

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAZ DAĞI (ÇANAKKALE, TÜRKİYE) ENDEMİK
BİTKİLERİNDEN BAZILARININ DNA BARKODLAMASI**

Meltem TEZCAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: **29.06.2009**

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

MELTEM TEZCAN, tarafından DOÇ. DR. CÜNEYT AKI yönetiminde hazırlanan “KAZ DAĞI (ÇANAKKALE, TÜRKİYE) ENDEMİK BİTKİLERİNDEN BAZILARININ DNA BARKODLAMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Ahmet GÖNÜZ

Yönetici

.....
Prof. Dr. Günhan ERDEM

Jüri Üyesi

.....
Doç. Dr. Cüneyt AKI

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 29/06/2009

Prof. Dr. Neşet AYDIN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

TEŞEKKÜR

Yolumu açarak bana bu konuda çalışma fırsatı sağlayan, fikirleriyle beni aydınlatan ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam; Moleküler Biyoloji Anabilimdalı Başkanı Doç. Dr. Cüneyt AKI'ya saygımı ve teşekkürümü sunarım. Yüksek lisans projemin ilerlemesinde büyük ölçüde katkısı ve yardımı bulunan sayın Doktor Konstantinos E. VLACHONASIOS'a teşekkürü bir borç bilirim. Yardımlarını ve manevi desteklerini benden esirgemeyen değerli hocalarım, Arş. Gör. Nurşen ÇÖRDÜK, Arş. Gör. Sibel YILMAZ, Arş. Gör. ERSİN KARABACAK, Doğan İLHAN ve sevgili arkadaşlarım Canset AKDAŞ, Öznur Tanrıverdi, Yasemin DEMİRĞAN ve Anastasia STEFANAKI'ye teşekkür ederim.

Erasmus İkili Anlaşması kapsamında Yüksek lisans tez projemin desteklendiği Aristotle University of Thessaloniki School of Biology'ye ve bu üniversiteye ait Biyoloji laboratuvarında dostça iletişim ve yardımları için arkadaşlarım Alexia ANTZAKA, Athanasios KALDIS, Basiliki ZACHARAKI, Despoina TSEMENTZI ve Kostas Theodora POYLOS'a teşekkür ederim.

Her zaman manevi desteklerini yanımda hissettiğim, düzgün bir insan olmamda ilk temelleri atan babam Turgut TEZCAN ve annem Emine TEZCAN'a minnettarlığımı iletirim. Ayrıca gerek maddi, gerek manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, bana güvenen, fikirlerime saygı duyan, attığım her adım için önümü açan amcalarım Metin TEZCAN ve Mehmet TEZCAN'a ve ablası olmaktan gurur duyduğum kardeşim Turgay TEZCAN'a teşekkür ederim.

Meltem TEZCAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ark	Arkadaşları
bç	Baz çifti
Cl	Klor
cpDNA	Kloroplast DNA
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	Deoksiribo Nükleaz
dNTP	Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
E	Doğu
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
gr	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
IR _A	Inverted Repeat A
IR _B	Inverted Repeat B
kb	Kilobaz
L	Litre
LSC	Large Single Copy
M	Molar
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
matK	Maturase K
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
N	Kuzey
N	Normal
NaCl	Sodyum Klorür
NJ	Neighbor Joining
nr	Nükleer

°C	Derece Santigrat
örn	Örneğin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Pikomol
RNaz	Ribonükleik Asit
rpm	Rotation per Minute (Dakika/Devir)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Small Single Copy
SSR	Simple Sequence Repeat
TAE	Tris EDTA Asetat
Tris	Hidroksimetil Aminometan
UV	Ultraviyole

ÖZET

KAZ DAĞI (ÇANAKKALE, TÜRKİYE) ENDEMİK BİTKİLERİNDEN BAZILARININ DNA BARKODLAMASI

Meltem Tezcan

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt Akı

29.06.2009, 86

Bu çalışmada Kazdağı endemik bitkilerinden *Sideritis trojana* Bornm. (*Lamiaceae*) ve *Digitalis trojana* Ivan. (*Scrophulariaceae*) türlerinin DNA barkodlaması yapılmıştır. DNA barkodlaması çalışması için *matK* (Maturase) geni ve *trnH-psbA* genler arası bölge seçilmiştir. Genç yaprak dokularından DNA ayrıştırılması yapılmış, *matK* geni ve *trnH-psbA* genler arası bölgeye özgü primerlerle PCR çoğaltımı sağlanmıştır. İlgili bant Agaroz jel elektroforeziyle UV altında görüntülenmiştir. Bantı veren PCR ürünü için hizmet alımı yapılmıştır. Türlerle ait dizilerin eldesinden sonra gerekli programlar kullanılarak hem diziler yoluyla elde edilen sınıflandırma klasik taksonomi ile karşılaştırılmış, hem diziler baz alınarak Kazdağı endemik bitkilerinin diğer bitkiler ile ilişkisi araştırılmış hem de ilgili gen bölgelerinin öz barkod olabilme olasılıkları tartışılmıştır. Türlerin kendi familyalarına ait türlerle sıralamaları CLUSTALW2 ve T-COFFEE “Multiple Sequence Alignment” programları kullanılarak yapılmış, *S. trojana* ve *D. trojana* türleri ile sıralanacak türlerin dizileriyle BLAST programından seçilmiştir. Türlerle ait DNA barkod temelli ağacın eldesi için MEGA 4.1 programı kapsamında Neighbor Joining metodu ve Kimura-2-Parametresi kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda türlerle ait diziler kullanılarak elde edilen DNA barkod temelli ağaç sınıflandırılmaları ile türlerin klasik taksonomik sınıflandırılmasının uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Örnekler doğrultusunda *matK* lokusu, sıralama ve DNA barkod temelli ağaç elde etmedeki kolaylığı, genel olarak yeterli değişkenlik içermesi sebebiyle öz barkod bölgesi olarak kullanılabilir. Ancak tür tanımlamasının temel olduğu

Çalışmalarda *matK* geninin yeterli değişkenlik içeren başka genlerle kombinasyon halinde kullanılmasının daha iyi sonuç vereceği önerilebilir.

Anahtar sözcükler: *Sideritis trojana*, *Digitalis trojana*, *matK*, *trnH-psbA*, DNA barkodlaması

ABSTRACT

DNA BARCODING OF SOME ENDEMIC IDA MOUNTAIN (CANAKKALE, TURKEY) PLANTS

Meltem TEZCAN

Canakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Arts and Science

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Cüneyt AKI

29.06.2009, 86

In this research, DNA barcoding of *Sideritis trojana* Bornm. (*Lamiaceae*) and *Digitalis trojana* Ivan. (*Scrophulariaceae*) which are endemic plants of Ida Mountain were investigated. DNA barcoding process were realized in the *matK* (Maturase) gene and *trnH-psbA* intergenic spacer. DNA extracted from the young leaves of endemic plants, PCR amplifications were performed according to the *matK* (Maturase) gene and *trnH-psbA* intergenic spacer regions' primers. Concerned PCR zones were observed with agarose gel under UV. The PCR products were sent to MACROGEN company for sequencing. After the sequences were obtained from MACROGEN company, some bioinformatics programmes were used to compare the classical taxonomical classifications of species with the molecular classifications of the species gathered by DNA barcode based trees. Possibilities of being core barcode region of *matK* (Maturase) gene and *trnH-psbA* intergenic spacer were discussed and the relatives of Ida Mountain endemic plants were evaluated with the other plants taken from BLAST. Multiple Sequence Alignment of sequences were performed by using CLUSTALW2 and T-COFFEE programmes. And totally 43 plant sequences were taken from BLAST programme for aligning of these sequences with Ida Mountain endemic plants for DNA barcoding. Neighbor joining method and Kimura two-parameter was used from MEGA 4.1 for obtaining DNA barcode based trees.

According to the DNA barcode based tree classifications, molecular classification of species observed consistent with the classical taxonomic classifications of species. *matK* was more suitable for the plants used in this investigation because of the easiness of the

alignment and gathering the tree. It was generally enough to discriminate the species but combination of *matK* with more variable region can be suggested in the identification-based DNA barcoding investigations.

Keywords: *Sideritis trojana*, *Digitalis trojana*, *matK*, *trnH-psbA*, DNA barcoding.

İÇERİK

	Sayfa
TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
BÖLÜM 1- GİRİŞ.....	1
1.1. DNA Barkodlaması.....	1
1.1.1. DNA Barkodlama ve Taksonomi.....	8
1.1.2. DNA Barkodlama ve Moleküler Filogenetik.....	9
1.1.2.1. Moleküler Filogenetik Çalışması.....	9
1.1.2.2. Barkodlardan Filogeniye.....	9
1.1.3. DNA Barkodlaması ve Populasyon Genetiği.....	10
1.1.3.1. Populasyon Genetiği Çalışması.....	10
1.1.3.2. Barkodlardan Populasyon Analizlerine.....	11
1.1.4. Bitkilerde DNA Barkodlaması.....	11
1.1.4.1. Kloroplast Organeli.....	11
1.1.4.2. Kloroplast DNA'sının Genel Yapısı.....	12
1.1.4.3. Kloroplast DNA'sı ve DNA Barkodlaması.....	12
BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
BÖLÜM 3- MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Bitkisel Materyal.....	25
3.2. Metod.....	27
3.2.1. Genomik DNA Ayrıştırılması.....	27
3.2.2. DNA Çöktürülmesi.....	28
3.2.3. Elektroforez.....	29
3.2.4. PCR.....	30
3.2.4.1. PCR ile DNA Bölgelerinin Çoğaltılması İşlemi.....	30
3.2.5. PCR Ürünlerinin Elektroforezi.....	32
3.2.6. PCR Ürünlerinin Dizi Analizi.....	32
3.2.7. Biyoinformatik.....	32
3.2.7.1. BLAST.....	32

3.2.7.2. CLUSTALW2 ve T- COFFEE.....	33
3.2.7.3. MEGA 4.1 (BETA).....	35
BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Araştırma Bulguları ve Tartışma.....	38
4.1.1. <i>Sideritis trojana</i> ve <i>Digitalis trojana</i> Türlerinin DNA Özütleme ve DNA Çöktürülmesi Bulgularına İlişkin Elektroforez Görüntüleri.....	38
4.1.2. <i>Sideritis trojana</i> ve <i>Digitalis trojana</i> Türlerinin PCR Bulgularına İlişkin Elektroforez Sonuçları.....	38
4.1.3. <i>Sideritis trojana</i> (<i>matK</i> ve <i>trnH-psbA</i> Lokuslarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi).....	39
4.1.3.1. <i>matK</i> Lokusu.....	39
4.1.3.2. <i>trnH-psbA</i> Lokusu.....	42
4.1.4. <i>Digitalis trojana</i> (<i>matK</i> ve <i>trnH-psbA</i> Lokuslarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi).....	49
4.1.4.1. <i>matK</i> Lokusu.....	49
4.1.4.2. <i>trnH-psbA</i> Lokusu.....	51
4.2. Tartışma.....	53
BÖLÜM 5- SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR.....	59
Ekler.....	I
Çizelge Listesi.....	III
Şekil Listesi.....	IV
Özgeçmiş.....	VI

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. DNA Barkodlaması

Bir canlıyı veya canlı grubunu diğerinden ayırmak temelde onların fenotipik olarak ne kadar yakın olduklarına bağlıdır. Klasik sistematik ve taksonomi çalışmaları yolu ile canlıların sınıflandırılması ve birbirleri arasındaki ilişkilerin bulunması günümüze kadar oldukça geçerli bir yöntem olarak kullanılmıştır. Ancak özellikle son 25 yıldır moleküler biyoloji ve genetik alanındaki gelişmelerin giderek artması, buradan gelen bilgi birikimlerinin yeni oluşumların belirlenmesinde ve ayrılmasında kullanılması, bu yeni tekniklerin klasik tekniklerin yerini alması veya yardımcı birer alternatif olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur. Klasik tekniklerden çok daha güvenilir olan ve hızlı bir şekilde canlıların farklılıklarını ve filogenetik bağlantılarını ortaya koymaya yarayan bu tekniklerin temeli tüm canlıların taşımakta olduğu genetik birimlerin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu genetik birimler gen ve DNA olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzdeki dizilim teknolojilerinden faydalanarak canlıların sınıflandırılması ve bunun dışında özellikle endemik olan canlıların genetik kaynaklarının koruma altına alınması güncel bir konudur. Bir ülkenin doğal kaynaklarından en önemlisi ve günümüzde en çok üzerinde durulanı o ülkenin biyoçeşitliliği ve genetik kaynaklarıdır. Dizileme ve bilişim teknolojilerindeki avantajlarından dolayı, DNA dizileri evrimsel ve genetik akrabalıkları anlamamızda ilerlememiz için büyük bir öneme sahip yeni bir bilgi kaynağı olarak karşımızda durmaktadır.

