışgrup (outgroup) olarak alınmıştır. Bütün veri seti ve ağaç topolojisi arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için en parsimonik ağaç (kladogram) oluşturulduktan sonra, oluşan ağaçların tutarlılık indeksi (Consistency index, CI) program tarafından hesaplandı. CI değeri 0,5 ve daha büyük olan değerler en güvenilir ve kabul gören değerlerdir. Yapılan çalışmada oluşan kladogramın CI

değeri 0,5942 olarak hesaplanmıştır. Bitki genomlarının birçoğunda, pseudogenlerin yer almasından kaynaklanan dizi varyasyonları ve baz değişimleri nedeniyle analiz sırasında karmaşıklıklar (homoplazi) gözlenir. Homoplazi ne kadar düşük ve CI ne kadar yüksekse oluşan kladogram o kadar bilgi vericidir⁽⁷⁵⁾. Yapılan analizde, homoplazi indeksi (HI) : 0.4058 olarak hesaplanmıştır.

Türkiye’de yetişen *Ferula* cinsi üzerine en kapsamlı çalışma, Sağıroğlu⁽⁷⁾ tarafından Türkiye *Ferula* L. (Umbelliferae) Cinsi’nin Revizyonu başlıklı doktora tezinde gerçekleştirilmiştir. Sağıroğlu, *Ferula* cinsi taksonlarında morfolojik, sitolojik, palinolojik ve meyve yüzeyi ile ilgili mikromorfolojik çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmada da Sağıroğlu’nun arazi çalışmalarında toplamış olduğu tohum örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Sağıroğlu⁽⁷⁾, *Ferula* cinsini daha önceki bazı yazarlar gibi (Boissier (1872), Drude (1923), Korovin (1947)) altcins ve seksiyonlara ayırmıştır. Bu yüksek lisans tezi çalışmasında yer alan türler, *Ferula* cinsinin 3 altcins ve 4 seksiyonu içerisinde yer almaktadır.

1. Altçins: *Merwia* (B. Fedtsch.) Drude

Seksiyon: *Discicarpa* Korovin

Çalışılan tür: *Ferula szowitsiana* DC.

2. Altçins: *Narthex* (Falc.) Drude

Seksiyon: *Neonarthex* Korovin

Çalışılan türler: *Ferula coskunii* H. Duman & M.Sağıroğlu

Ferula mervynii M. Sağıroğlu & H. Duman

3. Altains: *Peucedanoides* (Boiss.) Korovin

Seksiyon: *Macrorrhiza* Korovin

Çalışılan türler: *Ferula hermonis* Boiss.

Ferula orientalis L.

Seksiyon: *Xeronarthex* Korovin

Çalışılan türler: *Ferula halophila* Peşmen

Ferula haussknechtii Wolf ex Rech.

Ferula elaeochytris Korovin

Ferula longipedunculata Peşmen

Bu tez kapsamında çalışılan türlerin dört tanesi sadece Türkiye’de yetişen endemik türlerdir⁽⁹³⁾. Çalışılan türlerin endemizm durumları ve tehlike kategorileri Çizege 4.1’de gösterilmiştir^(7,9,93). *Ferula* cinsinin taksonomik olarak dikkat çeken karakterlerinden en önemlilerinin taban yaprakları, kınlar, çiçeklenme bölgesi ve meyvede olduğu gözlenmiştir. Taban yapraklarının şekli, büyüklüğü, son segmentlerinin biçimi, ölçüleri ve tüy durumu ayırt edici karakter olarak kullanılmıştır. Gövdede kınların şekli, ölçüleri ve tüy durumu taksonomik olarak önemlidir. Ray ve çiçek sayıları, pedisel boyu kullanılan ayırt edici karakterlerdendir⁽⁹⁴⁾.

Çizelge 4.1. Bu çalışmada yer alan taksonların endemizm durumları ve tehlike kategorilerinin karşılaştırılması^(7,14,93)

Taksonlar	Endemizm durumu ⁽¹⁴⁾	Ekim ve arkadaşları (2000) ⁽⁹³⁾	Sağiroğlu (2005) ⁽⁷⁾
<i>F. szowitsiana</i>			LC
<i>F. coskunii</i>	Endemik		CR
<i>F. mervynii</i>	Endemik		CR
<i>F. hermonis</i>		VU	CR
<i>F. orientalis</i> subsp. <i>orientalis</i>			LC
<i>F. halophila</i>	Endemik	VU	EN
<i>F. haussknechtii</i>			VU
<i>F. elaeochytris</i>			LC
<i>F. longipedunculata</i>	Endemik	EN	CR

Bu tez çalışmasında nrDNA ITS dizi analizine dayalı olarak PAUP 4.0b.10 programında yapılan filogenetik analiz sonucu oluşan kladogramda 3 ana klad ortaya çıkmıştır. Bu kladlarda bulunan türlerin üç farklı altcins ile uyumlu olduğu açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 3.16).

