

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE YAYILIŞ
GÖSTEREN *CENTAUREA L.* TÜRLERİ
ARASINDAKİ FARKLILIĞIN RAPD VE FAMES İLE
ANALİZİ**

SERAP BİNNETOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Güleray AĞAR
2008
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN
CENTAUREA L. TÜRLERİ ARASINDAKİ FARKLILIĞIN
RAPD ve FAMEs ile ANALİZİ**

SERAP BİNNETOĞLU

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2008

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Güleray AĞAR danışmanlığında, Serap BİNNETOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma,/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: *İmza* :

Üye : *İmza* :

Üye : *İmza* :

Üye : *İmza* :

Üye : *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(imza)

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN *CENTAUREA* L.
TÜRLERİ ARASINDAKİ FARKLILIĞIN RAPD ve FAMEs ile ANALİZİ

Serap BİNNETOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Güleray AĞAR

Bu çalışmada, Doğu Anadolu Bölgesinde yayılış gösteren *Centaurea* L. cinsine ait 16 farklı tür arasındaki genetik farklılık, FAMEs ve RAPD teknikleri ile araştırılmıştır. RAPD-PCR çalışması için toplam 30 primer denenmiş ve bunlardan 8 primer polimorfik bantlar vermiştir. Kullanılan 30 primerden 13 tanesi güvenilir RAPD sonucu vermiş ve bu primerlerle çoğalan DNA bantlarının ebatları 50 bp ile 1000 bp arasında gerçekleşmiştir. Çalışılan türlerinin tümünden toplam 99 DNA bantı amplifiye olmuştur. Çoğalan bantların büyük çoğunluğunun polimorfik olduğu gözlenmiştir. RAPD sonuçları ile oluşturulan dendrogram analizi sonuçlarına göre *Centaurea* türleri 4 ana grupta kümelenemiştir.

Biyokimyasal değerlendirmelere bakıldığında ise *Centaurea* türlerinin 14 çeşit yağ asidi içerdiği ve bütün türlerde 16:0 yağ asidinin bulunduğu görülmüştür. FAMEs ve RAPD sonuçlarının her ikisinde de görülen *C. virgata*'nın diğer türlerden farklı bir genetik yapı göstermesidir. Sonuçta FAMEs ve RAPD sonuçlarının birbirini desteklediği ve *Centaurea* türlerinde bu moleküler tekniklerin başarıyla uygulanabileceği gözlenmiştir.

2008, 54 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Centaurea*, RAPD, FAMEs

ABSTRACT

Master Thesis

BİOCHEMİKAL AND MOLECULAR CHARACTERİZATION OF *CENTAUREA* L. SPECİES DETERMİNEĞ BY RAPD AND FAME ANALYİSİS

SERAP BİNNETOĞLU

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Güleray AĞAR

Random amplified polymorphic-DNA (RAPD) profiles and fatty acid (FAME) were used to examine phenotypic and genetic relationships between sixteen *Centaurea* species which were wildy growing in Eastern Anatolia region of Turkey. Thirteen decamer primers were used to find out polymorphism. According to RAPD results a total of 99 amplicons in size range 1000 bp to 50 bp were produced from thirteen different primers in sixteen *Centaurea* species. Genetically four distinct groups were determined among the species of *Centaurea*, which represent high genetic variation. On the other hand 14 different fatty acids in 16 *Centaurea* species were determined according to FAME results. Both FAME and RAPD results showed that *C. virgata* is genetically different from other species. The differences in the composition of fatty acids among *Centaurea* species suggested that fatty acid profiles could be used to differentiate among some of the *Centaurea* species. Results of this study show that RAPD and FAME analysis are in consistency.

2008, 54 Pages

Keywords: *Centaurea*, RAPD, FAMEs

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanmasında, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde büyük emeği geçen danışmanım Sayın Doç. Dr. Güleray AĞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Her türlü konuda teşvik ve yardımlarını gördüğüm moleküler biyoloji laboratuvarı ekibine teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince karşılaştığım güçlükleri aşmamda her zaman moral ve motivasyon sağlayan eşime, aileme, destek ve yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve Biyoloji Bölümünün bütün elemanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmamızı destekleyen Atatürk Üniversitesi BAP (2007-164) saymanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Serap BİNNETOĞLU

Ağustos 2008

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| SİMGELER DİZİNİ | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER | 8 |
| 2.1. Fenotipik (morfolojik) markırlar..... | 8 |
| 2.2. Biyokimyasal markırlar | 9 |
| 2.3.Moleküler markırlar | 12 |
| 2.3.1.Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markırlar | 13 |
| 2.3.1.a.RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) | 13 |
| 2.3.2.PCR Temeline Dayalı Moleküler Markırlar | 14 |
| 2.3.2.a.RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) | 14 |
| 2.3.2.b.AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) | 16 |
| 2.3.2.c.SSR (Simple Sequence Repeats)..... | 16 |
| 2.3.2.d.ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) | 17 |
| 2.3.2.e.SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) | 17 |
| 2.3.2.f.CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) | 18 |
| 2.3.2.g.SRAP | 18 |
| 2.4. RİBOZOM VE RİBOZOMAL DNA (rDNA). | 19 |
| 2.5 ITS: Internal Transcribed Spacer | 20 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM | 22 |
| 3.1. Materyal..... | 22 |
| 3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal..... | 22 |
| 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar | 23 |
| 3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar | 24 |
| 3.1.3.a. FAMEs profillerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.3.b. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler..... | 25 |
| 3.1.3.c. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler | 26 |
| 3.2. Yöntem | 27 |
| 3.2.1. Bitkilerin örneklenmesi | 27 |
| 3.2.2. Bitkilerin FAMES (Fatty Asit Metil Esterleri) profillerinin belirlenmesi | 27 |
| 3.2.2.a. Fatty asidi metil esterlerinin saflaştırılması | 27 |
| 3.2.2.b. Örneklerin fatty asit içeriklerinin analiz edilmesi | 28 |
| 3.2.2.c. Örneklerin FAMES profillerinin istatistiksel analizi | 28 |
| 3.2.3. DNA izolasyonu | 29 |
| 3.2.4. RAPDs | 30 |
| 3.2.4.a. RAPD primerleri | 30 |
| 3.2.4.b. PCR protokolü..... | 31 |
| 3.2.5. Agaroz jel elektroforezi | 31 |
| 3.2.6. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi..... | 32 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI | 33 |
| 4.1. FAMES profillerine göre elde edilen sonuçlar..... | 33 |
| 4.2. RAPDs Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar | 37 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 42 |
| 5. 1. Sonuç ve Öneriler..... | 45 |
| KAYNAKLAR..... | 46 |
| EKLER | 54 |
| EK 1 | 54 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-----------------|--|
| A | Adenin |
| AFLP | Amplified Fragment Length Polymorphism |
| AP-PCR | Arbitrarily Primed PCR |
| bç | Baz çifti |
| C | Sitozin |
| CAPS | Cleaved Amplified Polymorphic Sequence |
| CTAB | Setil Trimetil Amonyum Bromür |
| DAF | DNA Amplification Fingerprinting |
| dNTP | Deoksinükleotid Tri Fosfat |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik asit |
| EST | Expressed Sequence Tags |
| FAMEs | Fatty Asit Metil Esterleri |
| G | Guanin |
| ISSRs | Inter-Simple Sequence Repeats |
| M | Molar |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| ng | Nanogram |
| °C | Santigrat Derece |
| ³² P | Fosfor radyo izotopu |
| PCR | Polimerase Chain Reaction |
| PVP | Polivinilpirolidon |
| RAPD | Randomly Amplified Polymorphic DNA |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| SCAR | Sequence-Characterized Amplified Region |
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |

| | |
|------|---|
| SRAP | Sequence Related Amplified Polymorphism |
| SSR | Simple Sequence Repeats |
| T | Timin |
| TBE | Tris-Borat-EDTA tamponu |
| TE | Tris-EDTA tamponu |
| v/v | Hacim / Hacim |
| w/v | Ağırlık / Hacim |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 4. 1. <i>Centaurea</i> türleri arasındaki biyokimyasal bağlantı..... | 35 |
| Şekil 4. 2. OPK19 RAPD primerine karşı amplifikasyon ürünleri..... | 39 |
| Şekil 4. 3. <i>Centaurea</i> türleri arasındaki genotipik bağlantı..... | 40 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 3. 1. Bitkilerin toplandığı bölge ve yükseklik | 23 |
| Çizelge 3. 2. <i>Centaurea</i> türlerinde amplifikasyon vermeyen primerler..... | 30 |
| Çizelge 4.1. <i>Centaurea</i> türlerinin sahip oldukları fatty asit çeşitleri..... | 34 |
| Çizelge 4.2. <i>Centaurea</i> türleri arasındaki biyokimyasal benzerlik indeksi..... | 36 |
| Çizelge 4.3. <i>Centaurea</i> türlerinde 13 RAPD primerinin oluşturduğu amplifikasyon ürünlerinin baz büyüklükleri, sayısı ve polimorfizm oranı..... | 38 |
| Çizelge 4. 4. <i>Centaurea</i> türlerinin 13 RAPD primerine karşı verdiği bant sayısı..... | 39 |
| Çizelge 4. 5. <i>Centaurea</i> türleri arasındaki genetik benzerlik indeksi..... | 41 |

1. GİRİŞ

Türkiye gerek Avrupa gerekse komşu ülkeler arasında familya, cins ve tür sayısı bakımından en zengin ülkedir. Türkiye endemik bitkiler açısından da dünyanın dikkat çeken ülkelerinden birisidir. 9200 çiçekli bitki türünden yaklaşık 3.200 tanesi endemik olup, bu sayı bütün Avrupa ülkelerinin endemik türlerinin (2500) sayısından daha fazladır (Davis 1965, 1985; Ekim vd 2000).

Botanikçilerin yaptıkları ve yapmaya devam ettikleri floristik çalışmalara rağmen ülkemizde halen çalışılmamış bölgeler bulunmaktadır. Flora of Turkey'de de belirtildiği gibi bazı bitki gruplarındaki taksonomik problemlerin çözümü için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Davis 1975).

Compositae ya da Asteraceae familyası hem dünyada hemde yurdumuzda çok sayıda tür ile temsil edilmektedir. Ülkemizde bu familyanın 152 cinsi, 1239 türü, 133 alttürü, 75 varyetesi olup; endemizm oranı %40.7 (478 tür, 6 alttür ve 3 varyete)'dir (Davis 1965,1985; Güner *et al.* 2000 ve Yıldırım 1999).

Türkiye florasında en çok türe sahip *Astragalus* ve *Verbascum* cinslerinin ardından *Centaurea* cinsi tür sayısı bakımından üçüncü sırayı almaktadır.

Centaurea L. türlerinin sayısı yeni eklenenler ile birlikte tür düzeyinde 190'a ulaşmış olup bunlardan 148 tanesi Türkiye için endemiktir. Bu türlerin 96 sı ise yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Son eklenen türler ile birlikte endemizm oranı %77.8'e yükselmiştir. Endemizm oranının bu kadar yüksek olması bu cinsin gen merkezinin Türkiye olduğu görüşünü desteklemektedir.

Centaurea L. cinsine ait türler tek, iki veya çok yıllık otsu, dalları nadiren dikenli, çalimsı bazen herdem yeşil bitkilerdir. Nadiren tüysüz; genellikle keçemsi tüylü veya pürüzlüden tüyleri çok hücreli kaba tüylüye kadar değişir. Sıklıkla sapsız salgı

tüylüdürler. Yapraklar almaşık dizilmiş, bazen hepsi tabanda; morfolojileri çok değişken, fakat (Türkiye’de) dikensiz (*C. odyssei*’deki spinulose hariç); genellikle lopları ayanın yarısının ortasına veya yarısının 2/3’ sine kadar derin olup, bazen gövdeden aşağıya doğru sarkıktır. Çiçekler pembe, mor, mavi, sarı veya beyazımsıdır. Kenardaki çiçekler eşeysiz/nötr, 5-8 veya daha fazla segmentli huni şeklinde veya hemen hemen iplik şeklinde ve oldukça belirsiz 4-5 şeritsi segmentli, merkezdekiler erdişidir.

Tıbbi bitkilerden biri olarak da anılan *Centaurea*, peygamber çiçeği, zerdali diken, çoban kaldıran, timur diken gibi Türkçe isimlerle bilinmektedir (Wagenitz 1975; Baytop 1999).

Batı ve Güneybatı Anadolu’da yaygın olan *C. cyanus* türünün kurutulmuş çiçekleri halk arasında %5’lik infüzyonları halinde ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Doğu Anadolu’da yetişen *C. behen* ak behmen ve zerdali diken olarak bilinmekte ve çiçekleri midevi olarak kullanılmaktadır. Kuzeybatı Anadolu’da yetişen ve çoban kaldıran, timur diken olarak bilinen *C. calcitrapa*’nın %2-6’lik infüzyonları ateş düşürücü olarak, çayır peygamberi ismiyle bilinen ve Kuzeydoğu Anadolu’da yaygın olarak yetişen *C. jacea* ateş düşürücü, kabız yapıcı ve iştah açıcı olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Baytop 1999). Eğirdir (Isparta) yöresinde geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin saptanmasına yönelik yapılan bir araştırmada, *C. iberica*’nın mide ağrılarına, böcek ve yılan sokmalarına karşı kullanıldığı saptanmıştır (Erol 1997). *Centaurea* türleri halk arasında tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, sitotoksik, antibakteriyel amaçlarla kullanılmaktadır (Barrero *et al.* 1997; Orallo *et al.* 1998).

Çin geleneksel tıbbında *C. uniflora* ateş düşürücü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitkinin zehirlenmelere karşı kullanıldığı ve antiaterosklerotik etkisinde olduğu bildirilmektedir (Wei *et al.* 1997). *C. chilensis* bitkisinin sulu ekstresi halk arasında antipiretik ve antiromatizmal olarak kullanılmaktadır (Negrete *et al.* 1998; Sepulveda *et*

al. 1994). İspanya'da *C. aspera*, *C. seridis* var. *maritima*, *C. melitensis* gibi pek çok *Centaurea* türü infüzyon halinde halk arasında hipoglisemiyen olarak kullanılmaktadır (Chucla et al. 1988).

Yukarıda tıbbi özelliklerinden bahsedilen *Centaurea* cinsi taksonomik bakımdan detaylı olarak çalışılması gereken oldukça karmaşık bir cinstir. Bu cins içerisindeki bazı seksiyonlar açık bir biçimde cinsden ayrılmış olup, farklı bir cins olarak değerlendirilebilecek durumdadırlar. Flora of Turkey adlı eser incelendiğinde bu cinse ait türlerin çeşitli morfolojik karakterlerinin birbirine yakın özellikler gösterdiği ve bu yüzden tayin anahtarında bazı problemler bulunduğu eserin yazarı tarafından da belirtilmiştir (Davis 1975). Bu cinsin tekrar gözden geçirilmesi ve revizyonunun yapılması gerektiği de vurgulanmıştır. Gerek bu türlerin teşhisinde kullanılan dış morfolojik özelliklerin gerekse onların içerdiği antimikrobiyal ve toksik maddelerin türlerin yetiştiği bölgenin ekolojik özelliklerine, vejetasyon süresine bağlı olarak değiştiği de bilinmektedir.