Yaşamın çeşitliliği tür sayısı bakımından bakıldığında inanılmaz derecede şaşırtıcıdır. Taksonomi ile ilgilenenlerin şu anki tanımlanan ve yayınlanan klasik metodları kullanarak tahmin edilen 10-15 milyon türü tanımlamaları yıllarca sürebilir (Rubinoff ve ark., 2006).

DNA barkodları olarak adlandırılan kısa diziler, özellikle teşhise yönelik morfolojik özellikleri elde etmenin mümkün olmadığı durumlarda, bilinmeyen bir örneğin tür olarak tanımlanmasında rahatlıkla kullanılabilen eşsiz dizilerdir (Sass ve ark., 2007).

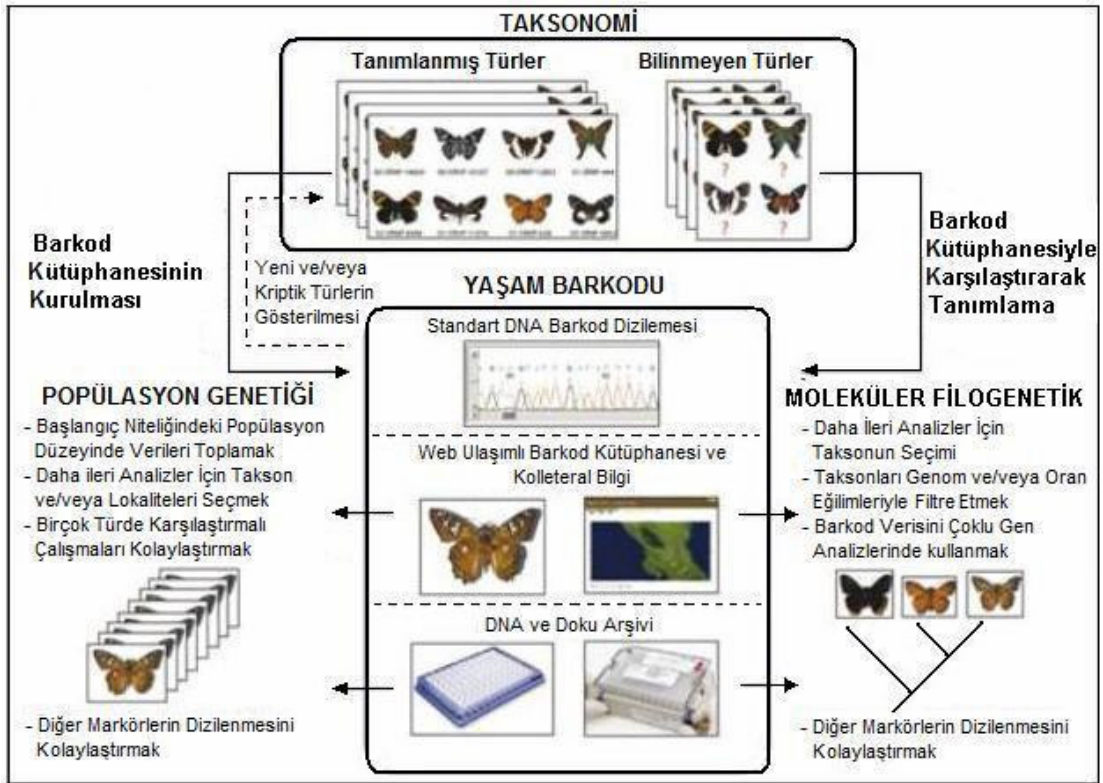
Kısa ortolog DNA dizileri kullanarak türlerin tanımlanması için kullanılan DNA barkodları, biyoçeşitlilik çalışmaları, juvenilleri tanımlama, eşeyler arasında ilişki kurma, adli analizlerin geliştirilmesinin kolaylaştırılması gibi araştırmalar için önerilmiş ve kullanılmıştır (Kress ve ark., 2005).

Standartlaştırılmış bir moleküler tanımlama sistemi fikri, tür tanımlanması için PCR temelli yöntemlerin gelişmesiyle birlikte 1990'lı yıllarda ortaya çıkmıştır. Moleküler tanımlama bakteriyal çalışmalarda, mikrobiyal biyoçeşitlilik araştırmalarında (Woese, 1996; Zhou ve ark., 1997) ve rutin patojenik suş tanısında (Maiden ve ark., 1996; Sugita ve ark., 1998; Wirth ve ark., 2006) kültür bağımsız tanımlama sistemlerine ihtiyaç nedeniyle uygulanmıştır. PCR temelli metodlar aynı zamanda taksonomi, gıda, adli moleküler tanımlama alanlarında (Teletchea ve ark., 2008) ve ökaryotik patojen ve vektörlerin tanımlanması için (Walton ve ark., 1999) sık olarak kullanılmıştır. Moleküler temelli tanımlama için birçok evrensel yöntem daha az gelişmiş taksonlar için kullanılmıştır fakat daha geniş kapsamda başarılı bir şekilde gerçekleştirilememiştir. “The Barcode of Life” projesi bu girişimin ardından standart, moleküler yöntem temelli ökaryotik tür envanteri için evrensel bir sistem yaratmayı amaçlamıştır. Bu proje Ontaria, Canada’da (<http://www.barcoding.si.edu>) Guelph Üniversitesi’ndeki araştırmacılar tarafından 2003 yılında başlatılmış ve uluslararası teşvik edici ‘Consortium for the Barcode of Life (CBOL)’ tarafından 2004 yılında ilerletilmiştir. DNA Barkod projesinin ne soy ağacının eldesi ne de moleküler taksonomi gerçekleştirmek gibi bir isteği vardır, fakat daha çok DNA barkod referans kütüphanelerinde harmanlanmış kuvvetli bir taksonomik bilgiye dayalı basit bir tanısal araç üretme amacındadır (Schindel ve Miller, 2005). ‘DNA Barcode of Life Data System’ (BOLD, <http://www.boldsystems.org>) 2004 yılından itibaren geliştirilmiş ve 2007 yılında resmi olarak kurulmuştur (Ratnasingham ve Hebert, 2007). Bu veri sistemi DNA barkod kayıtlarının kazanımı, depolanması, analizi ve yayınlanmasını temin etmektedir (Frézal ve Leblois, 2008).

DNA barkodlamada öncelikli hedef olarak bilinen türler için barkod dizilerine ait referans kütüphanelerinin derlenmesi üzerine odaklanmadır. “The Barcode of Life Data System (BOLD)” adlı veri sistemi DNA barkod kayıtlarının yayınlanması, analizi, depolanması ve kazanımına yardım eden bir informatik (bilişim) çalışma sahasıdır. “The Barcode of Life Data System (BOLD)” (www.barcodinglife.com.org) örnek koleksiyonundan, onaylanmış barkod kütüphanesine kadar analitik yolların bütün aşamalarını destekleyen bütünleşmiş bir platform sağlar. “The Barcode of Life Data System (BOLD)” sisteminin şu anda ulaşılabilir olan üç fonksiyonel birimi mevcuttur (Ratnasingham ve Hebert, 2007).

1. Yönetim ve Analiz Sistemi (The Management and Analysis System),
2. Tanımlama Sistemi (The Identification System),
3. Dış Bağlantı sistemi (External Connectivity System).

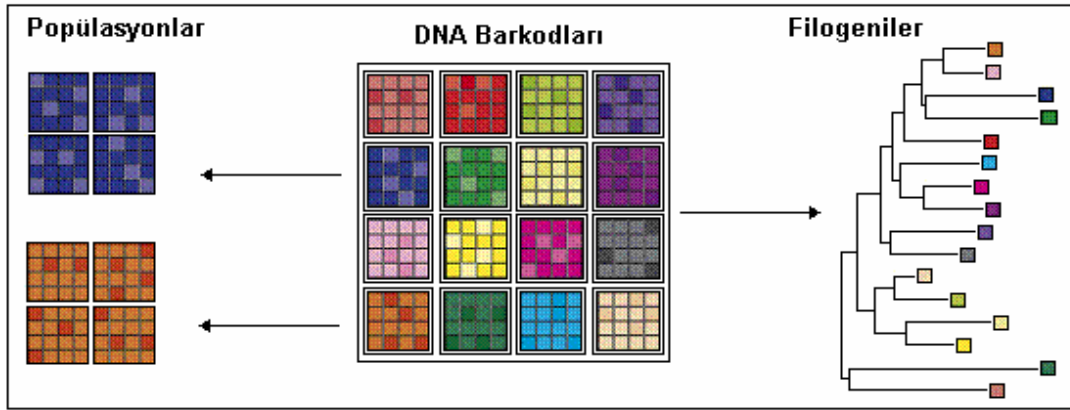
DNA barkodlamasının genel bir iş akışına bakılacak olunursa barkodlama yoluyla tür tanımlaması, genellikle kısa bir DNA dizisine erişimle başlanır. 'Barkod' çalışılan örneğin genomundan standart bir parçadır (spesifik bir gen bölgesi). Her bir bilinmeyen örnekteki barkod dizisi daha sonra kimliği bilinen bireylerden oluşturulan referans barkod dizileri kütüphanesiyle karşılaştırılır (Şekil 1.1.). Eğer örnek dizisi barkod kütüphanesindeki herhangi bir dizileyle yakından benziyorsa tanımlanır. Eğer herhangi bir benzerlik bulunamadıysa verilen tür için yeni bir barkod dizisine yeni kayıt rehberlik eder (yeni bir haplotip veya coğrafi bir varyant) veya daha yeni olarak karşılaşılan bir türün varlığını önerebilir (Hajibabaei ve ark., 2007).



Şekil 1.1. Barkod of Life projelerinin önemli bileşenleri ve onların moleküler filogenin kurulmasına ve popülasyon genetiği çalışmalarına katkısı (Hajibabaei ve ark., 2007'den uyarlanmıştır).