Ferula coskunii ve *Ferula mervynii* türleri 1. kladda yer almakta olup, *Narthex* altcins ile uyumludur. Bu altcinsin özellikleri şu şekildedir: Monokarpik ya da polikarpik bitkilerdir, yapraklar erken kurur, bunlar uzun ya da kısa loblu, yumuşak tüylü ya da tüsüzdür. Petaller sarı, nadiren solgun sarı, tüsüz, genellikle uçtan belirgin kıvrık, nadiren hafif düz; stilopodium genişlemiş kenarları dalgalı loblu; merikarp sırttan hafifçe şişkin, yan taraftaki kanatlar dar, reçine kanalları genişlemiş ve içi tamamen reçine ile doludur. *F. coskunii* ve *F. mervynii* türleri, aynı zamanda aynı seksiyon (Seksiyon: *Neonarthex*) içerisinde yer almaktadır. Her ne kadar Türkiye florasında altcins ve seksiyon ayrımı yapılmamış olsa da Sağıroğlu'nun doktora tezi çalışmasında bu türlerin biri diğerinden hemen sonra sıralanmış olması (*F. coskunii* 3. sırada, *F. mervynii* 4. sırada) bunların birbirleriyle çok yakın akraba türler olduğunu göstermektedir. Türler arasındaki morfolojik farklılıklar Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çalışılan türlerden *F. halophila*, *F. haussknechtii*, *Ferula* sp., *F. elaeochytris*, *F. longipedunculata* ve *F. orientalis*, ikinci kladda yer almakta olup, bunların tamamı *Peucedanoides* altcinsi içerisinde yer almaktadır. Genellikle yükseklerde yetişen *Peucedanoides* altcinsi polikarpik olup, bu altcinsten petaller 1-2 mm ve sırttaki reçine kanalları 1(-3) adettir.

Bu klad içerisinde *F. elaeochytris*, *F. longipedunculata* ve *F. orientalis* ayrı bir alt klad meydana getirmektedir. Bu alt kladdaki *F. elaeochytris* ve *F.*

longipedunculata birbirlerine çok yakın türler olup, Sağıroğlu'nun çalışmasında *F. elaeochytris* 19. sırada ve *F. longipedunculata* 20. sırada, Türkiye florasında ise sırasıyla 13 ve 14. sırada yer almaktadır. İkinci kladda yer alan türler arasındaki morfolojik farklılıklar Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 'de verilmiştir.

Üçüncü kladda *F. szowitsiana* ve *F. hermonis* yer almaktadır. *F. szowitsiana*, farklı bir altcins olan *Merwia* içerisindeki *Discicarpa* seksiyonunda bulunmaktadır. Bu altcins ve seksiyon, Türkiye'de sadece *F. szowitsiana* türü ile temsil edilmektedir. *Merwia* altcinsinin özellikleri şu şekildedir: Polikarpik, petaller solgun sarı, 2 mm uzunluğunda, dış yüzü setülöz-puberulent, stilopodyum yassı, uzun loblu; merikarplar sırt tarafından basık, yan taraftaki kanatlar genellikle geniş, reçine kanalları çok sayıda, sırt taraftakiler 8-12 kadar, yapraklar yumuşak, erken solan, genellikle küçük loblu, setüloz-puberulent tüylü. Sağıroğlu, doktora tezi çalışmasında bu türün, *Ferula* cinsinin Türkiye'de yetişen türleri arasında yakın akrabasının olmadığını ifade etmiştir. Türkiye'de yetişen *Ferula* cinsi taksonlarının meyveleri genelde kahverenkli'dir. *F.szowitsiana* türünün meyvesi ise beyazımsı- krem renktedir. *F. szowitsiana* ve *F. hermonis* arasındaki morfolojik farklılıklar Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Komşu bağlantı ağaçları (Neighbour Joining Trees) analiziyle elde edilen dendrogramda; *F. mervynii* ve *F. coskunii* ayrı bir grup oluştururken, *F. halophila*, *F. haussknechtii*, *Ferula* sp. *F. elaeochytris*, *F. longipedunculata* ve *F. orientalis* ikinci bir grup oluşturmuştur. *F. szowitsiana* ve *F. hermonis*, birbirinden ayrılarak tek türden oluşan gruplar meydana getirmiştir. Komşu bağlantı ağacı, *F. szowitsiana* ve *F. hermonis*'i birbirinden ayırmıştır. Bu bulgu, Sağıroğlu'nun⁽⁷⁾ *F. szowitsiana*'nın Türkiye'de yakın akraba bir türünün bulunmadığı düşüncesini kısmen

desteklemektedir. *Ferula hermonis* ve *F. orientalis* *Peucedanoies* altcinsinin *Macrorrhiza* seksiyonu içerisine konulmuştur. Yapılan bu çalışma, bu seksiyonun doğal bir seksiyon olmayabileceğini, *F. hermonis*'in ayrı bir altcins ve seksiyon içerisinde yer alabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmadan elde edilen moleküler veriler ile yapılan analizler bu cinsin altcins ve seksiyonlar seviyesinde ayrılarak sınıflandırılmasını desteklemiştir. Ayrıca bu çalışma cinsin monofiletik olmayıp, polifiletik olabileceği hususunda ipuçları vermiştir.