Centaurea cinsindeki taksonomik problemlerden birisi de cinse ait sınırların tam olarak belirlenememiş olmasıdır. Özellikle bu cinsten ayrı bir cins olarak ayrılması düşünülen seksiyonların varlığı morfolojik olarak kesin sınırların belirlenmesini zorlaştırmaktadır (Dittrick 1977).

Susanna ve Garcia Jacas (2001), *Centaureinae* altoymağında yapmış oldukları moleküler çalışmalarında *Centaurea* cinsinde yer alan *Psephellus* seksiyonunu ayrı bir cins olarak teklif etmişlerdir. Avrupada şu anda cins olarak değerlendirilen *Psephellus* Türkiye florasında hala *Centaurea* cinsine ait bir seksiyon olarak tasnif edilmiş durumdadır. Araştırmacılar aynı zamanda elde ettikleri moleküler verilere göre bu alt oymağın *Jacea*, *Cyanus*, *Acrocentron* ve *Carthamus* olmak üzere dört büyük gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Bu gruplar içerisinde birbirlerine en yakın olanları *Cyanus* ve *Jacea* gruplarıdır (Uysal 2006).

Bazı araştırmacılar taksonomik karmaşıklığın çözümlünde yararlanabilecek en iyi yol olarak morfolojik, karyolojik ve polen çeşitliliğini göstermektedirler (Bremer 1994; Susanna *et al.* 1995).

Porras vd (2000), Asteraceae familyası türlerinin çoğunda aken heteromorfizminin varlığından bahsetmişlerdir.

Polen heteromorfizmi bir bitkinin tüm çiçeklerindeki birkaç polenin deliklerinin sayısının farklı olması olarak tanımlanmaktadır (Nadot *et al.* 2000). Villodre ve Garcia-Jacas (2000), *Centaurea* cinsinin *Jaceae* grubu üzerinde elektron mikroskobu ile polen çalışması yapmışlardır. Araştırmacılara göre *Centaurea* cinsi içinde filogeniyi tespit etmek için en güvenilir özelliklerden birisi de polen tipidir.

Son yıllarda taksonomik karmaşıklıkları ortadan kaldırmak ve yeni çözümler ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen modern çalışmalardan birisi de bitkilerdeki temel yağların karakterizasyonu üzerine yapılan kimyasal çalışmalardır.

Yapılan çalışmalarda *Centaurea* türlerinin kimyasal yapılarında terpenik maddeler, flavonoid, lignan, uçucu yağ, alkaloid, antosiyanin, kumarin, tanen tipi fenolik bileşikler ve sabit yağlar bulunduğu görülmektedir (Kaj-A-Kamb *et al.* 1992).

Yüksek bitkilerdeki yağ (fatty) asidi içeriği ve kompozisyonu kemotaksonomik markır vazifesi görür (Shorland 1963; Harborne and Turner 1984; Hegnauer 1989; Spitzer *et al.* 1990; Aitzetmuller, 1993; Aitzetmuller and Tesevegsuren 1994; Bağcı vd 2003). Yağ asitlerinin içerdikleri karbon atomu sayısı, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısı ve yeri, tek zincirli ya da dallanmış zincir oluşturmaları, karbonların hidrojen atomları tarafından doyurulmuş olup olmamaları, ökaryotik hücrelerde genellikle çift karbon sayısı (C14-C24) , prokaryotik hücrelerde tek ve çift sayılı karbon (C9-C20) bulunuşu, yağ asitlerinin taksonomik markır olarak kullanılma sebepleridir.

Türkiye’ de yetişen *Centaurea* türlerinin flavonoidleri ile ilgili olarak; Öksüz ve Pütün (Öksüz vd 1986) *C. kotschy* var. *kotschy*, Flamini ve ark. (Flamini *et al.* 2002) *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa*, Öksüz ve ark. (Öksüz *et al.* 1984, 1988) çeşitli *Centaurea* türleri ve *C. cuneifolia*, Öksüz ve Ayyıldız (Öksüz vd 1985) bazı *Centaurea* türlerinin, Pütün ve Öğretir (Pütün *et al.* 1989) *C. thracica*, Pütün ve Özcan (Pütün *et al.* 1992) *C. urvillei* DC. subsp. *urvillei*, Pütün ve Pütün (Pütün *et al.* 1990) *C. pichleri* subsp. *pichleri*, Ulubelen ve Öksüz (Ulubelen *et al.* 1982) *C. urvillei* türleri ile çalışmalar yapmışlardır.

Bitki moleküler sistematigi alanında devam eden gelişmeler doğrultusunda tüm taksonomik düzeylerin spektrumunu ortaya çıkarmak ve çözümler bulmak amacıyla DNA dizi analizi çalışmaları yapılmaya başlanmıştır (Soltis vd 1991).

Baldwin (1992), *Asteraceae* familyasının sınıflandırılmasında ITS dizilerinin çok yararlı olduğunu ifade etmiştir. Daha sonraları bu familyaya ait cinslerin sınırlarının belirlenmesi ve filogenetik problemlerin çözülmesi için farklı oymaklara ait sekans çalışmaları yapılmıştır. Bu oymaklar; *Astereae* (Noyes & Rieseberg 1999), *Cardueae* (Susanna *et al.* 1995), *Gnaphalieae* (Breitwieser *et al.* 1999) *Inulae* (Eldenas *et al.* 1998) dir.

Moleküler biyoloji çalışanlar için en önemli verilerden birisi de DNA sekansı çalışmalarıdır. DNA sekansı bir DNA parçasındaki nükleotitlerin sırasını kesin bir biçimde belirleyebilmektedir. DNA dizi analizi metodu 1965 yılından itibaren kullanılmaktadır. 1970 lerde daha etkin ve doğrudan nükleotit dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Sanger ve Coulson (1977), zincir sonlanma metodunu ve Maxam ve Gilbert (1977), degradasyon metodunu geliştirmişlerdir. Her iki yöntem de birkaç kilobaytlık DNA dizilerinin minimum zamanda seçilebilmesini sağlamaktadır (Brown 1995).

Sınırlı sayıda olan doğal kaynaklarımızdaki genetik çeşitliliğin korunması ve gerektiğinde verimli bir şekilde kullanımları için bünyelerindeki genetik varyasyonun belirlenmesi gerekir. Bu varyasyonları tespit etme amacıyla sitolojik veriler, izoenzimler, tohum depo proteinleri gibi biyokimyasal işaretleyiciler ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) gibi moleküler işaretleyiciler başarıyla kullanılmaktadır (Stuber 1992).

DNA seviyesindeki varyasyonu belirleyebilen metotlar, özellikle yakından ilişkili genotipler arasındaki ayırım için oldukça etkili yöntemlerdir (Hartl and Seefelder 1998). Bu yöntemlerden biri RAPD olup birkaç cinsin yakından ilişkili genotipleri arasındaki genetik varyasyonu belirleme kapasitesi, sekans bilgisi gerektirmemesi ve kolaylığı sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır. *Malus* (Koller *et al.* 1993; Harada *et al.* 1993; Yae and Ko 1995), *Citrus* (Deng *et al.* 1995), *Pyrus* (Bellini and Stefania 1997), *Brassica* (Jain *et al.* 1994), *Solanum* (Hosaka and Hanneman 1994), *Petunia* (Cerny *et al.* 1996), *Pisum* (Hoey *et al.* 1996), *Prunus* (Gregor *et al.* 1994; Chaparro *et al.* 1994; Warburton and Bliss 1996; Ortiz *et al.* 1997, Hashmi *et al.* 1997; Heinkel *et al.* 2000), *Corylus* (Galderisi *et al.* 1999), *Vitis* (Wang *et al.* 1999), *Persea* (Kobayashi *et al.* 2000), *Morus ssp.* (Vijayan 2004) gibi birçok çalışmada RAPD markırlarından yararlanılmıştır. Yine, kültür identifikasyonu (Yang and Quiros 1993), nesil belirlenmesi (Elisiairo *et al.* 1999), genetik ilişkilerin değerlendirilmesi (Nicese *et al.* 1998) ve populasyonların genetik varyasyon tahminleri (Harrison *et al.* 1997) RAPD'nin kullanım alanlarındandır.

Endemiklik bakımından en zengin bölge olarak Doğu Anadolu Bölgesi 72 türle başta gelmektedir. Bunu İç Anadolu Bölgesi 67 türle ve Akdeniz Bölgesi 53 türle takip eder. *Centaurea* türlerinin bölgelere göre dağılımında da Doğu Anadolu Bölgesi 211 tür ile birinci sırayı almaktadır. Dolayısıyla *Centaurea* cinsi, Doğu Anadolu'da bu kadar çok yaygın olması sebebiyle çalışılabilecek türler arasındadır.

Çalışmamızın amacı, Ülkemizde önemli bir cins olan *Centaurea*'nın Doğu Anadolu'da yayılış gösteren farklı türlerine ait varyasyonu; moleküler markır olarak RAPD, biyokimyasal markır olarak FAMES tekniklerini kullanarak tayin etmek, RAPD ve FAMES verilerinin birbirleri ile uyumlu olup olmadığını irdelemek ve *Centaurea*'nın genetik ve biyokimyasal çalışmaları için uygun tekniği önermektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

Bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi açısından moleküler markırlardan genel olarak kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında, seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Bilgin ve Korkut 2005). Markırlar, fenotipik, biyokimyasal ve moleküler markırlar olarak 3'e ayrılırlar.

2. 1. Fenotipik (Morfolojik) Markırlar

Bitki sistematiğinde içinde, bir bitki ya da bir grubu diğerlerinden ayıran seçici özellik, o genotipi ayıran bir markır olarak değerlendirilir. Meyve kabuğu, kök ve yaprak yapıları, çiçek formülü ve çiçeklenme durumu, tohum yapısı, tek veya çok yıllık olması, iletim demetleri gibi morfolojik özellikler bu grup markırları oluşturur (Kaya 1999). Bu özellikler ve geliştiği habitat özellikleri de dikkate alınarak, isimlendirilmiş bir bitki ile benzerlik ve farklılıkların karşılaştırılması (Klasik taksonomi) yapılır. Bu tip markırlar, genetik olarak uzak akraba olarak kabul edilen bitki toplulukları arasında etkili olarak kullanılabilmesine karşın, yakın akraba olan bitki toplulukları için yeterli ve etkili bir markır değildir (Gülşen ve Mutlu 2005). Fenotipin en direkt değerlendirme şekli olması, kolay elde edilebilir olmaları, genellikle basit donanım gerektirmeleri gibi sebepler bu markırlar için avantaj olup tür seviyesinde uzmanlık ve tecrübe gerektirmesi, çevresel etkilere maruz kalmaları ve çeşitli gelişim aşamaları geçirmeleri (Staub and Sequen 1996) sebebiyle fenotipe dayalı olarak oluşturulan taksonomiler hatalı sınıflandırmalara neden olabilir. Sayılarının sınırlı sayıda olmasına rağmen yine de tarımsal karakterlere bağlı morfolojik markırlar ıslah çalışmalarında kullanım alanı bulmuştur (Gülşen ve Mutlu 2005).

2.2. Biyokimyasal Markırlar

Morfolojik karakterlerin sınırlı sayıda olması nedeniyle kimyasal analiz, sitoloji ve moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemeler sonucunda yeni sınıflandırma teknikleri geliştirilmiştir. Kemotaksonomi olarak adlandırılan bu sınıflandırma tekniğinde markır olarak tohum depo proteinleri, yapraklarda bulunan kimyasallar, sekonder metabolitler, izoenzimler kullanılır. Ancak en yaygın olarak kullanılanlar tohum depo proteinleri ve izoenzimler olup elektroforez tekniğiyle belirlenebilmektedirler. Orjini 1930'lara dayanan bu teknik (Tiselius, 1937) sistematik ve populasyon genetiği ile ilgilenen bilim adamları tarafından kalıtsal varyasyon çalışmaları için kullanılmakta (Gottlieb, 1997; Brown, 1979; Hamrick *et al.* 1979; Ellstrand, 1984; Crowford, 1985), bitki koleksiyonlarının genetik yapısını tanımlamadaki kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle oldukça geniş kullanım alanı bulmaktadır. Yöntemde protein ve enzimlerin moleküler ağırlıkları ve yüklerine göre katottan anoda göç edebilme ve kendilerine spesifik histokimyasal boyalarla belirlenebilme avantajlarından yararlanır. Temelde molekül ağırlığı, molekül konformasyonu, saflığı vb. tanımlama, ayrıca saflaştırma amacıyla kullanılan bu yöntem doğal veya rekombinant bir proteinin sentezlenip sentezlenmediği, sentezleniyorsa işlevsel olup olmadığı hakkında da bilgi verir.

Tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin analizinde, genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarında, genom ilişkilerinin belirlenmesinde, mahsüllerin geliştirilmesinde genetik markır olarak kullanılan tohum depo proteinlerindeki polimorfizm, DNA düzeyindeki baz değişiklikleri, kromozomlardan bir bölümünün kaybı veya yer değiştirmesinden kaynaklanır. Elektroforezle elde edilen tohum depo protein profilleri pek çok türün taksonomik ve evrimsel problemlerini çözmekte kullanılmaktadır. Çünkü elde edilen bant desenleri her tür için özel ve doğrudan doğruya genotipe bağlıdır (Ghafoor *et al.* 2000). Tohum depo proteinleri elektroforezinin geleneksel morfolojik yaklaşımlara göre avantajları, oldukça polimorfik ve tekrarlanabilir olmaları, gelişme mevsimlerinden bağımsız olması, hızlı analiz edilebilmesi, saklanmasıdaki kolaylıklar ve ihtiyaç duyulan örneğin az olmasıdır (Dinelli 1999).

Bazı türlerdeki düşük varyasyon, farklılığın doğru bir şekilde anlaşılması için yeterli olabilen izoenzimler tarafından açıklanır (Labdi *et al.* 1996). İzoenzimler bir veya daha fazla gen lokusu tarafından kodlanan, tek bir enzimin alternatif formlarıdır ve elektrik ortamında farklı hız ve yönlerde hareket ederler (Markert and Moller 1959). Kaba enzim ekstraktları jel ortamında ayrıldıktan sonra biyokimyasal (Hunter and Markert 1957) olarak tespit edilir. Bir tek enzim sisteminde tespit edilen bantların sayısı; **1**) enzimi oluşturan alt ünitelerin (subunit) sayısına, **2**) bitkinin çalışılan enzim sistemi için heterozigot veya homozigot olmasına, **3**) çalışılan enzimi kodlayan lokus sayısına bağlıdır (Gülşen ve Mutlu 2005). Birçok morfolojik karakterin aksine izoenzimlerin fenotipik ekspresyonu basit genetik kontrol altındadır ve kodominant kalıtılır. Bu nedenle heterozigotlar homozigotlardan belirgin bir şekilde ayrılabilir. Pleiotrofik, epistatik ve çevresel şartlardan etkilenmeleri minimal düzeydedir (Smith 1989).