Diyagramda DNA barkodlama kütüphanelerinin bilinmeyen örneklerin yüksek işlem hacmi tanımlaması ile yeni ve gizli türlere dikkat çekerek yardım etmesi ile klasik taksonomiye desteğinin nasıl olduğu gösterilmektedir (Hajibabaei ve ark., 2007).

Moleküler filogenetik ve populasyon genetiği dalları DNA dizilerini kullanarak biyolojik akrabalıkları değerlendirmek için gerekli alet ve kullanımları geliştirmiştir. Bu disiplinler organizasyonun farklı seviyeleri üzerine odaklanırlar. Moleküler filogeni çalışmaları tipik olarak ortak atadan kökenlenmiş bir grup organizma ile ilgilenmesine karşın, populasyon genetiği tek bir türün populasyon içinde ve populasyonlar arasındaki varyasyonunu hedef almaktadır. Karşılaştırmayla, DNA barkodlaması türler için çok yönlü ve kapsamlı bir araştırma sağlayarak onların akrabalıklarının yanında betimlemelerine de odaklanarak zemin sağlar (Şekil 1.2.) (Hajibabaei ve ark., 2007).



Şekil 1.2. DNA barkod verisinin pozisyonunun hem populasyon genetiği hem de filogenetik veri arasındaki ilişkisi (Hajibabaei ve ark., 2007'den uyarlanmıştır).

DNA barkodları filogenetik ve populasyon genetiği arasında gri alanda uzanmaktadır. Bu diyagram DNA barkod verisinin pozisyonunun hem populasyon genetiği hem de filogenetik veri arasındaki ilişkisini gösterir. Her bir küçük kare bir bireyi göstermektedir. Farklı renkler farklı türleri göstermek için kullanılır ve türler içi varyasyon rengin tonunun değiştirilmesiyle gösterilmiştir (Şekil 1.2) (Hajibabaei ve ark., 2007).

DNA barkodlaması her ne kadar türlerin tanımlanmasında, yeni türlerin keşfedilmesinde, türlerin korunmasında yarar sağlasa da, DNA barkodlaması sistemine karşıt düşünceli gruplar oluşmuştur. DNA barkodlamasının savunucuları DNA barkodlama sisteminin biyolojik koleksiyonları yeniden canlandıracağını ve türlerin tanımlanmasını ve envanterlerini hızlandıracağını söyler (Gregory, 2005; Schindel ve Miller, 2005), buna karşın DNA barkodlaması sistemine karşıt düşünceli gruplar DNA barkodlamasının klasik sistematigi yok edeceğini ve hizmet sanayisine dönüştüreceğini tartışır (Ebach ve Holdrege, 2005).

DNA barkodlama yönteminin birçok alanda kullanılabilirliği vardır. Bir organizmanın yaşam döngülerinin tam olarak bilinmesi onun ekolojisinin, taksonomisinin, filogenisinin ve evriminin iyi anlaşılması için gereklidir (Ekrem ve ark., 2007). DNA barkodlamasının avantajlı bir yönü aynı türlerin farklı yaşam döngülerinin arasında kolaylıkla ilişki kurabilme imkanı sunmasıdır (Blaxter, 2004; Stoeckle, 2003). Bu durum özellikle laboratuvarında yetiştirilmesi zor olan taksonlar için çok avantajlı ve önemlidir. Bugüne kadar yapılan pek çok araştırmada yetişkin bireylerin olgunlaşmamış bireyler ile arasındaki ilişkilerin araştırılmasında kısa DNA zincirlerinin (DNA barkodlarının) yararı açıklanmıştır (Ekrem ve ark., 2007). Birçok *Chironomoid* türlerinin hem laboratuvarında yetiştirilmesi zordur hem de larva formu bilinmez. Carew ve ark. (2005), *Chironomoid* yaşam döngülerinin ilişkilendirmesinde DNA barkodlarının kullanılabilirliğini göstermiştir. Pegg ve ark. (2006), balık larvalarıyla yapmış oldukları çalışmada ergin bireylerle olgunlaşmamış bireyler arasında ilişki kurmak için DNA barkodlama tekniğini kullanmışlardır.

DNA barkodlaması yöntemi standartlaştırılmış ve yüksek teknolojiye dayalı tanımlama aletleri ile imkan sağlaması sebebiyle büyük bir topluluk için kullanılabilir olmasını sağlayarak sistematığın verimini artırır. Örneğin biyotip (parazitler, vektörler), tarımsal alanda (pestisitler, çevresel denemeler) da kullanılmaktadır. Taksonomistlerin tanımlama ile ilgili yüklerinin hafiflemesini sağlar, ayrıca taksonomistler tarafından tanımlanması sınırlı olan taksonların yakınlıklarını çözerek ve keşfederek yeni türlerin tanımlanmasına yardımcı olurlar. DNA barkodlama sisteminin tartışılması söz konusu olmayan diğer bir yararı temel biyoçeşitlilik envanterlerini kolaylaştırmasıdır. Moleküler filogenetik terimlerinden, soy ağacının düzenlenmesine kadar DNA'nın kümeleri ve evrimsel ilişkileri tanımlamada kullanılabilirliği tanımlanmıştır. Sadece güncel türlerin tanımlanmasına bağlı olmaksızın belirgin DNA dizilerinin katılımıyla çevresel örneklemede ve filogenetik ağaçların kurulmasında bu diziler evrimsel bağlamda yerleştirilerek kriptik biyoçeşitliliğin birçok envanterinde kullanılmıştır, örn. toprak bakterileri veya deniz mikroorganizmaları (Savolainen ve ark., 2005). Bu tanımlama yöntemi, açık bir şekilde sınıflandırmanın geliştirilmesinde ve taksonomide yaygın olarak kullanılmış morfolojik karakterlerin doğruluğunun denemesinde destek sağlar (Frézal ve Leblois, 2008). Handfield ve Handfield (2006), Anker ve ark. (2007), Bucklin ve ark. (2007), Gomez ve ark. (2007) DNA barkodlama tekniğinin yeni kriptik türlerin tanımlanmasında ve saptanmasındaki etkinliğini rapor etmişlerdir.

Böyle bir yöntem balıkları da içine alan denizsel organizmalar, toprak meiofauna, tatlı su meiobentozları ve hatta nesli tükenmiş kuşlar için önemli ölçüde kullanılabilir olmuştur (Savolainen ve ark., 2005). DNA barkodlama projesi sayesinde ekoloji ve tür biyolojisi içinde yeni anlayışlar ortaya çıkmıştır. Örneğin davranışsal çalışmaların olanaklı olmadığı zamanlarda mide özütlerinde bulunan organizmaların tanımlanması, yabani hayvanların beslenme biçiminin açığa çıkartılmasına imkan sağlamaktadır (Frézal ve Leblois, 2008). DNA barkodlama aynı zamanda konak parazit ve simbiyotik ilişkileri açıklamak için etkili bir araç olmuştur (Besansky ve ark., 2003). Ek olarak, *Lecythydaceae* familyasına ait kanatlı böcekler ile onların endosimbiyotik mayalarla (*Candida* spp. kümeleri ve diğer başka bir maya) ilişkilerinde örneklendiği gibi DNA barkodlama tekniği bir konak nesilden gelecek konak nesline simbiyont ve parazit geçiş yollarını açıklamak için uygundur (Berkov ve ark., 2007). Yağmur ormanlarında DNA temelli bu yöntem böceksele envanterler için o kadar etkili bir şekilde gerçekleştirilmiştir ki tropikal ekologlar DNA barkodlamasının en aktif savunucuları arasında olmuşlardır. DNA barkodlarının biyogüvenlikteki kullanılabilirliği örneğin hastalık vektörlerinin gözetiminde (Besansky ve ark., 2003) ve böceklerin yayılımında (Armstrong ve Ball, 2005) gösterilmiştir. Barkodlama çalışmaları aynı zamanda koruma şubelerinin de ilgisini çekmiştir. Örneğin “UK Darwin Initiative for the Survival of Species” öncelikli türlerin korunumunu desteklemek ve Orta Amerika orkideleri ve kaktüslerinin ticaretinin gözetimi amacıyla DNA barkodlama aktivitelerini içine alan 2 projenin yatırımını yapmıştır (Savolainen ve ark., 2005).

Çok sayıda türün tanımlanmasına izin veren, taksonların herkese açık veri tabanına ulaşmak ne zaman tam bir taksonomik tanımlamaya ihtiyaç duyulursa yararlı olacaktır. Bu yolda DNA barkodları çok sayıda bilimsel alana büyük destek sağlamaktadır (örn. ekoloji, biyoilaç, evrimsel biyoloji, biyoendüstri). DNA barkodlamasının maliyet ve zaman kazanımı otomatikleşmiş tür tanımlaması sağladığı için bu özellikle büyük örnekleme kampanyalarına yararlıdır (örn. Craig Venter’s Global Ocean örnekleme ekibi, Rusch ve ark., 2007). DNA barkodlamasının açık bir avantajı da zarar görmüş organizmaların veya parçacıkların (örn. yemek, mide özütleri) taksonomisinin tanımlanmasında kullanılabilmesidir. Bu yüzden DNA barkodlaması gıda endüstrisinde, diyet analizlerinde, adli tıpta, yasa dışı ticareti ve nesli tükenmekte olan türlerin yasak bölgede avlanmasını engellemek için yararlıdır. Ayrıca bazı türler polimorfik yaşam döngüsüne sahiptir ya da belirgin fenotipik plastisite sergileyen türlerde ve gözlenebilmesi imkansız olan türlerin tanımlanmasında kullanılabilir (Frézal ve Leblois, 2008).

DNA barkodlaması çalışmalarında mitokondrial genom, kloroplast genomu ve nükleer genomun kullanımına karar verilmesi barkodlaması yapılacak olan canlı türüne göre seçilmektedir. Bir DNA bölgesinin etkili bir barkod olarak kullanılabilmesi için, tanımlama bilgisini verebilecek yeterli değişkenlik içermesi basit bir reaksiyonda sıralanmak için yeterli kısalıkta olması, evrensel primerleri geliştirmek için kullanılabilir değişmez bölgeler içermesi zorunluluğu vardır. Ne yazık ki bu üç özelliğe sahip DNA bölgesi bulmak çok zordur (Stoeckle, 2003; Sass ve ark., 2007).

Hayvanlar için, Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (*cox1*) geni bazı istisnalara sahip olmakla birlikte (Meier ve ark., 2006; Gompert ve ark., 2006; Meyer ve Paulay, 2005) DNA barkodlama çalışmalarında tanımlama için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Hebert ve ark., 2003; Ward ve ark., 2005). Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 geni hayvanlar için barkodlama çalışmalarında evrensel bir dizi olarak kabul edilmiş olsa da, bazı gruplarda tür sınırlarında mitokondrial genlerle ilgili potansiyel problemlerden bahsedilmiştir. Ancak bu gen yerine çeşitli hayvan gruplarında nükleer ribozomal bölgeler barkod olarak kullanılmıştır (Savolainen ve ark., 2005).