Çizelge 4.2. *F. coskunii* ve *F. mervynii*'nin karşılaştırılması⁽⁷⁾

Karakterler	<i>F. coskunii</i>	<i>F. mervynii</i>
Monokarpik veya polikarpik olma, Filiform yapılar		Polikarpik, tabanda Filiform yaprak sapı kalıntıları mevcut, 1-3 cm
Gövde boyu	80-225 cm	30-90(-130) cm
Gövdenin tabanda çapı	0.5-1.5 cm	1,5- 6 mm
Tabandaki yaprak ayasının pinnatlık durumu	6-7 pinnat	3-4 pinnat
Taban yapraklarının ölçüleri	50- 90 x 20-40 cm	10-20 x 6-15 cm
Taban yapraklarının tüy durumu	İlk segmentler seyrek tüylü, son segmentler yoğun kıvrık tüylü	Tüysüz

Çizelge 4.2. (devam ediyor)

Kınsız yaprak sapı	20-40 cm	1-3 cm
Alt, orta ve üst kınların şekli ve diğer özellikleri	Tüm kınlar linear-lanseolat, tüysüz. Alt ve ortadaki kınlar gövdeyi sarıcı ve üst kınlar yarı sarıcı	Tüm kınlar linear – lanseolat, tüysüz. Alt ve orta kısımdaki kınlar gövdeyi sarıcı, üst kınlar gövdeyi yarı sarıcı
Yaprakçık loplarının şekli	Linear-lanseolat	Linear
Yaprakçık loplarının ölçüleri	0.5-2(-3) x 0.2-0.4 mm	5-25 x 0.5-2 mm
Çiçeklenme durumu	Panikulat	Panikulat-kompound
Merkezi umbelin boyu	0.5-1 cm saplı	2 cm
Yan umbellerin özellikleri	2 tane, genellikle verimsiz	Yok
Işınların sayısı ve ölçüleri	(4-)8-14(-18) tane, 1-2(-3) cm	4-11 tane, 2-8 cm

Çizelge 4.2. (devam ediyor)

Umbellulardaki çiçek sayısı	20-35 çiçekli	20-55 tane
Petallerin özellikleri	Tüysüz, 1.5-2 mm, uçtan geriye kıvrık	Koyu sarı renkte, 1-1.5 mm, tüysüz, uçtan içe kıvrık
Stilopodyumun şekli ve durumu	Terete	Silindirik, belirgin şekilde dalgalı
Brakteollerin özellikleri	2-4 tane bazen yok, 0.5-1 mm, linear-lanseolat şekilde, dökülücü	Genellikle yok, nadiren 2-4, 1-2 mm, linear-lanseolat, tüysüz, dökülücü
Olgun meyve sapı	3-5 mm	5-15 mm
Merikarplerin şekli ve ölçüleri	Eliptik-oblong, 5-9 x 3-5 mm, koyu yeşilimsi-kahverenkte	Eliptik-oblong, 4-5(-7) x 2-4 mm, koyu kahverenkte
Meyve kommissural yüzeyi	Düz	Asperous

Çizelge 4.2. (devam ediyor)

Sırt taraftaki kanatların durumu	Zayıfça filiform	Filiform
Yan taraftaki kanatların durumu	0.3-0.5 mm	0.1-0.3 mm
Sırtta her kanat arasındaki vittae sayısı	1 tane	2-4
Kommissuraldeki vittae sayısı	2-4 tane	2-4

Çizelge 4.3. *F. haussknechtii* ve *F. halophila*'nın karşılaştırılması⁽⁷⁾

Karakterler	<i>F. haussknechtii</i>	<i>F. halophila</i>
Monokarpik veya polikarpik olma, Filiform yapılar	Polikarpik	Polikarpik, Filiform yapılar yoğun
Gövde boyu	50-150 cm	60-120 cm
Gövdenin tabanda çapı	0.5-1 cm	0.5- 1.5 cm
Tabandaki yaprak ayasının pinnatlık durumu	5 pinnat	(4-)5-6 pinnat
Taban yapraklarının ölçüleri	30-50 x 16-30 cm	25- 45 x 15-30 cm
Taban yapraklarının tüy durumu	İlk segmentler seyrek setüloz, son segmentler yoğun setüloz tüylü	İlk segmentler seyrek tüylü, son segmentler skabrit tüylü
Kınsız yaprak sapı	Yok	2-10 cm

Çizelge 4.3. (devam ediyor)