İzoenzimler, elektroforetik olarak analiz edilebilmeleri, az miktarda reaktif gerektirmesi, kolay, hızlı, nispeten ekonomik olması nedeniyle sistematik ve genom haritalama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Fakat türler arası veya nispeten uzak bitkiler arasındaki varyasyonları çalışmada oldukça yararlı olmasına rağmen, yakın akrabalar arasındaki ilişkileri tespit için uygun değildir (Staub and Sequen 1996). Yine, bu tip markırların en önemli dezavantajı, çalışılacak lokus sayısının azlığıdır (Gepts, 1990). Bir diğer dezavantajı ise, enzimlerdeki translasyon sonrası görülen yapısal değişikliklerdir (Staub *et al.* 1982). Bu olayda, o enzimi kodlayan DNA'lar aynı olmasına rağmen, bir bilinmeyen lokus o enzimin yapısını değiştirecek ve bu yüzden de jelin analizinde yanlış yorumlamalara neden olabilecektir. Ayrıca test edilen izoenzimlerin bitkilerde bolca ve sürekli biçimde sentezlenmesi ve elektroforetik olarak ayırımlarında tekrarlanabilir sonuçlar almak için çalışma sırasında tüm detayları kaydetmek, ayırımı etkileyebilecek tüm şartları aynı tutmak ve böylece deneyleri çok iyi optimize etmek gerekmektedir.

Yine, yüksek bitkilerdeki fatty (yağ) asidi içeriği ve kompozisyonu kemotaksonomik markır vazifesi görür (Shorland 1963; Harborne and Turner 1984; Hegnauer 1989;

Spitzer *et al.* 1990; Aitzetmuller, 1993; Aitzetmuller and Tesevegsuren 1994; Bağcı vd 2003). Tohumların uzun zincirli fatty asit içeriğinin fazla oluşu, endüstriyel amaçlar için kullanımlarına dikkat çekmiştir (Baumann *et al.* 1988). Bünyelerindeki fatty asit içeriği bitkiler arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin tespitinde ilgilenilen bitki için karakteristik bilgi sunmaktadır (Goffman *et al.* 1999; Bağcı vd 2004). Yağ asitleri hidrokarbon yapısında olan makromoleküllerdir. Hücre sitoplazması ve diğer hücrel organellerin çift tabakalı membranlarında fosfolipit, glikolipit veya lipopolisakkarit formunda yapı molekülü olarak bulunurlar. Yapılarındaki farklılıklar dikkate alındığında yağ asitleri tek zincirli yağ asitleri ve dallanmış zincir oluşturan yağ asitleri olarak 2 ana grup altında incelenirler. Biyolojik sistemlerde tek zincirli yağ asitleri oldukça yaygındır. Yağ asitlerinin içerdikleri karbon atomu sayısı, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısı ve yeri, tek zincirli ya da dallanmış zincir oluşturmaları, karbonların hidrojen atomları tarafından doyurulmuş olup olmamaları, ökaryotik hücrelerde genellikle çift karbon sayısı (C14-C24) , prokaryotik hücrelerde tek ve çift sayılı karbon (C9-C20) bulunuşu, yağ asitlerinin taksonomik markır olarak kullanılma sebepleridir.

Genetik olarak aynı olan organizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve % olarak miktarları (yağ asitleri profilleri) aynıdır ve çevre şartları aynı olduğu sürece değişmez. Yani yağ asitleri profillerindeki farklılıklar organizmalar arasındaki kimyasal ve genetik akrabalığın bir göstergesidir (Paisley 1995).

Bitkilerde kimyasal içeriklerine göre sınıflandırma, 1950'li yıllardan itibaren çalışılsa da istenilen başarı elde edilememiştir. Bunun nedeni biyokimyasal markırların sınırlı sayıda oluşu ve çevresel şartlardan etkilenmeleri, bitkilerdeki makromoleküllerin türler için yeterince ayırt edici olmaması ve daha küçük moleküller olan sekonder metabolitlerin ise çevresel etkenlere göre değişiklik gösterebilmesidir (Grayer *et al.* 1999; Wink 2003).

2.3. Moleküler Markırlar

Genom üzerinde belli bir bölgeyi tanılamak için kullanılan genetik işaretlerdir, DNA'nın geniş bir kısmının veya tek bir spesifik nükleotidin simgesi olabilirler. Son yıllarda bitki araştırmacıları tarafından çok yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar, kaynağını kendilerinin üretildiği bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA'lardan aldığı için, bitki genetiğindeki çeşitlilik veya populasyon genetiğinde bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilir (Gülşen ve Mutlu 2005). Bu markırlar yardımıyla araştırmacılar morfolojik olarak çok benzerlik gösteren tür, çeşit veya tipler ve ebeveynleri hakkında kesin bilgiler elde edebilmektedirler (Karaca vd 2002). Moleküler markırlardan genel olarak seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Bilgin ve Korkut 2005).

Moleküler markırlar çeşitli avantajlara sahiptir; **1)** çevre faktörlerinden etkilenmezler, **2)** çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir, **3)** genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotroftir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi), **4)** herbir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orjini tespit edilebilir, **5)** sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir.

DNA markırlarında amaç, bireyler (çeşit, hat, tür vb.) arasındaki DNA seviyesinde farklılığın ortaya çıkarılmasıdır. Eğer bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa bu bir allel olarak adlandırılır. DNA seviyesinde bunu yapmanın başlıca avantajı, herhangi bir DNA zincirinin iki birey arasındaki allelik farklılığı gösterebilmesidir. Bunun için o DNA dizininin herhangi bir proteini kodlayıp kodlamadığını bilmeye gerek yoktur (Gülşen ve Mutlu 2005).

Genetik markırlardaki (varlık, yokluk veya sekans değişimiyle) varyasyonun genlerdeki varyasyonu temsil ettiği bilgisinden hareketle bu markırların genetik araştırmalarda kullanımı fikri doğmuştur. DNA seviyesindeki farklılıkları saptamak üzere geliştirilmiş

bütün yöntemlere genetik taksonomi adı verilmektedir. Bu amaçla geliştirilen iki farklı DNA markırı tekniği mevcuttur. Birincisi DNA hibridizasyonuna dayalı RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), diğeri ise PCR(Polymerase Chain Reaction) temeline dayalı RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR(Simple Sequence Repeats), ISSRs(Inter-Simple Sequence Repeats), SRAP(Sequence Related Amplified Polymorphism), SCAR(Sequence-Characterized Amplified Region), CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) teknikleridir. Yeni yaygınlaşmaya başlayan ve sağlık bilimlerindeki araştırmaların öncülük ettiği SNP(Single Nucleotide Polymorphism), DNA zincirindeki tek nükleotid farklılığını kullanmaktadır. Bu teknik bitki genomuna ait DNA sekans bilgisi gerektirdiğinden, bitki bilimine girmesi gecikmiştir. Fakat şu anda sürmekte olan EST(Expressed Sequence Tags) projeleri SNP markırlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir (Gülşen ve Mutlu 2005).

2.3.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markırlar

2.3.1.a. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP analizinde, organizmaya ait çeşitli dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişini tanıyan DNA kesim enzimlerince kesilmesine ve kesilen DNA parçaları çeşitli yöntemlerle işaretlenmiş prob DNA molekülleri yardımıyla görüntülenmesi esasına dayanır. İzole edilen DNA molekülünün kesimi 4 veya 6 nükleotidi tanıyan enzimlerce yapılmaktadır. Kesilen DNA parçaları bir jel (agaroz jel veya %6'lık poliakrilamid jel) içerisinde elektroforeze tabi tutulurlar. Kesilen parçalar elektroforez sonucunda jel içerisinde büyüklüklerine göre sıralanırlar. Bu sıralama sonrası DNA jel ortamından daha kullanışlı olan naylon filtrelere tek iplikçik halinde Southern transfer metoduyla aktarılır. Filtrelere DNA'yı jel üzerindeki dizilişiyle taşıyan ve çoğunlukla radyoaktif ³²P veya radyoaktif olmayan chemiluminescent sistemi ile etiketlenmiş tek iplik halindeki DNA uygulanır. Kesilmiş ve jel elektroforez yapıldıktan sonra filtreye aktarılmış DNA'ların, işaretlenmiş olan bu DNA'lar ile hibridize olmaları sağlanır. Filtredeki fazlalıklar çeşitli tamponlar ile yıkama yapılarak

uzaklaştırılır ve otoradyografi yapılarak oluşan polimorfizmler değerlendirilir (Yıldırım ve Kandemir 2001).

2.3.2. PCR Temeline Dayalı Moleküler Markerler

PCR, genetik materyaller üzerinde seçilmiş bir veya birden fazla bölgenin in vitro koşullar altında oligonükleotid primer ve Taq polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termocycle sistem yardımıyla çoğaltılma metodudur (Bej vd 1991). Özet olarak PCR çalışması için kullanılan genetik materyal kalıp(template) DNA olarak adlandırılır. Test edilecek organizmalardan saf olarak izole edilmiş kalıp DNA'dan az miktarda (2-50ng) alınır ve PCR için özel hazırlanan bir karışıma (master mix: steril deiyonize su, PCR tamponu, Taq polimeraz enzimi, MgCl, dNTPs ve primerler) ilave edilir. Hazırlanan bu karışım mikrosantrifüj tüpleri içerisinde otomatik DNA termocycler cihazına yerleştirilir ve kalıp DNA üzerindeki bazı spesifik bölgeler yaklaşık 30 PCR döngüsü sonucu en az milyon kez çoğaltılır. Kalıp DNA üzerindeki spesifik bir bölgenin termocycler cihazı yardımıyla tek bir defa sentezlenmesine bir PCR döngüsü denir. Her bir PCR döngüsü birbirini takip eden 3 farklı aşamadan oluşur; **1)** DNA zincirlerinin ayrıştırılması (DNA denaturation), **2)** Primerlerin bağlanması (DNA annealing), **3)** DNA sentezi (Primer extension). Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez ile yürütülerek birbirinden ayrıştırılır ve UV transuliminator ile görüntülenir. Spesifik PCR metodları ile test edilen organizmada kullanılan primer ile amplifikasyon olup olmadığı veya amplifikasyon bölgesinden elde edilen DNA bandının uzunluğu dikkate alınarak tanı yapılır. Hassas, ekonomik ve kısa süreli olup alternatif tekniklere ihtiyaç duymayan bir metottur.

2.3.2.a. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD' in temeli yaklaşık 10bp uzunluğunda ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanır (Williams *et al.* 1990). Bu primerler tasarlanırken primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha fazla olmasına dikkat edilir (Gregor *et al.* 1994). Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil bir primer

kullanılır, ancak bu primer her iki yöndeki DNA üretimi için de kullanılır. Dolayısıyla kullanılan primerler genomun birden fazla bölgesine yapışır ve genel olarak yöntem şu aşamaları içermektedir; Primerleri içeren PCR reaksiyonlarıyla hedef bölgeler kopyalanır, spesifik DNA zincirleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayırdıktan sonra Et-Br veya gümüş nitrat ile tespit edilir. Prosedür olarak aynı aşamaları kullanan fakat primer uzunluğu, amplifikasyon şartları ve DNA bantlarının belirlenmesi için kullanılan işlemlerle birbirinden ayrılan (Kumar, 1999) iki yöntem daha vardır ve bunlar DAF ve AP-PCR'dır (Owen and Uyeda 1991; Welsh and McClelland 1990). DAF, genellikle 8-merlik, çok kısa primerler kullanır. Amplifikasyon ürünleri, üre içeren polyester-poliakrilamid jelde yürütülür, ardından polimorfik ve monomorfik bantların sayısını iki veya üçe katlayan gümüş boyama ile belirlenir. AP-PCR ise genellikle 18-24bp uzunluğunda primerler kullanır ve amplifikasyon ürünleri Et-Br ile ilavesinden sonra agaroz jelde belirlenir (Bassam *et al.* 1991; Caetano-Anolles and Gresshoff 1994; Bassam and Bentley 1995).

Teknik, çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, daha az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kaliteli DNA ile çalışılabilmesi gibi bir takım avantajlara sahiptir (Yıldırım ve Kandemir 2001; Karaca vd 2002; Temizkan ve Arda 2004). Ayrıca polimorfizm oranı diğer tekniklerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir (Whitkus, 1994). Ancak RAPD markırlarının bazı dezavantajları vardır. Bunlardan biri, dominant özellikte markır vermesi, diğeri de RAPD markırlarının tekrarlanabilirliğinin, PCR ve DNA tespiti sırasında şartların tam olarak kontrol edilememesi nedeniyle düşük olmasıdır (dos Santos *et al.* 1994; Harris, 1999). RAPD verilerinin tekrarlanabilirliği için amplifikasyon reaksiyonlarının her bir basamağının dikkatli bir şekilde optimize edilmesi gerekir (Michelia and Bova 1997). Bu nedenle hassasiyet gerektiren durumlarda RAPD markırları daha güvenli olan SCAR markırlarına dönüştürülerek bu markırların güvenilirliği artırılabilir (Yu vd 2000).

2.3.2.b. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

RFLP ve RAPD kombinasyonu ile oluşturulmuş hibrit bir tekniktir. Restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmentlerinin adaptör DNA ile birleştirilmesinden sonra arka arkaya yapılan iki PCR reaksiyonu ve bu reaksiyonlarda seçici primer kullanılmasıyla yürütülür (Zabeau ve Vos 1993). Bu marker sisteminin temeli, PCR'la daha önceden iki enzimle kesilip uygun adaptörler bağlanmış DNA fragmentlerinden bir kısmının klonlanması ve tespitidir. Adaptörün ve onun bağlandığı restriksiyon dizini, DNA primerlerinin bağlanma yeri olarak görev yapar. Seçici baz primerin 3' ucuna eklenir. Her iki primer çiftinin sonundaki seçici bazlar değiştirilerek veya değişik kombinasyonlarda kullanarak her seferinde yeni fragmentler klonlanır ve bu yolla yeni polimorfizm elde edilir ki bu özellik yöntemin en büyük avantajını oluşturur (Gülşen ve Mutlu 2005). Son amplifikasyon ürünleri poliakrilamid jelde yürütülür ve farklı genotiplere ait, farklılık gösteren bantlar gümüş boyama ve radyoaktif işaretli primerlerle tespit edilir. Polimorfizm oranı oldukça yüksektir (Yıldırım ve Kandemir 2001). Az miktarda ve daha saf DNA gerektirir. Farklı primer kombinasyonları kullanılarak sınırsız sayıda marker geliştirilebilir. Bu amaçla, bitki moleküler biyolojisinde genetik haritalandırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.3.2.c. SSR (Simple Sequence Repeats)

Yüksek organizmalarda henüz görevleri bilinmeyen, ancak düzenleyici rollere sahip olduğu düşünülen, rastgele tekrarlanan DNA bölgeleri vardır (Rafalski ve Tingey, 1993). Bu tekrarların her ünitesindeki nükleotid sayısına göre mikrosatellit ve minisatellit olarak adlandırılırlar. Mikrosatellitler içerisinde en yaygını dinükleotid (örneğin ATATAT) tekrarlar olmakla birlikte, 1-6bp'lik tekrarlar da bulunabilmektedir. Mikrosatellitler, aynı zamanda STR(Short Tandem Repeats) veya SSR(Simple Sequence Repeats) olarak da anılır ve 11-60bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden(VNTR) farklıdır. Minisatellitler, genellikle kromozomların uç kısımlarında bulunmasına karşın, mikrosatellitler kromozomlar üzerinde daha bol ve gelişigüzel bir dağılım gösterir (Tautz, 1989). Bu nedenle, bu tür tekrarlara dayalı

bilgiler bütün genomu daha doğru temsil etmektedir. (AT)_n, (AAG)_n ve (AAT)_n gibi tekrarlar bitkilerde çok yaygındır (Akkaya vd 1992). Mikrosatellit ve minisatellitler lokusları PCR ile amplifiye edilir ve PCR ürünleri ise jeller üzerinde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra floresan, gümüş nitrat ve etidium bromid yöntemlerinden birisi ile tespit edilir. Marker sistemleri içinde en polimorfik olanıdır. Polimorfizm, kaynağını tekrar sayısından alır ve aynı sayıdaki tekrarları temsil eden her bant, farklı bir allele işaret eder. Tekrar sayısındaki farklılıkların kaynağını ise DNA replikasyonu sırasındaki kaymalar oluşturur (Schlotterer ve Tautz 1993). SSR markırları genetik haritalama, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

2.3.2.d. ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats)

Teknik, 5' ve 3' ucunda güçlendirilen, kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak PCR reaksiyonunda kullanılmasını, PCR ürünlerinin elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir (Zietkiewicz vd 1994). Primer olarak 2 ile 4 arasında değişen farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen, basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılır. Bir reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı kombinasyonları primer olarak aynı reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA zincirlerinin sayısı artırılır. Dolayısıyla da bir tek jel üzerinde üretilebilecek bant ya da markır sayısı artırılır. Bu, diğer DNA markırlarının üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar (Fang *et al.* 1997).