Bitkilerde genel olarak mitokondrial DNA'daki sınırlı varyasyondan dolayı, *cox1* sadece bazı algelerde kullanılabilir (Saunders, 2005). Çiçekli bitkilerde başka bir yol ileri sürülmüştür. Birçok plastid bölgesi türler arası ayırında kullanılabilir (örneğin *trnH-psbA* intergenic spacer bölgesi Kress ve ark., 2005, *rbcL* ve *trn-F* gibi biraz daha tipik filogenetik işaretler Chase ve ark., 2005), diğer taraftan angiospermlerde yaygın olan hibridizasyon ve yaygın poliploidi olaylarının nedenini açıklamak için çoklu genetik lokuslara ihtiyaç duyulabilir. Ribozomal DNA (örneğin orkidelerdeki ITS) plastid genlerini tamamlamak için kullanılabilir. Bunun yanında daha kısa ve düşük kopya sayısına sahip nükleer işaretler, gelecekte tür teşhisi ve tür ayırımında kullanılmak üzere daha ayrıntılı ve çok bileşenli barkod elde etmek için geliştirilmektedir (Chase ve ark., 2005). Bu yöntem ayrıca birkaç mikrobarkodun kombinasyon halinde kullanılmasıyla, aynı zamanda mikologların da büyük ölçüde dikkatini çekmiştir (Savolainen ve ark., 2005).

Sınırlı sayıda türden büyük miktarda dizi bilgisinin ve tüm genom dizilemesinin sağlandığı bu çağda, DNA barkodlaması çalışmalarındaki gelişmeler post genomik çağa doğal bir katkı sağlayacaktır. DNA barkod yöntemi sayesinde birçok türün daha hızlı ve daha ucuz olarak keşfedilmesi sağlanarak bilgilerin artışı sağlanacaktır. DNA barkod çalışmalarından sağlanan sonuçlar daha ayrıntılı genetik analizler için hedef olan türleri tanımlamada araştırmacılara yardım edebilir (Hajibabaei ve ark., 2007).

1.1.1. DNA Barkodlama ve Taksonomi

Taksonomik çalışmalarda, DNA barkodlaması örnekleri tür düzeyinde tanımlamada önemli bir role sahip olsa da (Şekil 1.2.), bu barkodlama çalışmalarının kapsamlı bir taksonomik analizin yerini aldığı anlamına gelmez. Örneğin bilinmeyen bir örnek, barkod kütüphanesinde var olan kayıtlarla yakın bir eşleşme sağlamıyorsa, barkod dizisi bu bilinmeyen örneği yeni bir tür olarak belirlemeye hak kazandırmaz. Buna karşılık böyle örnekler daha iyi taksonomik analizler için kullanılmalıdır. Geleneksel taksonomik analizler çerçevesinde bakıldığı zaman -ki barkodlama analizlerinden çok daha yavaştır- böyle tipik olmayan örneklerin değerlendirilmesi tür keşiflerine yardımda daha yüksek potansiyele sahiptir. Başarısızlıkla sonuçlanmış ya da çalışılması zor taksonomik gruplar için DNA barkodlaması hızlı bir şekilde örnekleri genetik olarak ayrı gruplar içinde sınıflandırmada klasik taksonomiden önce gelebilir. Örneğin Smith ve ark. (2005) DNA barkodlamasını Madagaskar'daki karıncaların çeşitliliğini değerlendirmede kullanmıştır ve şu anda da bu organizmaların geniş aralık biyoçeşitliliğini bulmada rutin olarak kullanılan bir araç olmuştur (Hajibabaei ve ark. , 2007).

DNA barkodlaması aynı zamanda *Lepidoptera* gibi iyi çalışılmış gruplarda da kullanılmıştır. Örneğin, barkodlama kuzeybatı Kosta Rika'da tırtıl faunasının biyoçeşitliliğini anlamada rutin olarak kullanılmaktadır. 25 yıl önce Janzen, Hallwachs ve arkadaşları tarafından başlatılan bu projede (Janzen ve ark., 2005; Janzen, 2004; Janzen, 2003), son üç yıldır 2000'den fazla güve, kelebek ve onların parazitlerinden oluşan 25000'den fazla örneğe referans dizi kütüphanesi oluşturmak için barkodlamayı kullanmışlardır. Bu kütüphane şu an örneklerin sınıflandırılması ve tanımlanmasının hızlandırılmasında geleneksel (klasik) taksonomik çalışmalarla birlikte kullanılmaktadır (Hajibabaei ve ark. , 2007).

Yeni türlerin tanımlanması kapsamlı taksonomik çalışmalarla nihayetinde başarılsa da, DNA barkodlaması bu süreci önemli ölçüde kolaylaştırır. Morfolojik ve ekolojik verilerin toplanmasını gerektiren klasik taksonomik çalışmalar farklı taksonomik kümeler için değişiklik gösterebilir (örneğin kuş ve balıkların taksonomik tanımlanması değişik metod ve beceriler gerektirir), buna karşın barkod analizleri hemen hemen standartlaştırılmış bir yolla yaşamın büyük suşları karşısında uygulanabilir; örn. bütün hayvan taksonları (Hajibabaei ve ark., 2007).

1.1.2. DNA Barkodlama ve Moleküler Filogenetik

1.1.2.1. Moleküler Filogenetik Çalışması

Moleküler filogenetik çalışması analiz için hedef grupla ilişkili ana kararı, temsil edici taksonun toplanmasını, dizi bilgisinin edinimini ve filogenetik ağacın optimum kriterler kullanılarak yapılandırılmasını (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony veya Bayesian Analizleri gibi) içerir. İyi bir filogenetik ağacın şekillenmesini optimize etmek için hem lokusların seçimi hem de temsilci taksonun seçimi dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Kısa bir zaman öncesine kadar gen seçimi ribozomal genler gibi evrensel hedefler ve kolay dizilenme ile sınırlandırılmaktaydı. Fakat, son çalışmalar çok daha stratejik çalışmaların olabileceğini gösteriyor. Dolayısıyla, son yapılan çoğu filogenetik çalışmalarda değişik taksonomik seviyelerde çözümü arttırmak için ve gen spesifik eğilimlerden kaçınmak için değişik genomik kompartmanlar (örn. çekirdek, mitokondri ve kloroplast) ve çoklu lokuslardaki dizi bilgileri kullanılmaktadırlar. (Hajibabaei ve ark., 2007).

Moleküler filogeni çalışmasında önemli bir diğer husus da, takson örneklemesinin lokus seçimine göre daha az dikkat isteyen bir durum olduğudur. Takson örnekleme, dallanma uzunluklarının ve homoplazinin indirgenmesiyle doğru filogeninin geliştirilmesi için yardımcı taksonların sayılarının artması olarak tanımlanır. Ancak her iki faktörde filogeni yanlışlarına sebep olabildiği söylenmektedir. Ancak, bazı tartışmalar da filogeni çözümlenmesinin geliştirilmesinde takson eklenmesinin gen eklenmesinden daha değerli olduğu yönündedir. Daha fazla takson eklenmesinin yardımcı olacağına şüphe olmamasına rağmen, bu taksonların dikkatli bir şekilde seçimi önemlidir, çünkü verilen sayısal faktörler analiz edilebilen takson sayısını sınırlandırabilir. Bu yüzden, araştırmacılar, geniş sayılı taksonların filogenilerinde (örneğin yüzlerce tür) bulgusal ve basitleştirilmiş analitik metotlara güvenirlir (Hajibabaei ve ark., 2007).

1.1.2.2. Barkodlardan Filogeniye

Barkod kütüphaneleri, moleküler filogenetik verilerle benzerliğe sahip olmasına karşın daha derin seviyelerdeki evrimsel ilişkilerin çözümlenmesinde genellikle yeterli filogenetik sinyallere sahip değildir. Barkod dizileri başlıca NJ gibi filogenetik ağaç yeniden yapılandırma metodlarıyla analiz edilse de, bu barkod temelli ağaçlar filogenetik ağaçlar olarak yorumlanmamalıdır. DNA barkodlama projeleri taksonun seçiminde yardım ederek, filogenilerin kurulmasına yardım edebilir (Şekil 1.1., 1.2.). Çünkü DNA barkodları hem türleri tanımlamada hem de gözden kaçmış ve yeni türlere dikkat çekerek geniş

filogenetik bir çalışma için örnek aday olabilecek taksonu belirlemeye yardımcı olur (Şekil 1.1.). “Barcode of Life” projeleri hayat ağacının farklı dalları üzerinde filogenetik çalışmalar yürütmek için mükemmel taksonomik örnekleme çalışmaları yaratır (Şekil 1.2.) Sonuç olarak, barkod kütüphanelerinin çerçevesinde kurulan filogenilerin, yetersiz takson örnekleme tarafından etkilenmesi daha az olasıdır. Barkod dizi verileri aynı zamanda filogenetik ağaçların kurulmasında kullanılabilen genlerin değişken repertuarı için paylaşımlı genomik yapıtaşları sağlar. (Hajibabaei ve ark., 2007).

1.1.3. DNA Barkodlama ve Populasyon Genetiği

1.1.3.1. Populasyon Genetiği Çalışması

Alloenzim modeli veya restriksiyon enzim polimorfizmleri gibi geleneksel analitik yolların yeri, şu anda büyük ölçüde dizi bazlı analizler ile yer değiştirmiştir. Bununla birlikte, bir populasyon genetiği araştırması için uygun marker sisteminin seçimi, bilgi eldesi için pratik ölçümler ve talep edilen soruların hassaslığı gibi birtakım konularda dikkatli düşünmeyi gerektirir. Mitokondrial DNA markerlerinin haploid ve tek ebeveynli kalıtmı olmasından dolayı, analizler için yaygın olarak hedeftirler ve özellikle populasyon düzeyinde çalışmalara büyük katkıları vardır. Bununla birlikte çoklu gen (çoklu lokus) analizleri son zamanlarda güvenilirlik kazanmıştır. Çok yakın bir zaman önce, tek Nükleotid Polimorfizmi gibi (SNP) üstün ölçekli dizi analiz metodları populasyon düzeyindeki çalışmalara yeni bir boyut kazandırmıştır. Bu dizi bazlı markerlerin geniş kapsamlı analizleri, insan hastalıkları ile ilişkili genetik varyasyonları tanımlamayı hedefleyen Hapmap (<http://www.hapmap.org>) gibi projeler çerçevesinde devam etmektedir (International Hapmap Consortium, 2005) (Hajibabaei ve ark., 2007).

Populasyon yapısını çalışmak için kullanılan markerler çok sayıda olmasına rağmen, çalışılan tür sayısı çok daha azdır. Tipik populasyon genetiği çalışmaları tek bir türün populasyon içindeki varyasyonunu inceler ve bu şekildeki bir bilgi göç ve genetik sürüklenme gibi konuları araştırmada populasyonların coğrafik çalışmalarına başarılı bir şekilde uygulanır. Bununla birlikte, birçok taksonomik grup yaygın olarak DNA dizi verisiyle çalışılmıştır. Örneğin, gen bankası araştırması insan, şempanze ve fare, *Drosophila melanogaster* gibi birçok model organizmanın bütün dizi temelli populasyon genetiği çalışmalarının yarısından fazlasını oluşturduğunu belirtmiştir (Hajibabaei ve ark., 2007).