Alt, orta ve üst kınların şekli ve diğer özellikleri	Bütün kınlar gövdeyi sarıcı, tüysüz. Alt kısımdaki kınlar silindirsiloblong, ortadaki kınlar ovatoblong, üst kısımdaki kınlar genişçe ovat	Bütün kınlar gövdeyi sarıcı, tüysüz. Alt kısımdaki kınlar oblong, ortadaki kınlar ovat, üst kısımdaki kınlar ovat'tan ovat- oblanseoat'a kadar
Yaprakçık loplarının şekli	Linear-lanseolat	Linear-filiform
Yaprakçık loplarının ölçüleri	0.5-3(-7) x (0.5-)0.7-1.5 mm	(3-)5-15(-20) x 0.5-1 mm
Çiçeklenme durumu	Panikulate-korimbose	Panikulate-korimboz
Merkezi umbelin boyu	0.2-2 cm	3-10(-20) mm
Yan umbellerin özellikleri	Genellikle verimli	2-3 tane ve genelde verimli
Işınların sayısı ve ölçüleri	5-13 (17), 1-3.5 cm	(3-)8-12(-15) tane, 1.5-4 cm

Çizelge 4.3. (devam ediyor)

Umbellulardaki çiçek sayısı	(4-)6-14	8-15
Petallerin özellikleri	1.5-2.5, tüysüz, uçtan içe kıvrık	2-2.5 mm, tüysüz, uçtan geriye kıvrık
Stilopodyumun şekli ve durumu	Konikal	Konikal
Brakteollerin özellikleri	5-6 tane, linear-lanseolat, 0.3-0.8 mm, tüysüz, dökülücü	5-6 linear-lanseolat, 0.5-2mm, tüysüz, dökülücü
Olgun meyve sapı	5-7 mm	5-10(-12) mm
Merikarplerin şekli ve ölçüleri	Eliptik-oblong, ,(8-)9-12(-14) x 4-7 mm, açık kahve renkte	Obovat, 8-15 x 5-8 mm, açık kahve renkte
Meyve kommissural yüzeyi	Asperous	Düz
Sırt taraftaki kanatların durumu	Filiform	Zayıfça filiform

Çizelge 4.3. (devam ediyor)

Yan taraftaki kanatların durumu	0.5-1 mm	0.7-1.5(-2) mm
Sırtta her kanat arasındaki vittae sayısı	1-2	1
Kommissuraldeki vittae sayısı	2-4	(4-)6-8 tane

Çizelge 4.4. *F. longipedunculata*, *F. orientalis* ve *F. elaeochytris*'in karşılaştırılması⁽⁷⁾

Karakterler	<i>F. longipedunculata</i>	<i>F. orientalis</i>	<i>F. elaeochytris</i>
Monokarpik veya polikarpik olma, Filiform yapılar	Polikarpik	Polikarpik, tabanda Filiform yaprak sapı kalıntıları mevcut, 1-5 cm	Polikarpik, Filiform yapılar 2-5 cm
Gövde boy	80-150 cm	70-200 cm	70-230 cm
Gövdenin tabanda çapı	0.7- 2 cm	0.4-2 cm	0.5-3 cm
Tabandaki yaprak ayasının pinnatlık durumu	5-6 pinnat	5-6 pinnat	6-7 pinnat
Taban yapraklarının ölçüleri	20-50 x 10-32 cm	25-70 x 15-45 cm	25-60 x 15-45 cm

Çizelge 4.4. (devam ediyor)

Taban yapraklarının tüy durumu	İlk segmentler skabrit veya nadiren setüloz tüylü, son segmentler setüloz tüylü	Yapraklar nadiren çok seyrek skabrit tüylü	İlk segmentler seyrekten – skabrit tüylüye kadar, son segmentler skabrit tüylüden-setüloz tüylüye kadar
Kınsız yaprak sapı	3-15 cm	4-15 cm	2-8 cm
Alt, orta ve üst kınların şekli ve diğer özellikleri	Bütün kınlar gövdeyi sarıcı, tüysüz. Alttakiler silindirik, orta ve üsttekiler yumurtamsı-dikdörtgensel	Bütün kınlar gövdeyi sarıcı, tüysüz. Alt kısımdakiler oblong-lanseolat, ortadaki kınlar ovat-lanseolat'dan oblong'a kadar, üst taraftaki kınlar ovat- lanseolat	Bütün kınlar gövdeyi sarıcı, tüysüz. Alt taraftaki kınlar oblong- lanseolat, ortadaki kınlar oblongtan ovat-lanseolat'a kadar, üst taraftaki kınlar oblong- lanseolat

Çizelge 4.4. (devam ediyor)