2.3.2.e. SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region)

RAPD ve ISSR gibi markır spesifitesi düşük olan markırların gücü, bu yöntemlerle elde edilen bantların jel üzerinden çıkarılarak, 3' uçlarındaki DNA zincirlerinin tespiti ve bunların daha uzun, dolayısıyla da daha spesifik primerler olarak PCR reaksiyonlarında kullanılması ile artırılır (Paran ve Michelmore, 1993). Tekrarlanabilirliği, RAPD ve ISSR markırlarına nazaran çok daha yüksektir. Genellikle dominant markırlar

oluşturmasına rağmen, tek tek bantların kısa nükleotid kesici restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle kodominant markırlara dönüştürülebilir.

2.3.2.f. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), (PCR-RFLP)

Bu teknik, PCR reaksiyonu ile güçlendirilen ürünlerin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektroforezle büyüklüklerine göre ayrılan bu kesilmiş fragmentlerin tespitini içerir (Konieczyn ve Ausubel 1993; Jarvis *et al.* 1994). Primerler cDNA veya genomik DNA klonlarından klonlanan ve DNA zincirleri tespit edilen RAPD veya ISSR bantlarından elde edilir.

Hem SCAR hem de CAPS primerleri geliştirebilmek için DNA zincir bilgisine gereksinim duyulduğundan ve RAPD ile AFLP gibi alternatif markır sistemleri bulunduğundan her iki yöntem de yaygın olarak kullanılmayıp daha çok RAPD, ISSR ve AFLP gibi spesifitesi düşük markırların spesifitesini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır.

2.3.2.g. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism)

Bu markırlar 17 veya 18bp uzunluğundaki ileri (forward) ve ters (reverse) primerlerin kullanılmasıyla elde edilir. İleri primerler 13 veya 14bp uzunluğundaki çekirdek dizini ve buna 5' ucunda eklenmiş CCGG dizini, ters primerlerde ise yine aynı uzunluktaki çekirdek dizini ve bu dizine eklenmiş AATT dizini içermektedir. Hem ileri hem de ters primerler 3' ucunda üç adet seçici nükleotid içermektedir. Bu primerler doğrudan gen bölgelerini hedef almaktadır. SRAP markırları, RAPD markırlarına göre daha yüksek oranda tutarlı sonuçlar ortaya koymaktadır ve AFLP markırlarına göre ise daha ucuz ve daha az işgücü gerektirmektedir (Li ve Quiros 2001).

2.4. Ribozom ve Ribozomal DNA (rDNA)

Ribozomlar, genetik bilginin ifadesindeki önemli rolünden dolayı ayrıntılı olarak incelenmiştir. Prokaryot hücrelerde yaklaşık 10.000 tane bulunur. Ökaryotik bir hücre de ise çok daha fazla sayıda ribozom bulunur. Elektron mikroskobu ile bakteri ribozom çapının 250µm olduğu, ve bir büyük bir de küçük olmak üzere iki alt birimden oluştuğu görülmüştür. 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 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.

Ökaryotik ribozomun büyük alt birimlerinde bir 28S rRNA molekülü, 5.8S ve 5S rRNA molekülü ve yaklaşık 50 farklı protein bulunur. Ökaryotik ribozomun küçük alt biriminde 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. Birçok hücrede rRNA kodlayan genin bir kopyasının bulunması yetersiz olabilir.

Moleküler hibridizasyon çalışmaları, rRNA bileşenlerini kodlayan genlerin kopya sayısının kaç tane olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemle, özgül RNA dizilerini kodlayan genom yüzdesi tayin edilir.

Ökaryotlarda, 28S ve 18S rRNA'larını kodlayan DNA dizisinin çok fazla kopya sayısı bulunmaktadır. *Drosophila*'da haploit genom başına 120 kopya bulunur ve ilk transkriptleri 34S RNA molekülüdür. Bu RNA'nın işlem görmesi sonucu, 28S, 18S ve 5.8S rRNA'lar meydana gelir(Klug and Cummings 2002). 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.

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 evrimleştiği için uzaktan ilişkili organizmaların filogeni çalışmalarında kullanılabilirler. Mitokondriyal rRNA genleri ise daha hızlı evrimleşmekte ve ordo veya familya düzeyinde kullanışlı olabilmektedir. 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 gerektirmesi ve yalnızca bir zincir dizisi hatalara yatkın olması gibi dezavantajları olmasına rağmen dizi bilgisi elde etmek için de kullanılmıştır.

2.5 ITS: Internal Transcribed Spacer

Bir öncü transkript üzerinde yer alan bu ara bölgeler, öncü ribozomal alt ünitelerinin arasında uzanmaktadır. Yapısal RNA öncü molekülün ribozomu işlediği zaman ortadan kalkmaktadır. Bu sekanslar ribozomal DNA (rDNA)'da bulunan dizilerdir.

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

Hem tür hem de alttür seviyesinde tanımlama yapabilmek için ITS bölgelerinin dizi analizinden yararlanılır, bu bölgelerin çeşitliliği rDNA'nın diğer bölgelerinden daha fazladır.

Ökaryotik organizmalar 2 tane ITS bölgesi içerirler. ITS1 18S-5.8S genleri arasında, ITS2 ise 5.8S-26S genleri arasında bulunur.

ITS veya herhangi bir lokus bilgisi bir filogenetik hipotezi desteklemeye yeterli olabilmekte fakat reddetmek için yeterli olmamaktadır. Fenotipik veya biyocoğrafik karakterlere dayalı filogenetik hipotezle, bir gene ait verilerle elde edilmiş soyağacının uyuşması, filogenetik türler arasında ayırım sağlayabilir. Aksine bir gene ait verilere dayalı filogenetik hipotez, biyocoğrafya veya fenotipik karakterlerle desteklenmediğinde tür tanımlamada yetersiz kalmaktadır (Grube and Kroken 2000).

Ökoryotlarda transkripsiyonla ilişkili olan ve IGS denilen gen arası dizilerde vardır. Ribozomal genlerin IGS bölgeleri transkripsiyon promoterün kopyalarını içerir. Bu kopya promotorlerin sayısı akraba türlerin gelişme zamanı ve gelişmişlik oranı ile ilişkilidir. İntergenik ara bölgelerinin uzunluğunu incelemek için Southern Blot Hybridization (SB) ve Polimerase Chain Reaction (PCR) yaygın olarak kullanılmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal

Bu çalışmada *Centaurea* cinsinin *C. spectabilis*, *C. aggregata*, *C. virgata* *C. sessilis*, *C. iberica*, *C. triumfettii*, *C. depressa*, *C. pulcherrima*, *C. glastifolia*, *C. carduiformis*, *C. pulchella* *C. pseudoscabiosa*, *C. salicifolia*, *C. rhizantha*, *C. aucheri*, *C. vanensis* türleri materyal olarak seçilmiştir. Türler doğal yayılış alanları olan Doğu Anadolu bölgesinden toplanmıştır.

Örneklerin toplandığı yerlere ait bilgiler Çizelge 3.1' de verilmiştir. Toplanan *Centaurea* cinsine ait türlerin teşhişlerinde, Flora of Turkey (Davis 1988) adlı eserden yararlanılmıştır.

Çizelge 3. 1. Bitkilerin toplandığı bölge ve yükseklik

| Bitki | Toplandığı bölge | Yükseklik |
|-------------------------|---------------------|-----------|
| <i>C.spectabilis</i> | Horasan, Erzurum | 2300 m |
| <i>C.aggregata</i> | İspir, Erzurum | 2050 m |
| <i>C.vigrata</i> | Doğubeyazıt, Ağrı | 2000 m |
| <i>C.sessilis</i> | Horasan, Erzurum | 2100 m |
| <i>C.iberica</i> | Ilıca, Erzurum | 1800 m |
| <i>C.triumfettii</i> | Hınıs, Erzurum | 2450 m |
| <i>C.depressa</i> | Ilıca, Erzurum | 1785 m |
| <i>C.pulcherrima</i> | Sarıkamış, Kars | 2350 m |
| <i>C.glastifolia</i> | Tortum, Erzurum | 1850 m |
| <i>C.carduiiformis</i> | Selim, Kars | 2000 m |
| <i>C.pulchella</i> | Çamurdere, Erzincan | 2700 m |
| <i>C.pseudoscabiosa</i> | İspir, Erzurum | 1900 m |
| <i>C.salicifolia</i> | Tortum, Erzurum | 1900 m |
| <i>C.rhizantha</i> | Karayazı, Erzurum | 2400 m |
| <i>C.aucheri</i> | Kağızman, Kars | 1950 m |
| <i>C.vanensis</i> | Aşkale, Erzurum | 2000 m |

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır:

Otoklav (Hırayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Mikro 22R, M10, SN 0001279-03-00)

Santrifüj (Eppendorf, GERMANY, 5414 D, SN 5425-40112)

Otomatik Termocycle Sistem (Eppendorf, GERMANY, SN 5331-01846)

Elektroforez Sistemi (Biogen, Apelex, FRANCE, SN 280800)

Jel Görüntüleme Sistemi (Uvitec, Biolab, EEC, SN M01-2467)

Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIDI, Inc., Newark, DE)

Hematoloji Çalkalayıcısı (GERMANY, GEL-3025, SN 10365703F)

Çalkalayıcı (Thermoshake, Gerhard, GERMANY, SN 4002319)
 Su Banyosu (Nüve, TÜRKİYE, ST-402, SN 02-0138)
 Otomatik Pipetler (Eppendorf, GERMANY)
 Spektrofotometre (Cecil, CE 5502)
 Magnetik Karıştırıcı (Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083)
 pH Metre (Hana, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202)
 Derin Dondurucu (Nuarie, U.S.A, -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)
 Hassas Terazi (Scaltec, GERMANY, SPB42, SN SPB42-9090823)
 Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)
 Saf Su Cihazı (Ateks, 7x35, Eu)
 Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE, MD 592)
 Kar makinesi (Angelontonia, ITALIA, SN 25183/00)

3.1.3. Kullanılan özelti ve Solüsyonlar

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıdaki gibidir:

3.1.3.a. FAMEs profillerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Çözelti 1: Hücre parçalayıcı (Saponification)

| | |
|-------|-------------|
| 45gr | NaOH |
| 150ml | Metil alkol |
| 150ml | Saf su |

Çözelti 2: Metilleştirme (Methylation)

| | |
|-------|-------------|
| 325ml | HCl (6N) |
| 275ml | Metil alkol |

Çözelti 3: Saflaştırma (Extraction)

| | |
|-------|--------|
| 200ml | Hekzan |
|-------|--------|

200ml MTBE (Methyl-tert-butyl ether)

Çözelti 4: Bazik yıkama (Base wash)

10.8gr NaOH

900ml Saf su

3.1.3.b. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

DNA ekstraksiyon tamponu:

100mM Tris-HCl (pH 8.0)

50mM EDTA (pH 8.0)

500mM NaCl

%2 SDS (w/v)

%2 β -mercaptoethanol (v/v)

%1 PVP (w/v)

CTAB/NaCl:

%10 CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)

0,7M NaCl

Fenol: Kloroform: İzoamil alkol:

25:24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

Kloroform: İzoamil alkol:

24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

TE tamponu:

10mM Tris-HCl (pH 8.0)

1mM EDTA (pH 8.0)

%70'lik Etil Alkol:

70 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.c. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler

Ethidium Bromür Çözeltisi: 500 ml 0.5x TBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Bovine Serum Albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bromfenol Blue Çözeltisi: 0.25g bromfenol blue, 0.25 g xylene cyanol FF ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir

0,5x TBE tamponu: Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10x TBE olarak satın alınmış ve 0,5 birim 10x TBE tampon + 9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5x TBE tamponu hazırlanmıştır.

Primerlerin Hazırlanması: Kullanılan primerler yönetici firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin örnekleme

Araştırmada *Centaurea* cinsinin 16 farklı türü Doğu Anadolu bölgesinden toplanmış ve Özkan AKSAKAL tarafından teşhis edilmiştir.

Toplanan örnekler, FAMES ve RAPDs için kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Daha sonra sıvı azot ile dondurulup havanda öğütülmüştür. Örnekler 2ml'lik tüplere aktararak kullanılıncaya kadar yine -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Bitkilerin FAMES (Fatty Asit Metil Esterleri) profillerinin belirlenmesi

Bitkilerin FAMES profilleri MIS (Sherlock Microbial Identification System, version 4.5, MIDI, Newark, DE) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2.a. Fatty asidi metil esterlerinin saflaştırılması

FAMES profillerinin belirlenmesinde daha önce bahsedilen çözeltiler kullanılarak aşağıdaki protokol izlenmiştir (Şahin 1999).

a. İçinde yaklaşık olarak 40 mg öğütülmüş bitkisel doku bulunan her bir test tüpüne 1 ml Çözelti 1 ilave edilmiş ve 5-10 sn çalkalanarak 5 dk süreyle 100°C 'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

b. Test tüplerine 2 ml Çözelti 2 eklenerek 5-10 sn 'lik bir çalkalamadan sonra 80°C'de 10 dk süreyle su banyosunda bekletilmiş ve hemen takiben 2 dk süreyle buz veya soğuk su içerisinde soğutulmuştur. Bu uygulama ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile

metil eklenerek yağ asidi metil esterleri elde edilmiştir. Bu durum yağ asitlerine yüksek sıcaklıkta buharlaşma özelliği vermektedir.

c. Soğutulan tüplere 1.25 ml Çözelti 3 eklenerek 10 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısı ile çalkalanmıştır. Alt kısmında inorganik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmuştur. Pastör pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılmış ve yağ asitlerinin toplandığı organik faz muhafaza edilmiştir.

d. En son aşamada ise her tüpe 3 ml Çözelti 4 ilave edilerek 5 dk süreyle çalkalandıktan sonra 10 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözelti 4, bazik bir solüsyon olup serbest yağ asidi metil esterlerini daha saf olarak elde etmemize yardımcı olur. Tüp içerisinde yine iki ayrı faz oluşmuştur. Üst fazda toplanan ve yağ asidi metil esterlerini içeren faz, pastör pipeti ile alınarak 2 ml 'lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır.