1.1.3.2. Barkodlardan Populasyon Analizlerine

DNA barkodlaması için bir araya gelmiş tipik dizi bilgileri, populasyon düzeyinde sorulara tamamı tamamına yol göstermemesine rağmen, tür içinde genomik çeşitliliğin modellenmesinde erken bir kavrama sağlayabilir. Çünkü barkodlama tipik olarak büyük sayıda türü hedefler, bu da farklı türlerde veya farklı ekolojik alanlarda genetik çeşitliliğin karşılaştırmalı çalışmalarını kolaylaştırma da güçlü bir araç olabilir (Şekil 1.2.). ‘Coalescent’ temelli modeller gibi populasyon genetiği modelleri, DNA barkod analizlerinde bireylerin türlere tayin edilmesi için önerilmiştir. Türlerin genetik çeşitliliği çalışmalarında barkod verilerinin kullanılabilirliğinin daha ileri araştırmaları ilgi çekici olabilir. Ek olarak, fazla miktarda barkod dizilerinin ve ekolojik, coğrafik bilgi gibi kollateral bilgilerin birikimi sayesinde, barkod verileri vasıtasıyla sonuçlandırılabilen soru çeşitlerinin araştırılması önemlidir. Örneğin, bir taksonomik topluluktaki veya coğrafik bölgedeki türlerde habitat sürekliliği ve genetik yapı, hem bireylerin hem de genetik markerlerin örneklemeinin genişletilmesiyle potansiyel olarak çalışılabilir (Hajibabaei ve ark., 2007).

Özet olarak, DNA barkodlaması taksonomik araştırmalara, populasyon genetiğine ve filogenetiğe katkıda bulunması için elde hazır tutulur. Taksonomide, DNA barkodlaması örneklerin rutin olarak tanımlanması için kullanılır ve aynı zamanda daha kapsamlı taksonomik araştırmalar için atipik örnekleri değerlendirebilir. Filogenetik çalışmalarda, DNA barkodlaması uygun takson seçimi için başlangıç noktası olabilir ve barkod dizileri filogenetik analizler için dizi veri kümesine eklenebilir. Populasyon genetiği araştırmalarında, DNA barkodları populasyon diverganslarının büyüklük ve doğasının ilk sinyali sağlayabilir ve birçok türde populasyon çeşitliliğinin karşılaştırmalı çalışmalarını kolaylaştırır (Hajibabaei ve ark., 2007).

1.1.4. Bitkilerde DNA Barkodlaması

1.1.4.1. Kloroplast Organeli

Kloroplastın orjini milyar yıldan daha fazla geriye gider. Fosil bir kırmızı alg olan *Bangiomorpha* alginin 1,2 milyar yaşında olduğu tanımlaması bu noktaya güçlü bir destek sağlar. 1951 yılında Chiba sitolojik çalışmalardan yararlanarak *Selaginella* yosununun ve iki çiçekli bitkinin kloroplastlarının DNA içerdiğini önermiştir. Stocking ve Gifford (1959), *Spirogyra* adlı yeşil algin plastidlerinde de DNA’yı saptamıştır ve böylece 1960’larda, endosimbiyont teori Lynn Margulis tarafından önerilmiştir. 1960’lı yılların çoğunu simbiyosizin hücrelerin evrimleşmesindeki ana etken olduğunu vurgulayarak

harcamıştır. 1970’de “The Origin of Eukaryotic Cells (Ökaryotik Hücrelerin Orjini)” adlı eserinde bu düşüncesini yayınlamıştır (Ravi ve ark., 2008).

Kloroplastlar kendi genetik materyallerine sahip olması nedeniyle yarı otonom organellerdir. Plastidlerde eşsiz bir DNA türünün varlığı 1963 yılında Sager ve Ishida tarafından doğrulanmıştır. Bundan sonra, plastid genom organizasyonu, gen ekspresyonu ve dizi bazlı filogeni üzerinde çalışmalar büyük ölçüde ortaya çıkmıştır. Mitokondriler gibi kloroplastlar da prokaryot orjinlidirler. Serbest yaşamlı, oksijen üreten Siyanobakteriler bugünkü kloroplastların atalarıdır ve oksijen tüketen proteobakteriler ise mitokondri oluşumuna yol açmıştır. Endosimbiyont genomların kendi genlerini, genom boyutunda azalma ve bölünme ile sonuçlanan endosimbiyotik gen transferiyle nükleusa aktardığı, ökaryotik genetik sisteme entegre olduğu büyük ölçüde kabul edilmiştir, örn. Brennicke ve ark., 1993; Martin ve Herrmann, 1998; Race ve ark., 1999; Timmis ve ark., 2004 (Ravi ve ark., 2008).

1.1.4.2. Kloroplast DNA’sının Genel Yapısı

Gelişmiş bitkilerde kloroplast DNA’ları (cpDNA) çift zincirli moleküller olup, 35-217 kb aralığında oldukça küçük bir değerde olmakla birlikte, birçok fotosentetik organizmalarda 115-165 kb arasında değer almaktadır. Her hücrede 1000-10000 kopyası mevcuttur. Kloroplast DNA’sı genellikle bir büyük ve bir küçük tekli kopya bölgesi (LSC ve SSC olmak üzere) tarafından ayrılmış tersine çevrilmiş tekrarların (IR_A ve IR_B) 2 kopyasını içerir. Kloroplast DNA’larında bulunan genler genellikle içerik ve sıra bakımından değişik organizma gruplarında korunmuştur. Bu genler üç geniş kategoriye ayrılabilir. İlk grup kategorideki genler fotosentetik düzen için gerekli genleri içerir. Bu kategori fotosistem I (*psaA*, *psaB*), fotosistem II (*psbA*, *psbB* vs.), sitokrom b6f (*pet A*, *pet B* vs.), ATP sentez (*atpA*, *atpB* vs.), RuBisCo (*rbcL*) ve NAD(P)H dehidrogenaz genlerini (*ndhA*, *ndhB* vs.) kapsar. İkinci kategori genetik düzen için gerekli genleri ve RNA genlerini içerir. Bu da transfer RNA (*trnH*, *trnK* vs.), ribozomal RNA (*rrn16*, *rrn5* vs.), RNA polimeraz (*rpoA*, *rpoB* vs.) ve ribozomal alt ünite genlerini (*rps2*, *rps3*, *rpl2*, *rpl16* vs.), üçüncü kategori ise *ycfs* olarak adlandırılan korunmuş ORFs ve *matK* ve *cemA* gibi potansiyel protein kodlayan genleri içerir (Ravi ve ark., 2008).

Kloroplast genleri ve genomları filogeni çalışmalarında da kullanılmaktadır. Kloroplast genleri ve genomları bitki soy ağacının kısımlarını çözümlenmekte etkin rol oynamaktadır. Çeşitli genler ve intergenic spacer bölgeler filogenetik analizler için geniş ölçüde verimli önemli markerler olarak kullanılmıştır. Bunlar, *rbcL*, *ndhF*, *matK*, *atpB*,

rpl16 ve kodlama yapmayan *trnL* intron ve *trnL- trnF* intergenic spacer bölgeyi kapsar. Kloroplast genlerinin bitki soy ağacında çözülmesi zor olan bölgelerin çözümlenmesi için kullanımını Jansen ve ark. 2006'da yapmış oldukları çalışmada görmek mümkündür (Ravi ve ark., 2008).

1.1.4.3. Kloroplast DNA'sı ve DNA Barkodlaması

Son zamanlarda, kloroplastlarda bulunan genler ve spacer bölgeler filogenetik sorunları çözmek için kullanılmaktadır ve tür içi etiket olarak tanınmışlardır. Bu genler aynı zamanda DNA barkodlaması olarak bilinen yeni bir tekniğin de temelini oluşturmaktadır. DNA barkodlamasının hedefi, eşsiz türe özgü etiket olarak rol alan standardize bir DNA bölgesi kullanarak tür tanımlaması için hızlı, tam ve otomatik bir metod sağlamaktır. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz alt ünitesi 1'i kodlayan *cox1* geninin çeşitli hayvan gruplarında ve aynı zamanda bazı alg gruplarında da kullanılabilirliği kanıtlanmış olup (Saunders, 2005) DNA barkodlaması için kullanılmıştır. Bu gen, kara bitkilerinde büyük oranda değişken değildir ve dolayısıyla kara bitkilerinde barkodlama için uygun değildir. Bitkilerde bu nedenden dolayı barkod adayları olarak hizmet görebilecek bölgeleri belirlemek için birçok araştırmacı ITS bölgesini, kloroplast genlerini (örneğin, *matK*, *rbcL*, *rpoB*) ve intergenic spacer (*trnH- psbA*) bölgelerini kullanarak bitkiler için evrensel barkod belirleme çalışmaları yapmışlardır (Ravi ve ark., 2008).

Yapılan araştırmada, Kaz Dağı endemik bitkilerinden *Sideritis trojana* Bornm. ve *Digitalis trojana* Ivan. türleri kullanılarak DNA barkodlaması çalışması yapılmıştır. *Sideritis* cinsi, aromatik bitkiler açısından oldukça zengin olan *Lamiaceae* familyasının üyelerinden olup 46 tür 53 taksondan oluşmaktadır. İçerdiği taksonlardan 39 tanesi endemik olan bu cins, %78,2'lik endemizm oranı ile Türkiye florasında oldukça dikkat çekici bir özelliğe sahiptir (Davis, 1988; Davis, 2000; Başer ve Kırmırcı, 1998). *Sideritis* türlerinin toprak üstü kısımları çay ve halk ilacı olarak eski yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu türlerin antispazmodik, antifeedant (böceklerde iştah önleyici), karminatif, analjezik, sinir sistemi stimulantı, sedatif, antitussif ve antikonvulzan etkilere sahip olduğu kayıtlıdır (Aydın ve ark., 1986; Öztürk ve ark., 1996; Sezik ve Ezer, 1984; Bondi ve ark., 2000; Baytop, 1999; Yeşilada ve Ezer, 1989). Ayrıca halk arasında genellikle "dağ çayı, yayla çayı" olarak isimlendiren bu türlerden hazırlanan çaylar soğuk algınlığı, öksürük ve sindirim sistemi rahatsızlıklarında kullanılmakta ve bal yapıcı özelliklerinden dolayı arılarca tercih edilmektedir (Başer ve ark., 1986; Sezik ve Ezer, 1983). Bu türler fitokimyasal olarak birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve uçucu yağ, diterpenoid,

yağ asidi, kumarin ve flavonoid grubu bileşiklerin varlıkları rapor edilmiştir (Sezik ve Ezer, 1983; Kırmıner ve ark., 1999; Özcan ve ark., 2001; Tomas- Barreran ve ark., 1988; Gonzalez ve ark., 1972).

Araştırmamızda, kullanılan bir diğer bitki olan *D. trojana* *Scrophulariaceae* familyasında yer almaktadır. Kozmopolit bir familya olan *Scrophulariaceae* familyasının 200'den fazla genusu ve 3000 kadar taksonu vardır (Seçmen ve ark., 1970). Ülkemizde 30 genus ve 244'ü endemik (%56) olmak üzere toplam 456 taksonla temsil edilir. *Digitalis* genusu ise 5'i (%63) endemik olmak üzere 9 taksonla temsil edilmektedir (Davis, 1972, 1988). *D. trojana* iki veya çok yıllık, otsu, 18 cm kadar uzunlukta köklü bir bitkidir (Uysal ve Öztürk, 1991). *D. trojana* çalılık yamaçlarda, kireç taşı uçurumlarda, orman açıklıklarında, boş ve nadasa bırakılmış tarlalarda ve yol kenarlarında bulunmaktadır (Davis, 1972, 1988). Kireççe fakir, fosforca zengin ve organik maddece çok zengin topraklarda yetişmektedir (Uysal ve Öztürk, 1991). *Digitalis* taksonlarından "Digitaline" adı ile bitkinin yapraklarından elde edilen madde tedavide kullanılmaktadır. *D. trojana*, *Digitalis* taksonları içinde yapraklarında taşıdığı Digitaline, glikozitler, saponinler ve tanen bakımından özellikle kalbe etkili olan glikozit miktarı olarak en yüksek olanıdır (Tanker ve Tanker, 1973; Tanker ve ark., 1988). *D. trojana* yapraklarında glikozitlerden digitalinum, verum, glukogitorozoit, lanatozit B, strospeit ve glukodigifukozit teşhis edilmiştir (Tanker ve ark., 1988).