Yaprakçık loplarının şekli	Bazen involute	Setaseus-filiform	Linear-lanseolat
Yaprakçık loplarının ölçüleri	0.5-3 x 0.5-1 mm	(1-)3-24 x 0.1-0.4 mm	1.5 x 0.2-0.7 mm
Çiçeklenme durumu	Panikula- korimboz, bazen bazen rasemöz	Panikulat- korimboz	Panikulat- korimboz
Merkezi umbelin boyu	0.3-2(-4) cm	0.5- 2.5 cm	0.2-2 cm
Yan umbellerin özellikleri	Genellikle verimsiz	Verimli	Genellikle verimli
Işınların sayısı ve ölçüleri	(-6)10-18(-20) tane	(4-)10-17(-22) tane, 1.5- 5 cm	(6-)10-20(-27)
Umbellulardaki çiçek sayısı	10-18(-22)	6-18 çiçekli	8-16(-22)
Petallerin özellikleri	1.5-2 mm, tüysüz, uçtan içe kıvrık	1.5-2.5 mm, tüysüz, uçtan içe kıvrık	1.5-2 mm, sarı, tüysüz, uçtan içe kıvrık

Çizelge 4.4. (devam ediyor)

Stilopodyumun şekli ve durumu	Konikal	Konikal	Konikal, kahverenkte
Brakteollerin özellikleri	6-7, linear-lanseolat, 0.3- 1 mm, tüysüz, dökülücü	3-5, 1-2 mm, ovat-lanseolat, tüysüz, dökülücü	4-6, linear-lanseolat, 0.5-2 mm, dökülücü
Olgun meyve sapı	8-14 mm	5-15 mm	4-10 mm
Merikarplerin şekli ve ölçüleri	Oblong, 10-17 x 5-8 mm, açık kahve renkte	Oblong-elipsten, yumurtamsı-ters lanseolatya kadar, 10-15 x 4-6 mm, açık kahverenkte	Eliptik-oblog, 7-15 x 4-7 mm, kahverengi
Meyve kommissural yüzeyi	Düz	Düz	Düz
Sırt taraftaki kanatların durumu	Filiform, bazen hafifçe dalgalı	İpliksi	Filiform
Yan taraftaki kanatların durumu	1-1.5(-2) mm	0.5-1(1.5) mm	0.5-1 mm
Sırtta her kanat arasındaki vittae sayısı	1	1(-2)	1(-2)
Kommissuraldeki vittae sayısı	4-6	2-8	2-6

Çizelge 4.5. *Ferula szowitsiana* ve *F. hermonis*'in karşılaştırılması⁽⁷⁾

Karakterler	<i>Ferula szowitsiana</i>	<i>F. hermonis</i>
Monokarpik veya polikarpik olma, Filiform yapılar	Polikarpik	Polikarpik, tabanda Filiform yaprak sapı kalıntıları mevcut, 3-6 cm
Gövde boyu	22-80 cm	65-175 cm
Gövdenin tabanda çapı	4-15 mm	0.5-1.5 cm
Tabandaki yaprak ayasının pinnatlık durumu	3-4 pinnat	5-6 pinnat
Taban yapraklarının ölçüleri	(8-)18-30(-42) x (6-)15-25 (-30) cm	30-50 x 20-35
Taban yapraklarının tüy durumu	İlk segmentler setüloz-puberulent tüylü, son segmentler puberulent tüylü	Tüysüz
Kınsız yaprak sapı	1-3 (5) cm	5-10 cm
Alt, orta ve üst kınların şekli ve diğer özellikleri	Bütün kınlar linear-oblong, yoğun veya seyrek tüylü. Alt kınlar gövdeyi en fazla $\frac{3}{4}$ oranında sarıcı, orta ve üst kısımdakiler $\frac{1}{2}$ oranında sarıcı	Bütün kınlar gövdeyi sarıcı, tüysüz. Alt kınlar, silindirik-oblong, ortadaki kınlar, dikdörtgenimsi- yumurta, üst kısımdaki kınlar, ovat-lanseolat

Çizelge 4.5. (devam ediyor)

Yaprakçık loplarının şekli	Triangular-oblong' dan lineara kadar	Kılsı linear
Yaprakçık loplarının ölçüleri	(0.5)1-2(-6) x 0.5-1.5(-2) mm	1-4(-9) x (0.2-)0.4-0.7 mm
Çiçeklenme durumu	Panikulat-korimboz	Panikulat- korimbose
Merkezi umbelin boyu	0.5-5 cm nadiren sapsız	2-10 mm
Yan umbellerin özellikleri	Yükselici veya dik, 2 tane bazen yok, genellikle verimsiz	Kısa saplı (2-6 cm)
Işınların sayısı ve ölçüleri	(4-)6-12(-18),1-5 cm	5-16 tane, 1-2.5 cm
Umbellulardaki çiçek sayısı	8-12	6-15 çiçekli
Petallerin özellikleri	(1.5-)2-3(-4) mm, sırt tarafı setulöz, uçtan içe kıvrık	Sarı renkte, 2-2.5 mm, tüysüz, uçtan geriye kıvrık
Stilopodyumun şekli ve durumu	Konikal ve ekzokarpa gömülü	Silindirsi-konikal
Brakteollerin özellikleri	4-5 tane, 0.7-2 mm kenarları selülöz tüylü, dökülücü	Linear-lanseolat, 0.5-2 mm, tüysüz, dökülücü
Olgun meyve sapı	3-7 mm	4-7 mm