3.2.2.b. Örneklerin fatty asit içeriklerinin analiz edilmesi

Tüpler, MIS cihazı üzerindeki örnek toplama tepsisine yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılarak sistem kılavuzunda belirtildiği gibi örnekler tek tek analiz edilmiş ve tanı sonuçları alınmıştır. Bu testler bütün örnekler için üç kez tekrar edilmiş ve en yüksek tanı sonucu değerlendirmeye alınmıştır (EK 1).

3.2.2.c. Örneklerin FAMES profillerinin istatistiksel analizi

FAMES analizi her bir bireydeki fatty asitlerin varlığı (%0,1-100) ve yokluğu (%0) şeklinde değerlendirilmiş, türler arası değerlendirmeler SPSS V.13 ile hesaplanmış ve UPGMA yöntemi ile dendogramları oluşturulmuştur.

3.2.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyon protokolü olarak Cheng Lin *et al.* (2001) esas alınmış ve birkaç maddesinde değişikliğe gidilmiştir.

- a. Önceden sıvı azotta parçalanıp 2ml'lik tüplere alınan bitki materyali üzerine 1000µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş, alt üst ederek karıştırılmış ve önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda 10-60 dk bekletilmiştir.
- b. 12000g ve 4°C'de 10 dk santrifüjlenerek üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- c. 1000µl Fenol:Kloroform:İzoamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst ederek karıştırılmıştır. 12000g ve 4°C'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- d. Üst faza 1/10 hacim CTAB/NaCl çözeltisinden eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmıştır.
- e. 1000µl Kloroform:İzoamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. 12000g ve 4°C'de 5 dk santrifüjlenerek üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- f. DNA'yı çöktürmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenerek -20°C'de 10 dk bekletilmiştir.
- g. 12000g ve 4°C'de 10 dk santrifüjlenerek üst faz atılmıştır.
- h. Pelet önce %100'lük sonra %70'lik soğuk etanol ile yıkanmıştır.
- i. Yıkanan pelet bir gece bekletilerek kurutulmuştur.
- i. Kurutulan DNA 100µl TE tamponunda çözülmüştür.
- j. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA 250 kat (3µl DNA+747µl TE tamponu) seyreltilerek spektrofotometrede 260nm ve 280nm dalga boylarında absorbans (A) değerleri okunmuştur. OD (okuma değeri) 260/280 değeri 1,1-1,8 arasında olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme

katsayısı) x OD₂₆₀ (260nm’de okuma değeri) formülünden faydalanılarak stoktaki DNA miktarı hesaplanmıştır. Stok DNA’dan 50ng/μl DNA içeren çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.4. RAPDs

3.2.4.a. RAPD primerleri

Çalışmada toplam 30 RAPD primeri (Operon Technologies Inc. , Alameda, CA, USA) kullanılmış, bunlardan 13 tanesi amplifikasyon vermiştir.

Çizelge 3. 2. *Centaurea* türlerinde amplifikasyon vermeyen primerler

| Primer adı | Baz Dizilimi 5’ →3’ |
|------------|---------------------|
| OPB12 | CAGGCCCTTC |
| OPB05 | TGCGCCCTTC |
| OPB07 | GGTGACGCAG |
| OPB04 | GGA CTGGAGT |
| OPB02 | TGATCCCTGG |
| Oligo8 | AGCGTGTCTG |
| Oligo7 | AGGGGTCTTG |
| Oligo9 | CCCAAGGTCC |
| Oligo5 | CCAGATGCAC |
| OPL15 | AAGAGAGGGG |
| OPD07 | TTGGCACGGG |
| OPA11 | CAATCGCCGT |
| OPC05 | GATGACCGCC |
| OPL15 | GACGGATCAG |
| Oligo6 | TGCCGAGCTG |
| OPK13 | GGTTGTACCC |
| OPK09 | CCCTACCGAC |

3.2.4.b. PCR protokolü

PCR işlemi için şu protokol izlenmiştir; 0,5 ml'lik tüpe 3µl 10x PCR tamponu, 1,8µl BSA (10mg/ml), 1,2µl dNTP (10mM), 1,2µl MgCl₂ (25mM), 3µl DNA (100ng/µl), 1,2µl primer (5µM), 0,4µl 5Unit/µl *Taq* DNA polimeraz (Promega Crop., Madison, Wis.) ve 17,4µl saf su ilave edilerek hacim 30µl'ye tamamlanmıştır.

Bu işlemlerin ardından örnekler PCR otomatik thermocycle aletine (Eppendorf Mastercycler Gradient Authorized Thermal Cycle) yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutulmuştur.

- 1) PCR aleti otomatik olarak 5 dk 94°C tutmuş,
- 2) 4 döngü olacak şekilde sırasıyla,
1 dk 30 sn 94°C
1 dk 30 sn 37°C
3 dk 72°C'de tutmuş,
- 3) 41 döngü olacak şekilde sırasıyla,
1 dk 94°C
1 dk 36°C
1 dk 42°C
3 dk 72°C'de tutmuş,
- 4) Son olarak 7 dk 72°C'de tutarak süreç tamamlanmıştır.
- 5) PCR aletinden çıkarılan örnekler 4°C'de saklanmıştır.

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırası aşağıdaki gibidir;

- a. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1.5 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5x Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- b. Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5x TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0,5µg/ml olacak miktarda Ethidium bromid eklenmiştir.
- c. Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- d. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (3µl bromfenol mavisini + 7µl PCR ürünü) yüklenmiştir.
- e. Elektrik akımı verilerek 70V–150 dk süre ile DNA'lar elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. İki saat sonunda elektrik akımı kesilmiştir.
- f. Elektroforez tankından çıkarılan jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.6. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi her bir bireyde her primer için bantların varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde ifade edilmiştir. Oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bantların varlığı primerlerin hibridize olduğu ve bu primerlerin ait olduğu operon bölgelerinin incelenen örneklerde bulunduğu anlamında değerlendirilmiştir. Türler arası değerlendirmeler SPSS V.13 ile hesaplanmış ve UPGMA yöntemi ile dendogramları oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

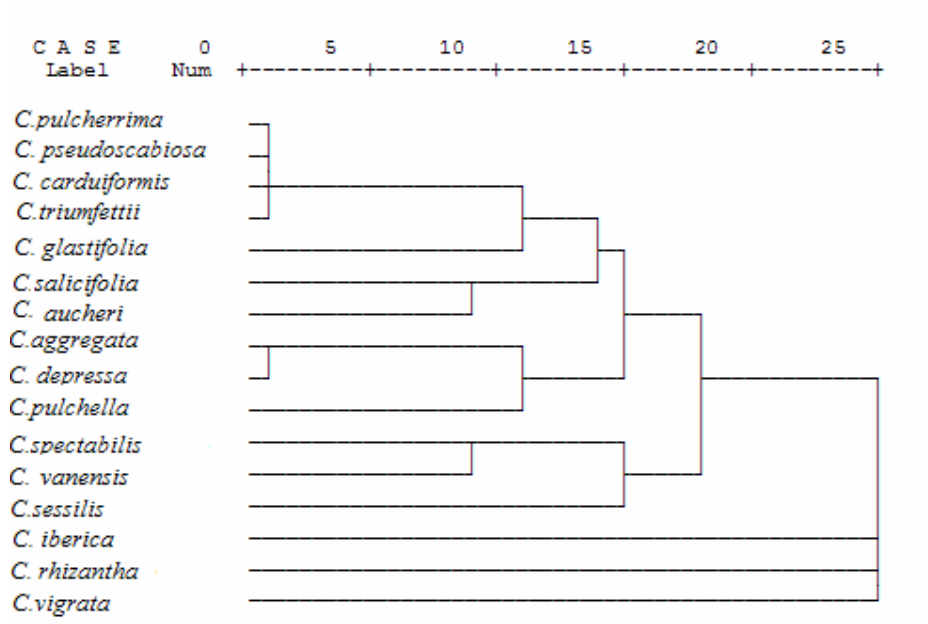
4.1. FAMES Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar

Centaurea türlerinin yüzde olarak yağ asit içeriği Çizelge 4. 1' de verilmiştir. Çizelgeye göre *Centaurea* türlerinin 14 çeşit yağ asidi içerdiği ve bütün türlerde doymuş yağ asitlerinden palmitik yağ asidinin var olduğu tesbit edilmiştir (C16:0). Montanik yağ asidi (28:0) yalnızca *C. sessilis* ve *C. virgata* türlerinde mevcuttur. 16:1 cis 7 DMA asidi çeşiti *C. virgata*, *C. rhizantha*, *C. vanensis* türleri hariç diğer türlerde mevcut değildir. 18:1:ω9c yağ asidine ise türlerin bir çoğunda rastlanmıştır (%14.49–%68.49). C21 primer alkol, 16:1 cis alkol w7, stearik yağ asiti (18:0), 19:2 w6c, lignoserik (24:0 2OH) yağ asidleri yalnızca *C.virgata* türünde görülmüştür ve 19:1:w11c yağ asidine yalnızca *C. İberica*'da rastlanılmıştır. 19:1:ω9t yağ asidi sadece *C.pulchella* ve *C.rhizantha* türlerinde mevcuttur. 18:1:ω5c yağ asidi ise *C.virgata* *C.salicifolia* *C.aucheri* türlerinde görülmüştür. C9Dikarboksilik asit türlerin birçoğunda mevcuttur (%5.31-%32.14). 18:1:ω9t alkol yağ asidine *C.spectabilis* *C.sessilis* *C.virgata*, *C.rhizantha*, *C. vanensis* türlerinde rastlanmıştır.

FAMES sonuçları ile oluşturulan dendrogram analizi sonuçlarına göre *Centaurea* türleri 5 ana grupta kümelenemiştir. 1. Grupta; *C. pulcherrima*, *C. pseudoscabiosa*, *C. carduiformis*, *C. triumfettii*, *C. glastifolia*, *C. salicifolia*, *C. aucheri*, *C. aggregata*, *C. pulchella*, *C. depressa*, 2. Grupta; *C. spectabilis*, *C. vanensis*, *C. sessilis*, 3. Grupta; *C.iberica*, 4. Grupta; *C. rhizantha* ve 5. Grupta; *C.virgata* yer almaktadır. *C. aucheri* türü ile *C. rhizantha* türünün en uzak türler (0.143) olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4. 2).

Çizelge 4. 1. *Centaurea* türlerinin sahip oldukları fatty asit çeşitleri

| Fatty acids | <i>C. spectabilis</i> | <i>C. aggregata</i> | <i>C. carduiiformis</i> | <i>C. sessilis</i> | <i>C. iberica</i> | <i>C. triumfettii</i> | <i>C. depressa</i> | <i>C. pulcherrima</i> | <i>C. glastifolia</i> | <i>C. vibrata</i> | <i>C. pulchella</i> | <i>C. pseudoscabiosa</i> | <i>C. salicifolia</i> | <i>C. rhizantha</i> | <i>C. aucheri</i> | <i>C. vanensis</i> |
|---------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| 16:0 | 49.08 | 31.51 | 51.85 | 53.90 | 61.38 | 58.64 | 66.37 | 56.37 | 67.86 | 33.31 | 64.89 | 43.36 | 63.25 | 65.82 | 52.41 | 41.62 |
| 28:0 | - | - | - | 3.24 | - | - | - | - | - | 2.71 | - | - | - | - | - | - |
| 16:1 cis 7 DMA | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5.36 | - | - | - | 7.29 | - | 8.03 |
| C9Dicarboxylic acid | - | - | 24.66 | 7.86 | - | 20.62 | - | 16.89 | 32.14 | 5.31 | - | 26.54 | - | - | 20.87 | - |
| C21 primary alcohol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2.17 | - | - | - | - | - | - |
| 18:1:ω9c | 39.37 | 68.49 | 23.49 | 26.87 | - | 20.74 | 32.83 | 26.74 | - | 14.49 | 19.69 | 30.10 | 22.16 | - | 17.56 | 39.24 |
| 18:1:ω9t alcohol | 11.54 | - | - | 8.13 | - | - | - | - | - | 7.71 | - | - | - | 9.85 | - | 11.12 |
| 19:1:w11c | - | - | - | - | 38.62 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16:1 cis alcohol w7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2.58 | - | - | - | - | - | - |
| 18:1:ω5c | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10.82 | - | - | 14.59 | - | 9.16 | - |
| 18: 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 3.56 | - | - | - | - | - | - |
| 19:2 ω6c | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 9.44 | - | - | - | - | - | - |
| 24:0 2OH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2.53 | - | - | - | - | - | - |
| 19:1:ω9t | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 15.42 | - | - | 17.04 | - | - |



Şekil 4. 1. *Centaurea* türleri arasındaki biyokimyasal bağlantı

Çizelge 4. 2. *Centaurea* türleri arasındaki biyokimyasal benzerlik indeksi

| | <i>C.spectabilis</i> | <i>C. aggregata</i> | <i>C. carduiiformis</i> | <i>C. sessilis</i> | <i>C. iberica</i> | <i>C. triumfettii</i> | <i>C. depressa</i> | <i>C. pulcherrima</i> | <i>C. glastifolia</i> | <i>C. vigrata</i> | <i>C. pulchella</i> | <i>C. pseudoscabiosa</i> | <i>C. salicifolia</i> | <i>C. rhizantha</i> | <i>C. aucheri</i> | <i>C. vanensis</i> |
|--------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| <i>C.spectabilis</i> | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. aggregata</i> | .667 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. carduiiformis</i> | .500 | .667 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. sessilis</i> | .600 | .400 | .600 | 1.000 | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. iberica</i> | .250 | .333 | .250 | .167 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| <i>C. triumfettii</i> | .500 | .667 | 1.000 | .600 | .250 | 1.000 | | | | | | | | | | |
| <i>C. depressa</i> | .667 | 1.000 | .667 | .400 | .333 | .667 | 1.000 | | | | | | | | | |
| <i>C. pulcherrima</i> | .500 | .667 | 1.000 | .600 | .250 | 1.000 | .667 | 1.000 | | | | | | | | |
| <i>C. glastifolia</i> | .250 | .333 | .667 | .400 | .333 | .667 | .333 | .667 | 1.000 | | | | | | | |
| <i>C. vigrata</i> | .250 | .167 | .250 | .417 | .077 | .250 | .167 | .250 | .167 | 1.000 | | | | | | |
| <i>C. pulchella</i> | .500 | .667 | .500 | .333 | .250 | .500 | .667 | .500 | .250 | .154 | 1.000 | | | | | |
| <i>C. pseudoscabiosa</i> | .500 | .667 | 1.000 | .600 | .250 | 1.000 | .667 | 1.000 | .667 | .250 | .500 | 1.000 | | | | |
| <i>C. salicifolia</i> | .500 | .667 | .500 | .333 | .250 | .500 | .667 | .500 | .250 | .250 | .500 | .500 | 1.000 | | | |
| <i>C. rhizantha</i> | .400 | .200 | .167 | .286 | .200 | .167 | .200 | .167 | .200 | .231 | .400 | .167 | .167 | 1.000 | | |
| <i>C. aucheri</i> | .400 | .500 | .750 | .500 | .200 | .750 | .500 | .750 | .500 | .333 | .400 | .750 | .750 | .143 | 1.000 | |
| <i>C. vanensis</i> | .750 | .500 | .400 | .500 | .200 | .400 | .500 | .400 | .200 | .333 | .400 | .400 | .400 | .600 | .333 | 1.000 |