Araştırmamızda, *matK* geni ve *trnH-psbA* genler arası bölge kullanılarak hem bu lokusların kullanılan örnekler için bir iyi bir barkod olarak görev yapabilme özellikleri ve diğer kara bitkileri için barkod olarak kullanılabilme olasılıkları hem de bu bölgeler kullanılarak ülkemiz açısından çok önemli olan Kazdağı endemik bitkilerinden *S. trojana* ve *D. trojana* türlerinin dizilerine bağlı olarak diğer türlerle ilişkisi ve taksonomik olarak sınıflandırılması yapılmış endemik türlerin, dizilerine göre elde edilen sınıflandırılmalarının taksonomik sınıflandırmayla ilişkisi anlaşılmaya çalışılmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hebert ve ark., 2004b yılında kuş türlerinin ayrımı ile ilgili yaptıkları araştırmada Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (COI) geninin geçerliliğini test etmişlerdir. Kuzey Amerika kuşlarının 260 türü için COI barkodlarını belirlemişler ve türlerin ayırt edilmesinin kolay olduğunu bulmuşlardır. Bütün bu türlerin farklı COI barkodlarına sahip oldukları ve yakından akraba türler arasındaki farklılığın tür içi farklılıktan ortalama olarak 18 kat daha fazla olduğu görmüşlerdir. Çalışma global bir araştırmanın ek olarak birçok kuş türü tanımlanmasına yol göstereceğini önererek dört tane yeni Kuzey Amerika kuş türü tanımlamıştır. Yapılan bu çalışmada ayrıca diğer hayvan gruplarında dizi farklılığının yeni hayvan türlerinin keşfini hızlandırabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Lambert ve ark., 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada dünya biyotasının geçmiş çeşitliliğini değerlendirmede DNA barkodlama tekniğinin kullanılabilir olup olmadığını araştırmışlardır. Bunu test ederken Yeni Zelanda'ya ait olan nesli tükenmiş ve uçamayan bir kuş türü olan Yeni Zelanda deve kuşu (Moa) grubuna ait olan bireylerin Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 (COI) geninin 5' terminus kısmını dizilemişlerdir. Yeni Zelanda deve kuşları bu büyük okyanus kara parçası üzerinde izolasyon halinde yayılmış olan büyük bir takson grubundan oluşmaktadır. Protein kodlayan ve 12S DNA dizilerini de içeren geniş bir veri kümesinden yararlanarak bir zamanlar nesli tükenmiş Yeni Zelanda deve kuşlarının sayısı hakkında kesin bir bilgiye ulaşmışlardır. Yapmış oldukları çalışmada, COI barkod dizilerini içeren veri kümesi kullanarak her bir Yeni Zelanda deve kuşu türünün saptanabildiğini ve bununla birlikte tür içi COI dizi varyasyonunun hepsinde düşük seviyede olduğunu göstermişlerdir. Tür içinde COI dizi farklılıklarının %0-1,24 aralığında sıralandığını belirlemişlerdir. Bu belirledikleri veride nesli tükenmiş Yeni Zelanda deve kuşu türleri için kısa COI dizilerinin bilinen türlerin tanımlanabilmesi dışında bilinmeyen türlerin de tür seviyesinde tanımlanmasında kullanılabilirliğini göstermiştir. Daha genel olarak COI dizileri diğer nesli tükenmiş hayvan türlerini saptamak amacıyla kullanılabilirliğini belirtmişlerdir.

Kress ve ark. (2005) *Nicotiano tabacum* ve *Atropa belladonna* ile yaptıkları bir çalışmada çiçekli bitkilerde DNA barkodlarının kullanılabilirliğinin araştırılması için iki türde plastid genomlarının kullanılabilirliğini karşılaştırmış ve daha sonra 53 bitki ailesinden 80 cins içerisinde bulunan 99 türün üzerinde aday barkod bölgeleri test etmişlerdir. Yapılan çalışmada iki umut verici bölge önerilmiştir, plastid nükleer intergenic

spacer (*trnH-psbA*) ve RNA kodlayan nükleer genler için internal transcribed spacer (ITS). Araştırma sonuçlarına göre, *trnH-psbA* bölgesi yüksek ayrılma seviyeleri sergilemiştir fakat sadece 450 bp uzunluğunda olduğundan 600-800 bp uzunluğunda olan tipik hayvan barkodlarından daha kısadır. *trnH-psbA* angiospermlerde kullanılabilir ve kolay çoğaltılabilir bir bölge olmasına rağmen kısa uzunluğu evrensel bir kullanım için yeterli veri sağlamayabilir. İkinci aday olarak gösterdikleri ise, *rbcL* kloroplastını da içeren diğer plastid bölgelerine göre daha hızlı evrimleşen ITS bölgesidir. *rbcL* bitki sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen tür seviyesinde tanımlamada kullanım için yavaş evrimleşir ve yaklaşık 1428 baz çiftine sahiptir. Ek olarak, bazı taksonlarda ITS kullanımı da bazı kısıtlamalar sergiler. ITS'nin kullanılabilirliği özellikle adalarla ayrılmış taksonlarda, birçok kopyanın klonlanmasını gerektiren divergant paraloglar ve düşük dizi kalitesiyle sonuçlanan ikincil yapı problemlerini azaltır. Ancak bu iki bölge bir takım kısıtlamalara sahip olsa da ITS ve *trnH-psbA* bölgelerinin kombinasyonunun bitki barkodlaması için en iyi aday olabileceğini önermişlerdir.

Newmaster ve ark. (2006) kara bitkilerindeki sorunu çözmek için öz bir barkodlama geni altında yüksek derecede değişkenlik gösteren lokusların yerleştirilmesi yönünde sıralı bir yöntemin benimsenmesini önermişlerdir. Araştırmacılar *rbcL* geninin umut vaat ettiğini işaret ederek bu genin ilk sıra lokusu olarak hizmet edip edemeyeceğini araştırmışlardır. Araştırmacılar *rbcL* genini gen bankasında bütün büyük gruplarda geniş gösterimi ile en çok karakterize edilen plastid kodlayan bölge olması nedeniyle seçtiklerini, çalışmalarında bu gen üzerine odaklandıklarını ve diğer plastid genleriyle karşılaştırma bakımından iyi bir temel olacağını söylemişlerdir. Gen bankasından 10,000 üzerinde *rbcL* dizisinin analizleri bu bölgenin öz bölge olarak hizmet edebileceğini göstermiştir. Bu bölgenin, hem cinslerin ikili gruplar halinde karşılaştırılmalarının yaklaşık olarak %85'inde türler arasında ayırım yapabilmek için yeterli varyasyon gösterdiği bulunmuştur. Çalışmaları, bu genin karayosunlarının barkodlama çalışmalarında da tek bir lokus olarak hizmet edebileceği, bununla birlikte diğer kodlama yapan plastid bölgeleri ile birlikte değerlendirildiğinde bütün kara bitkilerinde barkodlama çalışmaları için çok daha iyi bir adayın ortaya çıkabileceğini önermişlerdir.

Robba ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada kırmızı alglerden kullanılan 38 örneği ve gen bankasından alınan 31 diziyi tanımlamada Mitokondrial Sitokrom Oksidaz alt ünite 1 (*cox1*) genini değerlendirmiştir. Dizi verisi 6 alg takımını içerir: *Bangiales*, *Ceramiales*, *Corallinales*, *Gigartinales*, *Gracilariales* ve *Rhodymeniales*. Yapmış oldukları çalışma sonucunda bu türlerin DNA barkodlaması için *cox1* dizisinin ayırt etmede potansiyel

olarak kullanılabilceğini göstermiştir. *Mastocarpus stellatus* (0-14 bç) ve *Gracilaria gracilis* (10-11 bç) hariç analiz edilmiş 539'dan fazla baz çiftinde tür içi varyasyonu sadece 0 ve 4 arasında degerlendirmişlerdir. *Bangia fuscopurpurea*, *Corallina officinalis*, *G. gracilis*, *M. stellatus*, *Porphyra leucosticta* ve *P. umbilicalis* türlerinde kriptik çeşitlilik bulmuşlardır. *cox1* dizisini *Porphyra* türleri için Rubisco dizisiyle karşılaştırdıkları zaman *cox1* dizisinin başlangıç aşamasında türleşme ve kriptik çeşitliliğin açığa çıkarılmasında daha hassas olduğunu bulmuşlardır.

Schneider ve Schuettpelz (2006) eğrelti otu gametofitlerinin tanımlanmasında DNA barkodlaması yönteminin kullanımını keşfetmişlerdir. Çünkü eğrelti otlarının tanımlanması genellikle düşük morfolojik karakterleri sebebiyle bir engel teşkil etmektedir. Yapmış oldukları çalışmada, bilinmeyen bir kökenin kısır bir gametofitinden plastid *rbcL* dizisini elde etmişlerdir ve bu dizinin etkinliğini belirlemek için BLAST kullanmışlardır. Bu yöntemi kullanarak gametofiti *Osmunda regalis* olarak tanımlamışlardır. Bu tanımlamanın sağlamlığını ve türler arasında farklılığın belirlenmesinde *rbcL* kullanılabilirliğini değerlendirmek için *Osmundaceous* eğrelti otu dizilerinin filogenetik analizleriyle harekete geçmişlerdir. Elde ettikleri sonuçların, DNA temelli tanımlamanın, eğrelti otu gametofitlerinin ekolojisinin keşfedilmesinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu bir kanıt olduğunu belirtmişlerdir.

Smith ve ark. (2006) *Diptera* cinsinde barkodlama görüşünü test etmek için *Belvosia Robineau-Desvoidy* topluluğundan 1830 parazitik sineğe (*Tachinidae*) COI verisi kullanmıştır. Sonuçlar morfolojik görüşlerin büyük ölçüde moleküler verilerle desteklendiğini göstermiştir. Ancak morfolojik çalışmalar tek başına bazı tür gruplarında kriptik çeşitliliği doğru olarak meydana çıkaramaz. Bu bulgu morfolojik olarak anlaşılması zor olan soyların çok belirgin moleküler farklılıklar gösterdiği, Smith ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayla paralellik göstermiştir.

Yoo ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmada Koreli kuş türlerinin tanımlanmasında COI barkodunun geçerliliğini test etmişlerdir. 92 Koreli kuş türü için COI barkodunun 5'terminal ucunu belirlemişlerdir. Ve bu belirlemiş oldukları bölgeyle tanımlamanın gayet açık olduğunu bulmuşlardır. Yakından ilişkili türler arasındaki genetik farklılığın tür içi genetik farklılıktan ortalama 25 kat fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda iki potansiyel kozmopolit tür tanımlamışlardır. Yapmış oldukları çalışma sonucunda türler arasındaki COI dizilerindeki büyük farklılığın bulgusu Koreli kuş türlerinin tanımlanmasında COI barkodlarının kullanılabilirliğinin geçerliliğini doğrulamıştır.