Çizelge 4.5. (devam ediyor)

Merikarplerin şekli ve ölçüleri	Yuvarlağımsı-oblong, 9-18 x 6-15 mm, beyazımsı-krem renkte	Elips-oblong, 6-11 x 4-6 mm, kahverenkte
Meyve kommissural yüzeyi	Düz	Düz
Sırt taraftaki kanatların durumu	Filiform ve nadiren dalgalı	İpliksi şekilde
Yan taraftaki kanatların durumu	1-4 mm	0.5-0.9 mm
Sırtta her kanat arasındaki vittae sayısı	2-6 tane	1(-2)
Kommissuraldeki vittae sayısı	6-12 tane	4-6 tane

KAYNAKLAR

1. İ. Atalay, Türkiye Vejetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1994.
2. S. Çelik, *Centaurea* L. Cinsi psephelloidea (Boiss) sosn. Seksiyonuna ait türlerin ekolojik özellikleri, Doktora tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2003.
3. A. Güner, N. Özhatay, T. Ekim and K.H.C. Başer (eds.), Flora of Turkey and The East Aegean Islands. (Suppl.2) Edinburg Univ. Pres., Edinburg, 2000.
4. S. Erik ve B. Tarikahya, Türkiye florası üzerine. Kebikeç, 17;139-163, 2004.
5. V. H. Heywood, The biology and chemistry of the Apiaceae, Academic Press, New York, 1971.
6. Ö. Seçmen, Y. Gemici, G. Görk ve L. Bekat, Tohumlu bitkiler sistematığı, Ege Üniversitesi, Fen Fak., Kitaplar serisi, Ege Üniversitesi Basımevi, 4. Baskı, İzmir, s.262-264, 1995.
7. M.Sağiroğlu. Türkiye *Ferula* L. (Apiaceae) Cinsi'nin Revizyonu, Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2005.
8. H. K. Çağın, Bitkilerin gizli dünyası IV Maydanozgiller (Apiaceae), İstanbul, 2005.
9. P.H. Davis, Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg University Press., Edinburg., 4. Cilt, pp. 265-266, 1972.
10. L.P. Tomkovich and M.G. Pimenov, Bull. Main Bot. Gard., **124**, 74-91, (1982).

11. L.P. Tomkovich and M.G. Pimenov, Bot. Zhurn., **72**(7), 964-971, (1987).
12. E. Akalın, Türkiye'nin batısında yetişen *Ferulago* türleri üzerine farmasötik botanik araştırmalar, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul, 150s., 1999.
13. <http://www.wildwins.com/coins/greece/thrace/moraneia/i.html> (Erişim tarihi: 20.12.2008).
14. H. Peşmen, *Ferula* L., P.H. Davis (Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburg University Press. Edinburg. 4. Cilt, pp. 440-453, 1972.
15. S. Menglan and M.F. Watson, *Ferula* L., Flora of China, **14**, 174-180, (2005).
16. http://www.maltawildplants.com/APIA/Ferula_communis.php (Erişim tarihi: 02.01.2009)
17. A. Baytop, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları: Ankara, 1997.
18. E. Boissier, Flora Orientalis, Volumen Secundum, Geneve, Switzerland, 1872.
19. E. Boissier, Flora Orientalis, Supplement 23., Basileae et Genevae, Switzerland, 1888.
20. http://www.Ipnisernlet?whole_name=&family=apiaceae&intfafamily=&genus=Ferula (Erişim tarihi: 09.06.2008).
21. M. G. Pimenov and M. V. Leonov, T. J. Bot., **6**, 139-145, (2004).
22. H. Peşmen, Materials for a Flora of Turkey XXIV: *Ferula* and *Ferulago*. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh vol. 31, 1971.
23. M. Zohary, *Ferula* L. In: M. Zohary, ed. Flora palaestina (text), Jerusalem: Israel Academy of Sciences and Humanities, s: 435-439, (1966a).