4.2. RAPDs Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar

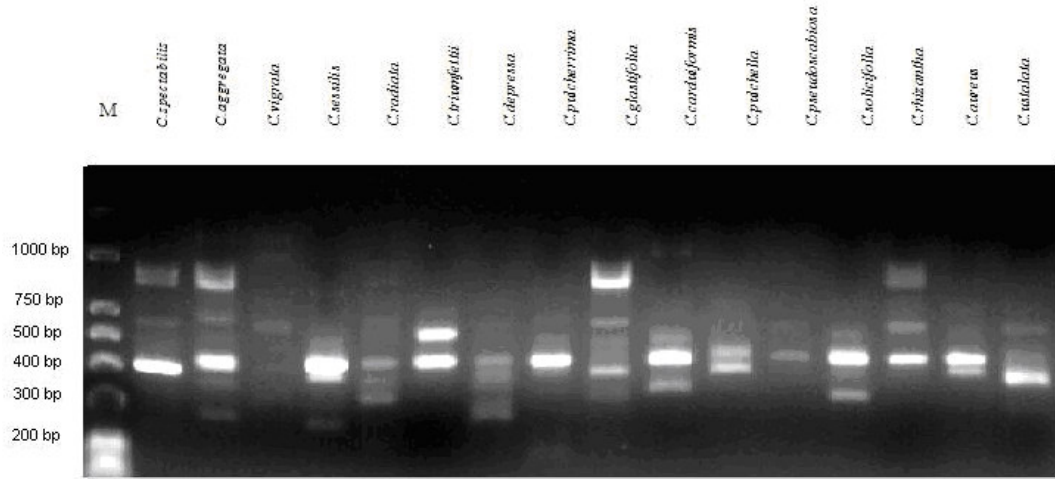
Çalışmalar için 30 primer arasından en iyi amplifikasyon yapan 13 primer seçilmiş ve değerlendirmeye alınmıştır. Büyüklüğü 50 bp ile 1000 bp arasında değişen toplam 99 polimorfik RAPD bandı elde edilmiştir. OPA01, OPB03, OPB08, OPB14, OPD03, OPD08, OPK04, OPK06, OPK09, OPK19, OPL14, Oligo4 primerleri sırasıyla 2, 7, 6, 7, 7, 5, 7, 9, 14, 11, 12, 4 ve 4 adet polimorfik bant üretirken, OPD03, OPD08, OPK04 ve OPK19 primerleri birer adet monomorfik bant üretmiştir. OPK06 en yüksek sayıda (14) bant oluştururken, OPA01 en az (2) bant veren primerdir. RAPD sonuçları ile oluşturulan dendrogram analizi sonuçlarına göre *Centaurea* türleri 4 ana grupta kümelendiği görülmüştür. *C. spectabilis*, *C. aggregata*, *C. glastifolia*, *C. rhizantha*, *C. sessilis* 1. grupta, *C. iberica*, *C. triumfettii*, *C. pulchella*, *C. depressa*, *C. pulcherrima*, *C. aucheri*, *C. carduiiformis*, *C. salicifolia*, *C. vanensis* 2. grupta, *C. pseudoscabiosa* 3. grupta ve *C. virgata* 4. grupta yer almıştır. *C. pseudoscabiosa*, *C. virgata* birbirine en yakın türler olduğu (0.960), *C. carduiiformis*, türü ile *C. salicifolia* türünün ise en uzak türler (0.012) olduğu gözlemlenmiştir. Türler arasındaki toplam polimorfizm oranı %95,95 dir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3. *Centaurea* türlerinde 13 RAPD primerinin oluşturduğu amplifikasyon ürünlerinin baz büyüklükleri, sayısı ve polimorfizm oranı

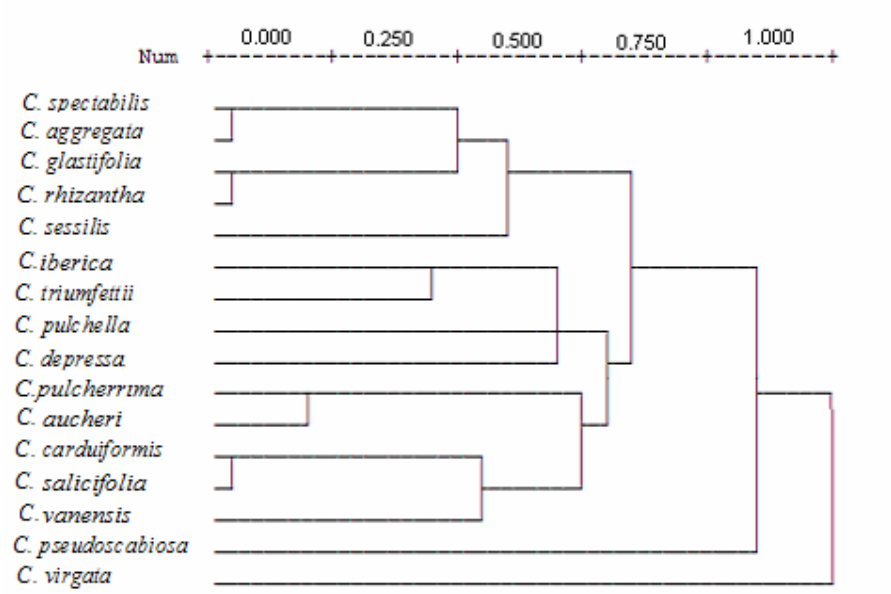
| Primer adı | Baz Dizilimi 5' → 3' | Max-min bç | Polimorfik bant sayısı | Monomorfik bant sayısı | Toplam bant sayısı | P(%) |
|------------|-------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|-------|
| OPA01 | CAGGCCCTTC | 100- 50 | 2 | 0 | 2 | 100 |
| OPB01 | GTTTCGCTCC | 750-100 | 7 | 0 | 7 | 100 |
| OPB03 | CATCCCCCTG | 450- 100 | 6 | 0 | 6 | 100 |
| OPB08 | GTCCACACGG | 450- 100 | 7 | 0 | 7 | 100 |
| OPB14 | TCCGCTCTGG | 450- 100 | 7 | 0 | 7 | 100 |
| OPD03 | GTCGCCGTCA | 500- 150 | 5 | 1 | 6 | 83.3 |
| OPD08 | GTGTGCCCCA | 1000- 150 | 7 | 1 | 8 | 87.5 |
| OPK04 | CCGCCCAAAC | 750- 100 | 9 | 1 | 10 | 90 |
| OPK06 | CACCTTTCCC | 800- 200 | 14 | 0 | 14 | 100 |
| OPK09 | CCCTACCGAC | 1000- 200 | 11 | 0 | 11 | 100 |
| OPK19 | CACAGGCGGA | 800- 100 | 12 | 1 | 13 | 92.3 |
| OPL14 | GTGACAGGCT | 650- 200 | 4 | 0 | 4 | 100 |
| Oligo4 | CTGAGACGGA | 350- 250 | 4 | 0 | 0 | 100 |
| Toplam | | 1000- 50 | 95 | 4 | 99 | 95.95 |

Çizelge 4. 4. 1: *C. spectabilis* 2: *C. aggregata* 3: *C. virgata* 4: *C. sessilis* 5: *C. iberica* 6: *C. triumfettii* 7: *C. depressa* 8: *C. pulcherrima* 9: *C. glastifolia* 10: *C. carduiformis* 11: *C. pulchella* 12: *C. pseudoscabiosa* 13: *C. salicifolia* 14: *C. rhizantha* 15: *C. aucheri* 16: *C. vanensis* türlerinin 13 RAPD primerine karşı verdiği bant sayısı

| Primer adı | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| OPA01 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| OPB01 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| OPB03 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| OPB08 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 0 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| OPB14 | 0 | 2 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 3 | 1 | 3 |
| OPD03 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| OPD08 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 | 4 | 3 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 2 | 5 | 1 |
| OPK04 | 1 | 3 | 2 | 0 | 3 | 2 | 4 | 2 | 1 | 3 | 5 | 1 | 5 | 1 | 4 | 5 |
| OPK06 | 1 | 3 | 2 | 0 | 3 | 2 | 4 | 2 | 1 | 3 | 5 | 1 | 5 | 1 | 4 | 5 |
| OPK09 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 2 | 3 | 0 | 4 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| OPK19 | 3 | 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 4 | 2 | 2 |
| OPL14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Oligo4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |



Şekil 4. 2. OPK19 RAPD primerine karşı amplifikasyon ürünleri



Şekil 4. 3. *Centaurea* türleri arasındaki genotipik bağlantı

Çizelge 4. 5. *Centaurea* türleri arasındaki genetik benzerlik indeksi

| | <i>C. spectabilis</i> | <i>C. aggregata</i> | <i>C. virgata</i> | <i>C. sessilis</i> | <i>C. iberica</i> | <i>C. triumfettii</i> | <i>C. depressa</i> | <i>C. pulcherrima</i> | <i>C. glastifolia</i> | <i>C. carduiiformis</i> | <i>C. pulchella</i> | <i>C. pseudoscabiosa</i> | <i>C. salicifolia</i> | <i>C. rhizantha</i> | <i>C. aucheri</i> | <i>C. vanensis</i> |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| <i>C. spectabilis</i> | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. aggregata</i> | .025 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. virgata</i> | .745 | .627 | 1.000 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. sessilis</i> | .513 | .228 | .873 | 1.000 | | | | | | | | | | | | |
| <i>C. iberica</i> | .576 | .522 | .825 | .563 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| <i>C. triumfettii</i> | .417 | .491 | .883 | .391 | .477 | 1.000 | | | | | | | | | | |
| <i>C. depressa</i> | .588 | .370 | .738 | .475 | .370 | .506 | 1.000 | | | | | | | | | |
| <i>C. pulcherrima</i> | .569 | .689 | .888 | .677 | .406 | .462 | .520 | 1.000 | | | | | | | | |
| <i>C. glastifolia</i> | .424 | .317 | .840 | .406 | .555 | .705 | .564 | .713 | 1.000 | | | | | | | |
| <i>C. carduiiformis</i> | .671 | .522 | .915 | .347 | .354 | .588 | .454 | .689 | .627 | 1.000 | | | | | | |
| <i>C. pulchella</i> | .627 | .720 | .903 | .378 | .378 | .421 | .484 | .440 | .667 | .470 | 1.000 | | | | | |
| <i>C. pseudoscabiosa</i> | .671 | .793 | .960 | .650 | .677 | .506 | .800 | .705 | .813 | .677 | .618 | 1.000 | | | | |
| <i>C. salicifolia</i> | .548 | .580 | .813 | .533 | .319 | .563 | .510 | .475 | .454 | .012 | .341 | .650 | 1.000 | | | |
| <i>C. rhizantha</i> | .246 | .259 | .793 | .354 | .360 | .274 | .378 | .533 | .019 | .456 | .491 | .745 | .424 | 1.000 | | |
| <i>C. aucheri</i> | .650 | .580 | .910 | .533 | .497 | .661 | .590 | .475 | .817 | .497 | .125 | .650 | .470 | .697 | 1.000 | |
| <i>C. vanensis</i> | .849 | .609 | .738 | .576 | .533 | .600 | .618 | .697 | .635 | .189 | .569 | .903 | .510 | .470 | .510 | 1.000 |

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada *Centaurea* cinsinin *C. spectabilis*, *C. aggregata*, *C. virgata*, *C. sessilis*, *C. iberica*, *C. triumfettii*, *C. depressa*, *C. pulcherrima*, *C. glastifolia*, *C. carduiiformis*, *C. pulchella*, *C. pseudoscabiosa*, *C. salicifolia*, *C. rhizantha*, *C. aucheri*, *C. vanensis* türleri arasındaki biyokimyasal ve genotipik varyasyonların boyutları hakkında bazı ipuçları elde edilmiştir.

Çalışmamızda 30 RAPD primeri kullanılmıştır. En iyi amplifikasyon yapan 13 primer seçilmiş ve değerlendirmeye alınmıştır. Büyüklüğü 50 bp ile 1000 bp arasında değişen toplam 99 polimorfik RAPD bandı elde edilmiştir. OPA01, OPB03, OPB08, OPB14, OPD03, OPD08, OPK04, OPK06, OPK09, OPK19, OPL14, Oligo4 primerleri sırasıyla 2, 7, 6, 7, 7, 5, 7, 9, 14, 11, 12, 4 ve 4 adet polimorfik bant üretirken, OPD03, OPD08, OPK04 ve OPK19 birer adet monomorfik bant üretmiştir. OPK06 en yüksek sayıda (14) bant oluştururken, OPA01 en az (2) bant veren primerdir.

RAPD sonuçları ile oluşturulan dendrogram analizi sonuçlarına göre *Centaurea* türleri 4 ana grupta kümelenemiştir. *C. pseudoscabiosa*, *C. virgata* birbirine en yakın türler olduğu (0.960), *C. carduiiformis*, türü ile *C. salicifolia* türünün ise en uzak türler (0.012) olduğu gözlenmiştir. Türler arasındaki toplam polimorfizm oranı ise %95,95 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Sonuçta bir Türkiye endemiği olan ve 4. grupta yer alan *C. virgata* türünün diğer türlerden farklı olduğu gözlenmiştir.

Flora of Turkey adlı eser incelendiğinde bu cinse ait türlerin çeşitli morfolojik karakterlerinin birbirine yakın özellikler gösterdiği ve bu yüzden tayin anahtarında bazı problemler bulunduğu eserin yazarı tarafından da belirtilmiştir (Davis, 1988). Bu cinsin tekrar gözden geçirilmesi ve revizyonunun yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Gerek bu türlerin teşhisinde kullanılan dış morfolojik özelliklerin gerekse onların içerdiği antimikrobiyal ve toksik maddelerin içeriği, esansiyel yağları türlerin yetiştiği bölgenin

ekolojik, özelliklerine vejetasyon süresine bağlı olarak değişmekte olduğu bilinmektedir.

Günümüzde moleküler düzeyde yapılan taksonomik çalışmalarla bu problemlerin çözümlenmesi amaçlanmaktadır. Özellikle RAPD markırları kolay olması ve çabuk sonuç vermesinden dolayı *Hordeum*, *Lolium*, *Triticum*, *Cicer*, *Leucaena*, *Ixora*, *Hypericum*, *Astragalus*, *Vicia* gibi bazı cinslerin türlerinin genetik ayırımında, bu türlerin alttürlerinin genetik ilişkilerinin belirlenmesinde sık bir biçimde kullanılmıştır (Adiguzel *et al.* 2006; Agar *et al.* 2006; Cao *et al.* 1997; Ahmad, 1999; Harris 1995; Rajaseger *et al.* 1997; Mehrnia *et al.* 2005). Ayrıca bazı bilim adamları RAPD'in tür içerisinde taksonomik seviyede genetik farklılığı ortaya koymada kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Marilla and Scoles 1996; Stammers *et al.* 1995).