Vischi ve ark. (2006) *Helianthus annuus*, *Helianthus argophyllus*, *Helianthus debilis*, *Helianthus tuberosus* adlı dört ayçiçeği örneğini plastid *trnH-psbA* intergenic spacer kullanarak moleküler seviyede karakterize etmişlerdir. *trnH-psbA* intergenic spacer dizisini tür ve örnek tanımlaması için bir araç olarak DNA barkod sisteminin gelişmesi doğrultusunda seçmişlerdir. *trnH-psbA* plastid bölgesini spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltmışlar ve ABI Prism 3730 Automated DNA dizileycisi ile dizilemişlerdir. Tür içi ve türler arası dizi varyasyonunu DNA barkod sistemi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Dizi düzenlemesinden sonra, tür içi varyasyonu ya çok az ya da yok denecek kadar az, buna karşın SNP, indel, SSR uzunluklarına bağlı olarak türler arası varyasyonu her bir türün belirgin olarak tanımlanabilmesi için yeterli bulmuşlardır. Kısaca araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışmada analiz edilen dört ayçiçeği türünün her birinin doğru bir tanımlanması için *trnH-psbA* intergenic spacer bölgesindeki değişkenliği yeterli bulmuşlardır.

Taberlet ve ark. (2007) tarafından *trnL* (UAA) intronunun barkodlama doğrultusunda kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Onlar hem bütün bir intronun hem de intronun kısmi bir parçasının (P6 intron) kullanılabilirliğini kontrol etmişlerdir. Bu bölgenin çözünürlüğünün oldukça düşük olmasına rağmen, yüksek derecede korunmuş primerler sebebiyle çoğaltım kolaylığını ve büyük ölçüde degrede olmuş örneklerden çoğaltıma yardım eden çoğaltım sisteminin kuvvetliliğini kapsayan birçok avantaja sahip olduğunu bulmuşlardır.

Huang ve ark. (2007) Çin yer solucanları arasındaki farklılıkları çözmek için araç olarak Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 genindeki dizi çeşitliliğini ölçmüşlerdir. 6 cins ve 28 tür üyesi değerlendirilmiş ve türleri tüm şartlarda başarılı bir şekilde ayırt etmişlerdir. Tür içi dizi farklılığını %1'den az, türler arası farklılığın her koşulda %15'den fazla olduğunu bulmuşlardır. *Eisenia fetida* bireyleri arasındaki farklılığın çok yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (%7,8'e kadar), ancak bunun tanımlanmamış kardeş türler veya alt türler varlığını temsil edebileceğini savunmuşlardır. Araştırmacılar, DNA barkodunun yer solucanlarını ayırmada güçlü bir araç olduğunu ve klasik morfolojiye bütünleyici bir yarar sağladığı sonucuna varmışlardır.

Nelson ve ark. (2007) Avustralya'dan *Chrysomya* cinsine ait (*Diptera: Calliphoridae*) önemli 9 et sineği türünün tanımlanması için Sitokrom Oksidaz 1 DNA barkodlarının kullanılabilirliğini test etmişlerdir. 658 baz çifti uzunluğundaki COI geni 9 *Chrysoma* ve 3 *Calliphorid* dış grubunu temsil eden 56 örnekte dizilenmiştir. Nükleotid dizi farklılıkları 'Kimura- Two- Parameter Distance' modeli kullanılarak hesaplanmıştır ve

Neighbor Joining (NJ) analizleri türler arasında örneklerin farklılıklarının grafik olarak gösterimini sağlamak için yapılmıştır. Bütün türler NJ ağacında resiprokal olarak monofiletik çözümlenmiştir. Tür içi dizi farklılıkları %0,097 (%0-0,612 arasında sıralanır, standart hata %0,119), türler arası dizi farklılıkları ise %6,499 (%0,458-9,254 arasında sıralanır, standart hata %1,864) olarak bulunmuştur. Yapmış oldukları çalışmada bu sonuçlara dayanarak COI barkod tanımlama sisteminin Avustralya kıyılarındaki *Chrysomya* türlerinin tanımlanması için uygun olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca COI barkodu Avustralya *Chrysomya* türlerinin ayrılması için yeterli çözüm sağlamış olmasına rağmen bu çalışma ITS2 adlı nükleer genin de bazı koşullarda şüpheli örnek tanımlamasında ekstra bilgi sağladığını göstermiştir.

Kress ve Erickson (2007) kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri içeren barkod lokusu varsayılan 9 barkodun tekli veya çiftli halde filogenetik olarak farklı 48 cins kümesi karşısında (her cins için iki tür) evrimsel uygulamalarını ve dizi farklılığı derecelerini karşılaştırarak, evrensel bir barkod sistemi değerlendirmişlerdir. Tek lokus, cinslerin çiftler halinde olan türleri arasında %79'dan fazla ayırım yapamazken, kodlanmayan bölge *trnH-psbA* spacer *rbcl*'yi de içeren 3 kodlanan bölgelerden biriyle birleştiği zaman ayırım %88'e yükselmiştir. Silico denemelerinde gen bankasından DNA dizileri kullanarak bu lokusların bir alt kümesinin ayırıcı gücünü daha fazla değerlendirmek için yürütülmüştür. Bu denemeler daha önceki gözlemler gibi *rbcl* ile eşleşmiş *trnH-psbA* bölgesinin akraba türler arasında doğru tanımlamayı ve ayırımı yapabildiğini desteklemiştir. Sonuç olarak, kodlama yapmayan *trnH-psbA* bölgesi ve kodlama yapan *rbcl* gen kombinasyonunu gerekli evrenselliği ve tür ayırımı sağlayan iki lokuslu evrensel bitki lokusu olarak önermişlerdir.

Ekrem, Willassen ve Stur (2007) ısırmayan tatarcık sinekleri (*Diptera: Chironomidae*) ile yaptıkları bir çalışmada kısmi *cox1* geni dizilerinin barkod olarak kullanılabilme olasılığını araştırmışlardır. Başlıca *Micropsectra*, *Parapsectra* ve *Paratanytarsus* üzerinde odaklanarak *Cladotanytarsus*, *Micropsectra*, *Parapsectra* ve *Paratanytarsus*, *Rheotanytarsus*, *Tanytarsus* ve *Virgatanytarsus* cinsleri içinde yer alan 47 türün 97 örneğinden DNA izole etmişlerdir. Araştırma sonucunda, standard barkodlama primerleri ile farklı yaşam döngülerinden, farklı ekstraktlardan *cox1* geninin kolayca çoğaltılabildiğini, *cox1* kütüphanesinde mevcut olan barkodların tür tanımlamada mükemmel araçlar olabileceğini, eğer iyi eşleşen bir *cox1* dizisi kütüphane içinde mevcut değilse, bilinmeyen bir taksonun yaklaşık olarak tahmininin, *Tanytarsa* alt takımına doğru olmadığını göstermişlerdir.

Sass ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada 'Plant Working of the Barcoding of Life (CBoL)' tarafından önerilen kloroplast bölgeleri ve iki alternatif, kloroplast *psbA-trnH* spacer ve nükleer ribozomal internal transcribed spacer (nrITS) bölgelerinin, *Cycadales* üyeleri için eşsiz bir tanımlayıcı oluşturmada kullanılabilirliklerini test etmişlerdir. Çoğaltım kolaylığını, evrensel primerlerle dizi üretimini ve reaksiyon şartlarını, önerilen her bir yedi marker için belirlemişlerdir. Buna karşın önerilen hiçbir marker test edilen hiçbir tür için eşsiz bir tanımlayıcı sağlamamıştır. Dizileme zorlukları nr(ITS) için bir dezavantaj olarak kalsa da nr(ITS) değişkenliği bakımından en umut verici tanımlayıcı olarak belirlenmiştir.

Newmaster ve ark. (2007) yaptıkları araştırmada 6 kodlanan (Universal Plastid-UPA, *rpoB*, *rpoC1*, *accD*, *rbcL*, *matK*) ve bir kodlanmayan (*trnH-psbA*) kloroplast lokuslarının *Compsonera* cinsinde kullanılabilirliğini hem tek hem de çoklu bölge yöntemlerini kullanarak göreceli olarak belirlemeyi amaçlamışlardır. Test ettikleri 5 bölgenin (UPA, *rpoB*, *rpoC1*, *accD*, *rbcL*) türler karşısında değişken olmadığını, bölgelerden iki tanesinin (*matK*, *trnH-psbA*) önemli derecede varyasyon gösterdiğini ve hindistan cevizinde barkodlama çalışmalarında umut verici olduğunu göstermişlerdir. Kısmen değişken bölge *matK* ve biraz daha değişken bölge olan *trnH-psbA* kullanılarak meydana getirilmiş ikili gen yönteminin, örnek olarak denedikleri henüz evrimleşmiş *C. sprucei* ve *C. mexicana* türlerini de içeren bütün *Compsonuera* türleri arasında çözüm sağladığını göstermişlerdir.

Chase ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada, tüm kara bitkilerinin barkodlaması için standart protokol olarak plastid DNA'sının 3 bölgesini kullanmayı amaçlamışlardır. Aynı zamanda daha önceden avantajları ve dezavantajları tartışılmış, önerilmiş diğer markerleri de yeniden gözden geçirmişlerdir. Çalışmalarında plastid DNA'sındaki düşük varyasyon seviyeleri üç bölgeyi gerekli kılmıştır. Bu bölgeler; hayvanlardaki mitokondrial DNA kadar hızlı evrimleşebilen plastid olmayan bölgeler, kodlanan bölgeler ve kodlanmayan bölgelerdir. Chase ve ark. kara bitki barkodlaması için uygun markerler olarak 1) *rpoC1*, *rpoB* ve *mat K* veya 2) *rpoC1*, *matK*, *psbA-trnH* gibi üçlü bölge opsiyonlarını içeren iki bölge taslağı çizmişlerdir.

Morfolojik olarak birbirlerinden ayrılmaları zor olan diatomları tanımlamak oldukça zordur ve kriptik türler bu sebeple diatomlar içerisinde yaygındır. Biyoçeşitliliği ve biyocoğrafyası gibi tartışmalı konuları olan diatom türlerinin çözümlenmeye ihtiyacı vardır. Evans ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada *Sellaphora pupula* agg. morfotürü modeli dahilinde kriptik türleri ayırmak için ek birçok genin (*cox1*, *rbcL*, 18S ve ITS rDNA) etkinliğini değerlendirmişlerdir. *cox1* gen bölgesinin diatomlar için tanımlama

aracı olarak kullanılabilirliği ilk defa değerlendirilmiştir. *cox1* primerlerinin sıralanmasını *Sellaphora* ve çeşitli grup dışı taksonlarda test etmişlerdir. Diziler, 22'si *Sellaphora* taksonuna ait olan 34 izolat için ve *Pinnularia*, *Eutonia* ve *Tabularia* adlı 3 grup dışı diatom için sağlanmıştır. Tür içi farklılıklar 0-5 baz çifti arasında (%0,8), türlerarası farklılık seviyesini en az 18 baz çifti (%c.3) olarak bulmuşlardır. *cox1* divergansını genellikle *rbcL* divergansından çok daha fazla ve daima 18S rDNA'dan fazla değişken olarak tespit etmişlerdir. ITS rDNA dizilerini *cox1*'den daha değişken bulmuşlar ancak genom içi değişkenlikle ilgili bilinen bazı problemlerin onun tanımlamada kullanılmasına karşı bir engel olabileceğine dikkat çekmişlerdir. Daha fazla bilgi ve daha az dizileme çabası *cox1* dizisinin diatom tanımlamasında çok kullanışlı bir yardımcı olabileceği anlamına geliyordu. Aynı zamanda *Sellaphora* türleri arasında filogenetik ilişkileri tanımlamada *cox1* dizisinin kullanılabilirliğini değerlendirmişler ve *rbcL* ile karşılaştırmışlardır. Ağaç topolojilerini çok benzer bulmuşlar, buna rağmen *cox1* için destekleyici değerleri genellikle daha düşük bulmuşlardır.