24. M. Zohary, *Ferula* L. In: M. Zohary, ed. Flora palaestina (plate), Jerusalem: Israel Academy of Sciences and Humanities, s:629-637, (1966b).
25. SJ. Mouterde, *Ferula* L. In: D. El-machreq, ed. Nouvelle Flore Du Liban Et De La Syrie Tome II Texte. Beyrouth, s:639-643, (1986a).
26. SJ. Mouterde, *Ferula* L. In: D. El-machreq, ed. Nouvelle Flore Du Liban Et, De La Syrie Tome II Second, Atlas, Beyrouth, s:298-302, (1986b).
27. DF Chamberlain, KH. Rechinger, *Ferula* L. In: KH. Rechinger, ed. Flora Iranica Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, s: 387-425, (1987a).
28. DF Chamberlain, KH. Rechinger, *Ferula* L. In: KH. Rechinger, ed. Flora Iranica Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, s:317-384, (1987b).
29. <http://www.ulakbim.gov.tr> (Erişim tarihi: 10.10.2008).
30. www.ansiklopedi.bilgi.com (Erişim tarihi: 10.12.2008).
31. P.H. Davis, P.C. Harper and I.C. Hedge, Plant Life of South-West Asia, The Botanical Society of Edinburgh, s:97-98, (1970).
32. <http://www.persia/indplant/ferula> (Erişim tarihi: 17.04.2009).
33. O. Gülşen ve M. Mutlu, Alatarım, **4**(2), 27-37, (2005).
34. K. M. Khawar, Mercimek (*Lens culinaris* Medik)'te Doku Kùltürü Çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı, Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2001.
35. S. Uranbey, *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Patates (*Solanum tuberosum* L.) Gen Aktarımı ve Patojen İlişkili Genlerin Transgenik Bitkilerdeki Belirtileri, Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2002.
36. M. Soller and J. S. Beckmann, Theor. Appl. Gen., **67**, 25-33, (1983).
37. S. D. Tanksley, Plant Mol. Biol. Rep., **1**(1), 3-8, (1983).

38. J. C. Avise, *Molecular Markers, Natural History And Evolution*, Chapman & Hall. International Thomson Publishing, New York, 1994.
39. P. K. Bretting and M. P. Widrechner, *Hort. Sci.*, **30**(7), 1349-1356, (1995).
40. P. S. Soltis, D.E. Soltis and M. W. Chase, *Letters to Nature*, **402**(25), 402-403, (1999).
41. A. J. Lowe, O. Hanotte and L. Guarino, *P. Genet. Res. News.*, **107**, 50-54, (1996).
42. R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich, *Science*, **239**, 937-945, (1988).
43. S.R. Reiter, M. Young and P.A. Scolnik, *Genetic linkage of the Arabidopsis genome: Methods for Mapping with Recombinant Inbreds and RAPDs, Methods in Arabidopsis Research*, World Scientific Publishing, Singapore, 1993.
44. D. Botstein, R. White, M. Skolnick and R.W. Davis, *Am. J. Human Genet.*, **32**, 314-331, (1980).
45. B. Baldwin, M. J. Sanderson and M. Porter, *Ann. Missouri Bot.*, **82**, 247-277, (1995).
46. J.S. Beckman and T.L. Osborn, *Plant genomes: Methods for genetic and physical mapping*, Kluwer Acad Pres, Boston USA, 1992.
47. R. Mathew, K.K.Singh and P. Bernald, *FEMS Microbiology Letters*, **226**(1), 9-14, (2003).
48. S.R. Downie, G.M. Plunkett, M.F. Watson, K. Spalik, D.S. Kantz-Dawnie, C.M. Valiejo-Roman, E.Ī. Terentieva, A.V. Troitsky, B.Y. Lee, J. Lahham and A. El-Oqlah, *J. Bot.*, **58**(2), 301-330, (2001).
49. R. Kurzyna-Młynik, A. A. Oskolski, S. R. Downie, R. Kopacz, A. Wojewódzka and K. Spalik, *Plant Syst. and Evol.*, 274, 47, (2008).

50. Y.Ajani, A. Ajani, J.M. Cordes, M.F. Watson and S. R. Downie, *Taxon*, **57**(2), 383-401, (2008).
51. C. M. Valiejo-Roman, E. I. Terentieva, T. H. Samigullin, M. G. Pimenov, F. Ghahremani-Nejad and V. Mozaffarian, *Feddes Repertorium*, **117**, 367-388, (2006).
52. S. R. Downie, D. S. Katz-Downie and K. Spalik, *Am. J. Bot.*, **87**(1), 76-95, (2000).
53. D. S. Katz-Downie, C. M. Valiejo-Roman, E. I. Terentieva, A. V. Troitsky, M. G. Pimenov, B. Lee and S.R. Downie, *Pl. Syst. Evol.*, **216**, 167-195, (1999).
54. Q. Z. Wang, X. J. He, S.D. Zhou, Y. K. Wu, Y. Yu, Y.L. Pang, *J. Syst. Evol.*, **46**(2), 142-154, (2008).
55. Z.Y. Yang, Z. Chao, K.K. Huo, H. Xie, Z.P. Tian and S.L. Pan, *Phytomedicine*, **14**, 416-422, (2007).
56. K. Spalik, J. P. Reduron and S. R. Downie, *Plant Syst. Evol.*, **243**, 189-210, (2004).
57. S.S. Neves and M.F. Watson, *Ann. Bot.*, **93**, 379-398, (2004).
58. A. Kabaoğlu, Türkiye’de bulunan *Hypogymnia*(Nyl.) türlerinde rDNA ITS bölgesi dizi analizi ile çeşitliliğin tanımlanması, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
59. M. Maraş, *Turkish J. Biochem.*, **33**(4), 163-168, (2008).
60. W.S. Klug and R. M. Cummings, *Genetik*, C. Öner, (eds.), Palme Yayıncılık, Ankara, 2002.
61. T. J. White, T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.