Doğu Anadolu Bölgesinde yabani olarak yetişen *Centraurea* türlerinin kimyasal içerikleri ve moleküler tanıları hakkında hiç bir çalışma bulunmamaktadır.

Centraurea ile ilgili olarak daha önce yapılan bazı çalışmalarda external transcribed spacer (ETS) ve internal transcribed spacer (ITS) bölgelerinin compositae familyasına ait filogenetik çalışmalarda kullanılabileceği belirtilmekle birlikte (Suarez Santiago *et al.* 2006), diğer DNA markırlarına da ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır. Diğer taraftan bulgularımız türler arasındaki genetik akrabalığı ortaya koyması açısından önem arz etmektedir. *Centraurea* türleri arasındaki yakınlığı açıklamada morfolojik karakterlere ilave olarak RAPDs tekniğinin kullanılabileceği ifade edilmektedir (Rajaseger *et al.*1997).

Centaurea türlerinin yüzde olarak yağ asit içeriğine bakıldığında ise (Çizelge 4.1) türlerin 14 çeşit yağ asidi içerdiği ve bütün türlerde doymuş yağ asitlerinden palmitik yağ asidinin var olduğu görülmüştür (C16:0). Montanik yağ asidi (28:0) yalnızca *C. sessilis* ve *C. virgata* türlerinde mevcuttur. 16:1 sis 7 DMA asidi çeşiti *C. virgata*, *C. rhizantha*, *C. vanensis* türleri hariç diğer türlerde mevcut değildir. 18:1:ω9c yağ asidine ise türlerin bir çoğunda rastlanmıştır (%14.49–%68.49). C21 primer alkol, 16:1 sis alkol

w7, stearik yağ asiti (18:0), 19:2 w6c, lignoserik (24:0 2 OH) yağ asitleri yalnızca *C. virgata* türünde görülmüştür ve 19:1:w11c yağ asidine yalnızca *C. iberica* 'da rastlanılmıştır. 19:1:ω9t yağ asidi sadece *C. pulchella* ve *C. rhizantha* türlerinde mevcuttur. 18:1:ω5c yağ asidi ise *C. vibrata* *C. salicifolia* *C. aucheri* türlerinde görülmüştür. C9 Dikarboksilik asit türlerin birçoğunda mevcuttur (%5.31-%32.14). 18:1:ω9t alkol yağ asidine *C. spectabilis* *C. sessilis* *C. vibrata*, *C. rhizantha*, *C. vanensis* türlerinde rastlanmıştır.

FAMEs sonuçları ile oluşturulan dendrogram analizi sonuçlarına göre *Centaurea* türleri 5 ana grupta kümelenebilir. 1. Grupta; *C. pulcherrima*, *C. pseudoscabiosa*, *C. carduiiformis*, *C. triumfettii*, *C. glastifolia*, *C. salicifolia*, *C. aucheri*, *C. aggregata*, *C. pulchella*, *C. depressa* 2. Grupta; *C. spectabilis*, *C. vanensis*, *C. sessilis*, 3. Grupta; *C. iberica* 4. Grupta; *C. rhizantha* ve 5. Grupta; *C. virgata* yer almaktadır. *C. aucheri* türü ile *C. rhizantha* türünün en uzak türler (0.143) olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4. 2)

Çalışmamızda elde edilen bulgularda biyokimyasal ve genetik verilerin birbirine uygunluk gösterdiği gözlenmiştir. RAPD ve FAMEs sonuçlarının her ikisinde de gözlenen *C. virgata*'nın diğer türlerden genetik olarak farklı oluşudur. Fatty asit dendrogramında Türkiye endemiği olan *C. virgata*'nın ayrı bir grupta yer aldığı ve çalışılan türlerde bulunmayan yağ asitlerinden C21primer alkol, 16:1 sis alkol w7, stearik yağ asiti (18:0), 19:2 w6c, lignoserik (24:0 2OH) yağ asitlerinin yalnızca *C. virgata* türünde var olduğu bulunmuştur.

Çalışmamız sonucunda türler arasındaki genetik farklılığın ayırımında fatty asitlerinin de yardımcı olabileceği kaanatine varılmıştır. Bazı türlerde (*Astragalus*, *Vicia*, *Morus*, *Triticum*, *Cicer*, *Leucaena*, *Ixora*, *Hypericum*) yağ asidinin tür ve alt tür seviyesinde bitki sistematğinde kullanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Adiguzel *et al.* 2006; Agar *et al.* 2006; Cao *et al.* 1997; Ahmad 1999; Harris 1995; Rajaseger *et al.* 1997; Mehrnia *et al.* 2005). Kısacası çalışılan türlerde taksonomik sınıflandırmada fatty asit morfolojik karakterlere ilaveten kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda elde edilen genetik ve biyokimyasal benzerlik oranları ile oluşturulan dendrogramlar RAPD ve FAMEs tekniklerinin klasik sistematik anahtarlarına uygun olarak *Centaurea* türlerini ayırt etmede genom düzeyinde başarılı bir şekilde kullanılabilceğini işaret etmektedir.

5. 1. Sonuç ve Öneriler

RADPs, FAMEs tür seviyesinde filogenetik ilişkiyi açıklamada ideal olmamasına rağmen, mevcut çalışmada türün morfolojik, kromozom analizi tanımı gibi RADPs ve fatty asit bilgileri sunulmuştur. Gelecek basamakta türün seksiyon seviyesinde revizyonunun yapılması için yeni moleküler tekniklere ihtiyaç vardır (ITS, ETS, mDNA, cpDNA). Özellikle bu tekniklerden nrDNA (ITS ve ETS), mitokondrial DNA ve kloroplast DNA analizlerinin yapılmasının uygun olacağı kaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Agar, G., Adiguzel, A., Baris, O., Sengul, M., Gulluce, M., Sahin, F., Bayrak, O. F., 2006. RAPD and FAME analysis of *Vicia* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Annales Botanici Fennici* 43, 241-249.
- Adiguzel, A., Agar, G., Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Sengul, M., 2006. RAPD and FAME analysis of *Astragalus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Biochemic I Systematics and Ecology* 34, 424-432.
- Ahmad, F., 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals genetic relationships among the annual *Cicer* species. *Theor. Appl. Genet.* 98: 657-663.
- Aitzetmuller, K., 1993. Capillary GLC fatty acid fingerprints of seed lipids - a tool in plant chemotaxonomy. *J. High Resol. Chromatograph*, 16, 488-490.
- Bağcı, E., Bruehl L., Aitzetmuller K. and Altan Y., 2003. Fatty Acid and Tocochromanol Patterns of some Turkish Boraginaceae. *Nordic J. of Botany*, (in press).
- Bağcı, E., Bruehl L., Özçelik H., Aitzetmuller K., Vural M. and Şahin A., 2004. A study of the fatty acid tocochromanol patterns of some Fabaceae (Leguminosae) plants from Turkey I. *Grases Y. Aceites*.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 3-16.
- Barrero, A.F., Herrador, M.M, Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia Moreno, M., Gravalos, D.G., "Cytotoxic Activity of Flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*" , *Fitoterapia*, 68(3): 281-283 (1997).
- Bassam, B.J., Bentley S., 1995. Electrophoresis of polyester backed polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 19, 568-573.
- Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 316 (1999).
- Baumann, H., Bühler M., Fochem H., Hirsinger F., Zoe H. belein and Falbe J., 1988. *Angew. Chem.*, 100, 41.
- Bej, A.K., Mahbubani M.H., Atlas R.M., 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26, 301-334.
- Bellini, E., Stefania N., 1997. Il miglioramento genetico del pero nel mondo. *Riv. Frutticoltura* 3, 19-30.
- Bilgin, O. and Korkut K.Z., 2005. Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (3).
- Bremer, K.1994. *Compositae. Cladistics and classification*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Brown, A., 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* 15, 1-42.

- Cerny, T.A., Caetano-Anollesm G., Trigianom R.N., Starmanm T.W., 1996. Molecular phylogeny and DNA amplification fingerprinting of *Petunia* taxa. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 1009-1016.
- Chaparro, J.X., Werner D.J., O Malley D., Sederoff R.R., 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 194-200.
- Chucla, M.T., Lamela, M., Gato, A., Cadavid, I., "Centaurea corcubionensis: A Study of its Hypoglycemic Activity in Rats", *Planta Med.*, 107-109 (1988).
- Cao, W., G. Scoles, P. Hucl and R.N. Chibbar, 1999. The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theor. Appl. Genet.* 98: 602-607.
- Crawford, D., 1985. Electrophoretic data and plant speciation. *Syst. Bot.* 10, 405-416.
- Davis, P. H. (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 1-9, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh (1965-1985)
- Davis, P.H. 1975. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 5: 465-585, Edinburgh University Press.
- Davis, P. H., Mill, R. R., Tan, K. (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement)*, 10, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh (1988).
- Deng, Z.N., Gentile A., Nicolosi E., Domina, Vardi A. and Tribulato E., 1995. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants RAPD markers. *J. Hort. Sci.*, 70, 117-125.
- Dinelli, G., Lucchese C., 1999. Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of *Lolium* species and cultivars. *Electrophoresis*, 20, 2524-2532.
- Dittrich, M. 1977. Cynareae. systematic review. In: Heywood, V.H. , Harborne, J.B., Turner B.L., (eds) *The biology and chemistry of Compositae Vol. II*. London: Academic Press, 999.1015.
- Dos Santos, J.B., J. Nienhuis, P. Skroch, J. Tivang and M.K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 87: 909-915.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Egrelti ve Tohumlu Bitkiler)*, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları, Ankara (2000).
- Elisiario, P., Justo E. And Leitao J., 1999. Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. *Sci. Hort.* 81 (3), 287-299.
- Ellstrand, N., 1984. Multiple paternity within the fruits of the wild radishes, *Raphanus sativus*. *Am. Nat.* 123, 819-828.
- Erol, M.K., Tuzlacı, E., Eğirdir (Ispatra) Yöresinin Geleneksel Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkileri, "XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, Ed. Coşkun, M, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:75, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 466-475 (1997).
- Fang, D.Q., Roose M.L., Kruger R.R., Federici C.T., 1997. Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeats. *Theo. Appl. Genet.*, 95, 211-219.
- Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Bağcı, Y., Kargıoğlu, M., Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* from Turkey, *Phytochemistry*, 61, 433-437 (2002).

- Galderisi, U., Cipollaro M., Di Bernardo G., De Masi L., Galano G. And Cascino A., 1999. Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis. *Plant Cell Reports*, 18, 652-655.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Ilarslan, R. & Ilarslan, H. 1997. New chromosom counts in the subtribe Centaureinae (Compositae, Cardueae) from West Asia. *Bot. J. Lin. Soc.* 125: 343-349
- Garcia-Jacas, N., Susana, A., Garnatje, T. & Völattersan, R. 2001. A Generic delimitation and phylogeny of the subtribe Centaureinae (Compositae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Annals of Botany* 87: 503- 515
- Gepts, P., 1990. Genetic Diversity of Seed Storage Proteins in Plants. *Plant Population Genetics. Breeding and Genetics Resources* (Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L. and Weir B.S. , eds.), Sinauer, Sunderland, Massachusetts 64-68 p.
- Ghafoor, A., Ahmad Z., Qureshi A.S., Bashir M., 2000. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. Iberica* (L.) R. Wilezek based on morphological traits and SDS-PAGE. *Euphytica*, 123, 367-378.
- Goffman F.D., Thies W., Velasco L., 1999. Chemotaxonomic value of tocopherols in Brassicaceae. *Phytochemistry*, 50, 793-798.
- Gottlieb, L., 1997. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64, 161-180.
- Grayer, R.J., Chase, M.W., Simmonds, M.S.J., 1999. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochemical systematics and Ecology*, 27, 369-393.
- Gregor, D., Hartmann W. And Stosser R., 1994. Cultivar Identification in *Prunus domestica* using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Acta Horticulturae*, 359.
- Grube, M. and Kroken, S. 2000. Molecular Approaches and The concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycol. Res.*, 104 (11); 1284-1294.
- Gülşen, O. ve Mutlu, M. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markerlar ve kullanım alanları. *Alatarım*.4, 27-37.
- Güner, A., Özhatay., N., Ekim., T., Baser, K. H. C., *Flora of Turkey and the East egean Islands* (Supplement 2), 11, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh (2000).
- Hamrick, J., Linhart Y. and Mitton J.B., 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10, 173-200.
- Harada, T., Matsukawa K., Sato T., Ishikama R., Niizeki M., Saito K., 1993. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternty in *Malus*. *Euphytica*, 65, 87-91.
- Harborne, J.B. and Turner B.L., 1984. *Plant Chemosystematics*. Academic Press, 180-191 p, London.
- Harris, S.A., 1995. Systematic and randomly amplified polymorphic DNA in the genus *Leucaena* (Leguminosae, Mimosoideae). *Plant Syst. Evol.* 197: 197-208.
- Harris, S.A., 1999. RAPD in systematics – a useful methodology? In; Hollingsworth, P.M., Bateman R.M., Gornall R.J. (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, 211-228 p, London.

- Harrison, R.E., Luby J.J., Furnier G.R., Hancock J.F., 1997. Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rosaceae) from North America. *Am. J. Bot.* 84 (5), 612-620.
- Hartl, L. and Seefelder S., 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, 96, 112-116.
- Hashmi, G., Huettel R., Meyer R. and Krusberg L., 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. *Plant Cell Reports*, 16, 624-627.
- Hegnauer, R., 1989. *Chemotaxonomie der pflanzen*, Vol. 8, 611-612. Birkhuser, Basel.
- Heinkel, R., Hartmann W. and Stosser R., 2000. On the origin of the plum cultivars Cacaks Beauty, Cacaks Best, Cacaks Early and Cacaks Fruitful as investigated by the inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fragments. *Scientia Horticulturae*, 83, 149-155.
- Hoey, B.K., Crowe K.R., Jones V.M., Polans N.O., 1996. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters and allozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 92-100.
- Hosaka, K. and Hanneman R.E., 1994. Random Amplified Polymorphic DNA markers detected in a segregating hybrid population of *Solanum chacoense* x *S. phureja*. *Jpn J Genet.* , 69, 53-66.
- Hunter, R.L., Markert C.L., 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125, 1294-1295.
- Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky, J. J. and White T. J. 1989. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Pres, 315p, NY.
- Jain, A., Bhatia S., Banga S.S., Prakash S., 1994. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationships to heterosis. *Theor. Appl. Genet.*, 88, 116-122.
- Jarvis, P., Lister C., Szabo V., Dean C., 1994. Integrat on of CAPs Markers into the RFLP Map Generated Using Recombinant Inbred Lines of *Arabidopsis thalina*. *Plant Mol. Biol.*, 24, 685-687.
- Karaca, M., Saha S., Zipf A., Jenkins J.N. and Lang D.J., 2002. Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp.): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprintig. *Crop Science*, 42, 2118-2127.
- Kaj-A-Kamb, M. , Amorosi, M., Girre, L., *Chemistry and Biological Activity of the Genus Centaurea*, *Pharm. Acta. Helv.* , 67(7), 178-188 (1992)
- Kaya Y., 1999. *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. Erzurum. p. 580.
- Klug, W.S. and Cummings, R. M. 2002. *Genetik*. Öner, C. (eds.), Palme Yayıncılık, 381-383, Ankara.
- Kobayashi, M., Lin J.Z. , Davis J. , Francis L. and Clegg M.T., 2000. Quantitative analysis of avocado outcrossing and yield in California using RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 86, 135-149.
- Koller, B. , Lehmann A. , Mcdermott J.M., Gessler C. , 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* , 85, 901-904.
- Konieczyn, A., Ausubel F.M., 1993. A Procedure for Mapping *Arabidopsis* Mutations Using Co-dominant Ecotype-specific PCR-based Markers. *Plant J.*, 4, 403-410.
- Kumar, L.S., 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*, 17, 143-182.