- J. Sninsky and T. J. White, eds.), Academic Press., San Diego, California ,Pp. 315-322, (1990).
62. L.C. Yeh and J. C. Lee, *J. Mol. Biol.*, **211**, 699-712, (1990).
 63. I. Young and A.W. Coleman, *Mol. Phyl. Evol.*, **20**, 236-242, (2004).
 64. T. D. Bruns, R. Fogel and J. W. Taylor, *Mycologia*, **82**(2), 175-184, (1990).
 65. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press, 1989.
 66. http://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed Spacer (Erişim tarihi: 02.04.2008).
 67. A.Yıldırım ve N. Kandemir, *Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23*. In: S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu, *Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları* (ed.), Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları. Konya, 2001.
 68. A. Coleman and V. Vacquier, *J. of Mol. Evol.*, **54**, 246-257, (2002).
 69. G. A. Elbadri, P. De Ley, L. Waeyenberge, A. Vierstraete, M. Moens and J. Vanfleteren, *Int. J. Parasitol.*, **32**(2), 199-205, (2002).
 70. A. Alpaslan, *Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri, 21. yüzyılda tüberküloz sempozyumu ve II. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri kursu*, Samsun, 2003.
 71. B. Goffinet and R. Bayer, *Fungal Genetics and Biology*, **21**, 228-237, (1997).
 72. M. Grube and S. Kroken, *Mycol. Res.*, **104**(11), 1284-1294, (2000).
 73. F. Sanger, S. Nicklen and A.R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467, (1977).
 74. A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**(2), 560-4, (1977).

75. E.O. Wiley, D. Siegel-Causey, P.R. Brooks and V.A. Funk, The Complete Cladist., The University of Kansas, Museum of Natural History Special Publications, **19**, 129, (1991).
76. P.L. Forey, C.J. Humphries and R.W. Kitching, Cladistics, A practical course in systematics, Clarendon Press, Oxford, 1992.
77. G.L. Stebbins, Essays in comparative evolution, The need for evolutionary comparisons, Plant Evolutionary Biology, D.L. Gottlieb, S.K. Jain (eds.), California University Press, 1988.
78. R.J. Pankhurst and D.A. Preece, Phylogeny and cladistics, Computer- assisted analyses, 1980.
79. C.A. Stace, Modern Phylogenetic Methods (Cladistics), Plant Taxonomy and Biosystematics, Cambridge University Press, Second edition, 1993.
80. G. Plunkett, E. Soltis and P. Soltis, Am. J. Bot., **84**(4), 499-515, (1996).
81. R. Downie, R. L. Hartman, Feng-Jie Sun and D.S.K. Downie, Can. J. Bot., **80**, 1295-1324, (2002).
82. M. McDonald, L. Eliot and P. Sweeney, Seed Sci. Tech., **22**, 171-176, (1994).
83. R. F. Weaver, Molecular Biology, McGraw-Hill Comp. New York, USA, 1999.
84. W.P. Maddison and D.R. Maddison, Mac Clade, Analysis of phylogeny and character evolution, version 3 edition, Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 2003.
85. D.L. Swafford, PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) vers. 4.0b 10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA, 2002.
86. R. Downie and D.S. Katz-Downie, Am. J. Bot., **83**(2), 234-251, (1996).
87. www.ebi.ac.uk/clustalw (Erişim tarihi: 10.01.2009).

88. <http://www.mrc-Imb.cam.ac.uk/genomes/cvogel/Tutorials/MolEvol.htm>
(Erişim tarihi: 25.08.2008).
89. DW. Mount, Alignment of pairs of sequences, Bioinformatics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
90. <http://cmgm.stanford.edu/help/manuel/software/sequence/phylogenetic>
(Erişim tarihi: 20.11.2008).
91. C.D. Bailey, T.G. Carr, S.A. Haris and C.E. Hughes, Mol. Phyl. Evol., **29**, 435-455, (2003).
92. Y. L. Qiu, J. Lee, B. A. Whitlock, F.B. Quadroni and O. Dombrowska, Mol. Biol. Evol., **18**(9), 1745-1753, (2001).
93. T. Ekim, M. Koyuncu, M. Vural, H. Duman, Z. Aytaç ve N. Adıgüzel, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ankara, 2000.
94. V.H. Heywood, Flowering plants of the world, Oxford University Press, New York, 1993.