- Labdi, M., Robertson L.D., Singh K.B. and Charrier A., 1996. Genetic diversity and phylogenetic relationships among annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphism. *Euphytica*, 88, 181-188.
- Li, G., Quiros C.F., 2001. Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) a New Marker System Based on a Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica. *Theo. Appl. Genet.*, 103, 455-461.
- Marilla E. F. and Scoles G. J. 1996. The use of RAPD markers in *Hordeum phylogeny*. *Genome* 39: 646- 654.
- Markert, C.L., Moller F., 1959. Multiple Forms of Enzymes; Tissues, Ontogenetic and Species Specific Patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 45, 753-763.
- Maxam, A. and Gilbert, W. 1977. A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of sciences, USA*, 74, 560. Brown, T.A. 1995. *Gene Cloning an introduction*, Third Edition, pp. 192.
- Michelia, M.R., Bova R., 1997. *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*. Springer, Berlin.
- Mehrnia, M., Zarre, S., and Sokhan-Sanj, A., 2005. Intra-and inter- specific relationships with in the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochem Syst Ecol.*, 33(2): 149-158.
- Nadot, S., Ballardjr, H.E., Creach, J. B. and Dajoz, I. 2000. The evolution of pollen heteromorphism in *Viola*: A phylogenetic approach *Plant Systematics and Evolution Abstract* 223 (3-4):155-171.
- Negrete, R., Backhouse, N., Avendano, S., San Martin, A., “Dehydrocostus Lactone and 8 β -hydroxydehydrocostus Lactone in *Centaurea chilensis* Hook and Arn.”, *Plant. Med. Phytother.*, 18(4): 226-232 (1984).
- Nicese, F.B., Hormaza J.L., Mc Granahan G.H., 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica*, 101, 199-206.
- Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriatre, E., Calleja, M., “Preliminary Study of the Potential Vasodilator Effects on Rat Aorta of Centaurein and Centaureidin, Two Flavonoids from *Centaurea corcubionensis*”, *Planta Med.*, 64(2): 116-119 (1998).
- Ortiz, A., Renaud R., Calzada I., Ritter R., 1997. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *J. Hortic. Sci.*, 72, 1-9.
- Owen, J.L., Uyeda, C.M., 1991. Single Primer Amplification of Avian Genomic DNA Detects Polymorphic Loci. *Ann. Biotechnol.*, 2, 107-122.
- Öksüz, S., Ayyıldız, H., Johansson, C., 6-Methoxylated and C-Glycosyl Flavonoids from *Centaurea* species, *J. Nat. Prod.*, 47(5), 902-903(1984).
- Öksüz, S., Ayyıldız, H., Bazı *Centaurea* Türlerinin Seskiterpenoid ve Flavonoidleri Üzerinde Kimyasal Arastirmalar, *Doga Bilim Dergisi*, 9(1), 58-66 (1985).
- Öksüz, S., Pütün, E., Flavonoides from *Centaurea kotschyi* var. *kotschyi*, *Doga Bilim Dergisi*, 11(2), 66-71 (1986).
- Öksüz, S., Halfon, B., Terem, B., Flavonoids of *Centaurea cuneifolia*, *Planta Med.*, 54(1), 89 (1988).
- Paisley, R., 1995. MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography. MIDI, Inc., Newark, DE, USA.
- Paran, L., Michelmore R.W., 1993. Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Theo. Appl. Genet.*, 85, 985-993.

- Porras, R. and Jesús, M.M. 2000. Achene heteromorphism in the cleistogamous species *Centaurea melitensis*, *Acta Oecologica*, 21(4-5) : 231-243.
- Pütün, A. E., Ögretir, C., C-and O-Glycosyl Flavonoids of *Centaurea thracica* (Janca) Hayek, *Doga Türk K.m Derg.*, 13(3), 293-298 (1989).
- Pütün, A. E., Pütün, E., Flavonoid Compounds of *Centaurea pichleri* subsp. *pichleri*, *Chimica Acta Turcica*, 18(2), 225-231 (1990).
- Pütün, A. E., Özcan, A., Flavonoids of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*, *Chimica Acta Turcica*, 19(2), 191-195 (1992).
- Rafalski, J.A., Tingey S.V., 1993. Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites and Machines. *Trends Genet.*, 9, 275-279.
- Rajaseger, G., Tan, H.T.W., Turner, I.M., and Kumar, P.P., 1997. Analysis of genetic diversity among *Ixora* cultivars (Rubiaceae) using Random Amplified Polymorphic DNA. *Annals Botany.*, 80(3): 355-361.
- Sanger, F. et al. 1977. DNA sequencing with chain. terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of sciences, USA*, 74, 5463-7.
- Schlotterer, C., Tautz D., 1993. Slippage synthesis of Simple Sequence DNA. *Nucleic Acid Research*, 20, 211-215.
- Sepulveda, S., Delhvi, S., Koch, B. , Zilliken, F., “Constituents of *Centaurea chilensis*” , *Fitoterapia*, 65(1): 88-89 (1994).
- Shorland, F.B., 1963. In: *Chemical Plant Taxonomy*. Ed: T. Swain. Academic Press. 253-311 p, New York.
- Smith, J.S.C., 1989. Gene markers and their uses in the conservation, evaluation and utilization of genetic resources of maize (*Zea mays* L.), 125-135 p. In: H.T. Stalker and C. Chapman(eds.). *Scientific management of germplasm: Characterization, evaluation and enhancement*. Dept. Crop Science, North Carolina State Univ. And Intl. Board for Plant Genet. Res. (IBPGR).
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Nickrent, D.L. ,Johnson, L.A., Hahn, W.J., Hoot, S.B., Eweere, J.A., Kuzoff, R.K., Kron, K.A., Chase, M.W., Swensen, S.M, Zimmer, E.A., Chaw, S.M, Gillespie, L.J., Kress, W.J., Sytsma, K.J. 1997. Angiosperm Phylogeny inferred from 18 S ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84:1-49.
- Spitzer, V., Marx F., Maia J.G.S. and Pfeilsticker K., 1990. *Fat. Sci. Technol.*, 92, 165.
- Stammers M. Harris J; Evans G.M; Hayward M.D. and Foster J.W. 1995. Use of random PCR(RAPD) technology to analyz phylogenetic relationships in the *Lolium Festuca* complex. *Heredity* 74: 19-27.
- Staub, J.E., Kuhns, J.J., May, B., Grun P., 1982. Stability of Potato Tuber Isozymes Under Different Storage Regimes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* , 107, 405-408.
- Staub, J.E., Sequen F.C., 1996. Genetic Markers, Map Construction and Their Application in Plant Breeding. *Hort. Scien.* 31 (5), 729-741.
- Stuber, W.C., 1992. Biochemical and molecular markers in plant breeding. *Plant Breeding News*, 9, 36-61.
- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, D.E., Soltis, P.S. 1995. Phylogenetic relationships in tribe Cardueae (Asteraceae) based on ITS sequences. *American Journal of Botany* 82: 1056±1068.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17, 463-471.

- Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler (2. baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, 345 s, İstanbul.
- Tiselius, A. , 1937.A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. Trans. Faraday Soc. 33, 524-531.
- Ulubelen, A, Öksüz, S., Cytotoxic Flavones from *Centaurea urvillei*, J. Nat. Prod. Soltis, D.E., Collöer, T.G.,Edgerton, M. L., 1991. The *Heuchera* group (Saxifragaceae): Evidence for chloroplast transfer and paraphyly.- Amer.J.Bot. 78: 1091-1112.
- Uysal, T. 2006. Türkiye *Centaurea* (asteraceae) cinsi *cheirolepis* (boiss.) o.hoffm. sekiyonunun morfolojik, karyolojik ve moleküler revizyonu doktora tezi.
- Villodre, J.M, Garcõa-Jacas, N., 2000. Pollen studies in subtribe *Centaureinae* (Compositae): the *Jacea* group analysed with electron microscopy., Bot. J.Lin. Soc.133 (4):473-484.
- Vijayan, K., 2004. Genetic relationships of Japanese and Indian mulberry (*Morus* spp.) genotypes revealed by DNA fingerprinting. Plant Syst. Evol. 243, 221-232.
- Yae, B. and Ko K., 1995. Classification of *Malus domestica* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. J. Korean Soc. Hortic. Sci. , 36, 824-828.
- Yang, X. and Quiros C. , 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theoret. Appl. Genet. , 96, 602-611.
- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001. Bitki Biyoteknolojisi (eds. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.). Bölüm 23, Genetik Markörler ve Analiz Metodları, 334-363. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s, Konya.
- Yıldırım, S., The chrologyof the Turkish species of Asteraceae family, Ot sistematik Botanik Dergisi, 6, Sayı 2, 75-123 (1999).
- Wang, Y., Chen J., Lu J. and Lamikanra O., 1999. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes. Scientia Horticulturae, 82, 85-94.
- Warburton, M.L., Bliss F.A., 1996. Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 121, 1012-1019.
- Welsh, J. and McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids. Res., 18, 7213-7218.
- White, T. J., Bruns, T. and Taylor, J. 1990. 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): 315-322. San Diego: Academic Press.
- Whitkus, R., Doebley J., Wendel J.F., 1994. DNA-based markers in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Wei, H.X., Gao, W.Y., Tian, Y.K., Guan, Y.K., Huang, M.H., Cheng, D.L.: New Eudesmane Sesquiterpene and Thiophene Derivatives from the Roots of *Rhaponticum uniflorum*, Pharmazie, 52(3): 245-247 (1997).
- Williams, j.G.K., Kubelik A.R., Livak R.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids. Res., 18, 6531-6535.
- Wink, M. 2003, Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry, 64, 3-19.

- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001. Bitki Biyoteknolojisi (eds. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.). Bölüm 23, Genetik Markörler ve Analiz Metodları, 334-363. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s, Konya.
- Yu, K., Park S.J., Poysa V., 2000. Marker-assisted Selection of Common Beans for Resistance to Common Bacterial Blight: Efficacy and Economics. Plant Breeding, 119, 411-415.
- Zabeau, M., Vos P., 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprints. European Patent Application. Publ. 0534858A1.

EKLER

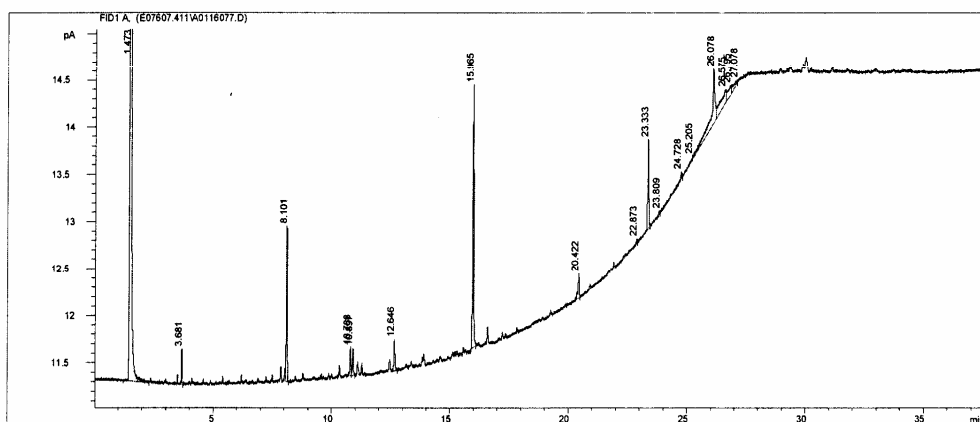
EK 1

Volume: DATA File: E076074.11A Seq Counter: 11 ID Number: 6077
 Type: Samp Bottle: 10 Method: EUKARY
 Created: 6/7/2007 4:49:48 PM
 Sample ID: Guleray Agar C11

| RT | Response | Ar/Ht | RFact | ECL | Peak Name | Percent | Comment1 | Comment2 |
|--------|----------|-------|-------|--------|----------------------|---------|---------------------|-------------------|
| 1.473 | 3.62E+8 | 0.023 | ---- | 7.090 | SOLVENT PEAK | ---- | < min rt | |
| 3.681 | 1351 | 0.028 | 1.069 | 12.208 | C9 Dicarboxylic acid | 11.11 | ECL deviates -0.005 | |
| 8.101 | 8064 | 0.038 | 0.966 | 15.997 | 16:0 | 59.89 | ECL deviates -0.003 | Reference -0.007 |
| 10.788 | 1507 | 0.037 | ---- | 17.697 | | ---- | | |
| 10.897 | 1867 | 0.049 | 0.946 | 17.765 | 18:1 w9c | 13.58 | ECL deviates -0.005 | |
| 12.646 | 2131 | 0.046 | 0.941 | 18.831 | Sum In Feature 10 | 15.42 | ECL deviates 0.003 | 19:1 w9t/19:1 w7c |
| 15.965 | 18019 | 0.049 | ---- | 20.847 | | ---- | | |
| 20.422 | 2065 | 0.056 | ---- | 23.683 | | ---- | | |
| 22.873 | 983 | 0.141 | 0.970 | 25.356 | 24:0 2OH | ---- | > max ar/ht | |
| 23.333 | 5689 | 0.048 | ---- | 25.685 | | ---- | | |
| 23.809 | 91 | 0.029 | ---- | 26.025 | | ---- | | |
| 24.728 | 1608 | 0.133 | ---- | 26.681 | | ---- | > max ar/ht | |
| 25.205 | 755 | 0.154 | ---- | 27.022 | | ---- | > max ar/ht | |
| 26.078 | 12339 | 0.131 | ---- | 27.645 | | ---- | > max ar/ht | |
| 26.575 | 5835 | 0.241 | 0.984 | 28.000 | 28:0 | ---- | > max ar/ht | |
| 26.795 | 2066 | 0.136 | ---- | 28.134 | | ---- | > max ar/ht | |
| 27.078 | 1602 | 0.408 | 0.984 | 28.306 | Cholesterol | ---- | > max ar/ht | |
| ---- | 2131 | ---- | ---- | ---- | Summed Feature 10 | 15.42 | 19:1 w7c/19:1 w9t | 19:1 w9t/19:1 w7c |

ECL Deviation: 0.005 Reference ECL Shift: 0.007 Number Reference Peaks: 1
 Total Response: 64369 Total Named: 13411
 Percent Named: 20.84% Total Amount: 21273
 Profile Comment: Percent named is less than 60.00.

*** Library match not attempted -- Analysis not good enough



ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Sivas'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'da tamamladı. 2001 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.