648 bç uzunluğundaki Mitokondrial Sitokrom Oksidaz 1 geni (COI) hayvanlar için öz barkod bölgesidir, fakat bu barkod bölgesinin kullanılabilirliği mantarlarda test edilmemiştir. Seifert ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada COI dizileri içeren 38 fungal takson için COI geninde dizi farklılıklarının incelemesini başlatmışlardır. COI dizisinin tür tanımlamada etkili olduğu sonucuna varılması nedeniyle, COI bölgesinin 545 baz çiftlik bölgesi için primer dizayn etmişler ve *Penicillium* alt cinsinden 58 *Penicillium* türü ve 12 benzer türü de içine alan birçok suş için diziler meydana getirmişlerdir. Fungal mitokondrial genomun intron içerdiği yönünde yaygın literatür raporlarına rağmen Seifert ve ark. 370 *Penicillium* suşundan sadece 2 tanesinde intron saptamışlardır. 58 türün 38 örneğinde belirgin COI dizileriyle uyum sağlayan topluluklar oluşmuştur. COI dizi farklılıkları tür içinde ortalama olarak %0,06 olarak bulunmuştur ve internal transcribed spacer nrDNA veya β -tubulin dizileri (Ben A) için daha düşük değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Türler arasındaki COI dizi farklılıkları ise ortalama %5,6 olarak bulunmuştur ki bu değer internal transcribed bölge ile karşılaştırılabilir, ancak bulunan değer Ben A' dan elde edilen değere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (%14,4). En sondaki gen daha yüksek taksonomik çözüm sağlamış olmasına rağmen COI'in çoğaltımı ve sıraya dizilmesi daha kolay olmuştur. Araştırmacılar *Penicillium* üzerinde elde edilen sonuçların diğer birçok takson için örnek ispat etmesi halinde, COI dizisinin birçok takson için güvenilir olacağını söylemişlerdir.

Lahaye ve ark. (2008a) iki popüler biyoçeşitlilik noktasındaki (Orta Amerika ve Güney Afrika) yoğun tarla koleksiyonlarını ele alarak 1600'den fazla örnek kullanarak potansiyel 8 barkodu karşılaştırmışlardır. Daha önceki bitki çalışmalarına da giderek tür başına çok fazla katılımdan yararlanarak, türler arasında ve tür içindeki varyasyonlarda ne derecede DNA barkodlama bölgelerinin mevcut olduğunu değerlendirmişlerdir. Yeterli varyasyon oranı, kolay çoğaltım ve kolay dizilenme vermesi nedeniyle çiçekli bitkiler için *matK* genini evrensel DNA barkodu olarak tanımlamışlardır. Ek olarak 1000'den fazla Orta Amerika orkidesinin analiziyle, yalnızca *matK* ile yapılan DNA barkodlaması kriptik türleri açığa çıkarmış ve 'Convention on International Trade of Endangered Species (CITES)' ekinde listelenen türlerin tanımlamasında yarar sağlamıştır.

Ståhls ve Savolainen (2008) Kuzey Avrupa *Baetis vernus* taksonu (*Ephemeroptera*, *Baetidae*) gruplarının tür sınırlarının anlaşılması için kısmi mitokondrial COI fragmentlerini araştırmışlardır. Finlandiya'da mevcut olan bu türün örnekleri toplanmış ancak daha çok morfolojik ve taksonomik olarak karışıklığı belirgin olan türler üzerinde odaklanılmıştır. Sonuç olarak; *Baetis vernus* Kimmins ve *B. macani* Curtis türlerinin haplogruplarda tür içi doğrulanmamış divergensler %0,3- %0,4 arasında ve türler arası divergensin ise %13,1'den %16,5'e değişen değerlerde dizilenerek moleküler olarak belirgin fakat morfolojik olarak kriptik türleri içerdiğine güçlü bir kanıt göstermiştir. Bu bulgular sonucunda haploid dağılımları daha iyi anlamak için daha ileri taksonomik bilgilere ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır. Kısacası Ståhls ve Savolainen (2008) yapmış oldukları çalışmada morfolojik ve moleküler verilerin bütünleşmesinin önemini ve ek nükleer DNA dizi verilerinin kullanılmasının gerekliliğini vurgulamışlardır.

Adoxophyes orana kompleksinde tür tanımlaması üyeler arasındaki morfolojik benzerliklerden dolayı tarihsel olarak ortaya çıkmış bir probleme sahiptir. Morfolojik olarak benzerliklerden çok feromonal çalışmalar türler arasında ekolojik olarak ayrımlar için daha iyi bir belirleyici olarak önerilmiştir, moleküler bir kanıt henüz sağlanamamıştır. Park ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada diğer COI bölgesi (~ 940 bç) ve 18S rDNA (~1820 bç) bölgelerinde olduğu gibi ~660 bç COI barkodlama bölgesini Kore ve Japonya'daki türler için dizilemişlerdir. Kore'de *A. orana* olarak toplamış oldukları örneklerin Japonya'daki *A. orana fasciata* ile, Kore *A. honmai* türünün Japon *A. honmai* türü ile özdeş olduğunu belirlemişlerdir. Daha önceden Kore'de *A. orana* olarak tanımlanmış olan *Adoxophyes* türünün aslında *A. orana* olmadığını ve üçüncü belkide yeni bir tür olabileceğini, Japon *A. dubia* türünün Japonya ve Kore'de ki *A. honmai* ile özdeş

olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda türler arasında ve türlerin filogenetik ağaçları arasında 'p- distances' bu çalışmada sağlanmıştır.

Lahaye ve ark. (2008b) yapmış oldukları çalışmada Afrika'nın güneyinde yer alan Kruger National Park'ın Maputaland biyoçeşitlilik kısmını içeren yoğun tarla koleksiyonlarındaki ağaç ve çalılıklar üzerine odaklanmışlardır. Ağaçların ve çalılıkların seçiminden yola çıkarak, yüksek potansiyele sahip barkodları karşılaştırmışlardır. Bunlardan 6 tanesi 'Plant Working Group' tarafından, 2 tanesi ise Kress ve ark. (2007) tarafından önerilmiştir. Tür içi ve türler arası genetik farklılıkları, istatistiksel testleri, filogenetik ve coalescence analizlerini ölçebilmek için bir dizi metrik uygulamışlardır. Önceki bitki çalışmalarıyla karşılaştırmalar yaparak, tür başına çoklu lokus katılımlarından da yararlanarak tür içi ve türler arasında mevcut olan varyasyonları hangi DNA barkod bölgesinin sağladığını değerlendirmişlerdir. Plastid *matK* genini çiçekli bitkiler için evrensel barkod olarak tanımlamışlardır. Bu genin tekli lokus olarak da kullanılabileceğini, aynı zamanda *trnH-psbA* ile kombinasyon halinde kullanılması durumunda performansında bir miktar artma olduğunu önermişlerdir. Ek olarak, Ki- Joong Kim (University of Seoul) tarafından önerilen lokusların bir önceki barkodla kombinasyonunu değerlendirmişlerdir.

Ferri ve ark. 2008 yılında yapmış oldukları çalışmaya göre 30 farklı bitki türü için 2 farklı intergenic spacer bölgesi seçmişlerdir. *psbA-trnH* ve *trnL-trnF* intergenic spacer bölgelerine özgü evrensel primerleri kullanmışlardır. Her iki bölge için çoğaltım ve dizileme oldukça kolay olmuştur. Araştırmacılar BLAST programından yararlanarak (E-value, Maximum Identity value gibi değerleri ele alarak) iki gen birlikte analiz edilirse doğru tür tanımlama olasılığının oldukça açık olduğunu belirtmişlerdir.

Selvaraj ve ark. 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada *Zingiberaceae* familyasında *matK* geni ile çalışmışlardır. *matK* gen dizisini gen bankasından sağlamışlar ve analizler için kullanmışlardır. Araştırmacılar varyantların, parsimony bölgesinin patternlerin, transisyon/ transversiyon oranlarının ve filogeninin analizlerini yapmak istemişler ve aynı zamanda *matK* geninin DNA barkodlaması için kullanımıyla ilgili açıklama getirmişlerdir. Araştırmacılar *matK* geninin *Zingiberaceae* familyası için DNA barkodlaması için yeterli varyasyon içerdiğini ve DNA barkodlamada iyi bir aday olduğu sonucunu çıkartmışlardır. *Zingiberaceae* familya üyelerinin ayrılması için barkod olarak *matK* genine ait 115-130, 680-690 ve 1455-1465 nükleotid pozisyonlarından seçilebileceğini önermişlerdir.

Edwards ve ark. (2008) *Aspalathus* L. (*Fabaceae: Crotalarieae*) bitki genusu için üç potansiyel barkod bölgesini (nükleer ribozomal ITS ve plastid *psbA-trnH* ve *trnT-trnL* intergenic spacer) araştırmışlardır. *Aspalathus* filogenetik çalışmalarda düşük DNA dizi varyasyonu ortaya koyan büyük bir genustur (278 tür). *psbA-trnH* ve ITS bölgeleri için 51 türlü veri kümesinde sırasıyla dizilerin %45'i ve %16'sı en az bir başka türün dizisiyle benzerlik göstermiştir, iki türde ise her iki bölge kombine halde olduğunda bile ayırım gözlenememiştir. Tam tersi *trnT-trnL*, bu veri kümesindeki bütün türler arasında ayırım yapabilmıştır. Daha geniş, 82'den fazla türü kapsayan 5 pairwise karşılaştırılmasında 7 tür, iki bölge kombine hale getirildiğinde tanımlanamaz kalmıştır. Dizi verisi tarafından tanımlanamayan 5 çeşit türün 4'ü kalitatif ve kantitatif morfolojik verinin kombinasyon halinde kullanılmasıyla ayırt edilebilmiştir. Bu grupta barkodlamanın zorluğu her üç bölgede de tür içi varyasyon tarafından arttırılmıştır. *psbA-trnH* bölgesi durumunda, üç tür içi örneğin en az başka bir türle aynı diziye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bitki barkodlaması için şu an aday olarak gösterilen *psbA-trnH*, yapmış oldukları çalışmada en az ayırım yapabilen bölge olmuştur.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Bitkisel materyal olarak kullanılan Kaz Dağı endemik bitkilerinden *Digitalis trojana* Ivan. 06.08.2008 tarihinde Balıkesir- Kaz Dağı 39° 39' 52,9" N, 26° 56' 31,1" E koordinatlarından ve 807 metre rakımdan toplanmıştır (Şekil 3.1.). *Sideritis trojana* Bornm. aynı tarihte Balıkesir- Kaz Dağı 39° 41' 30,2" N, 26° 52' 30,1" E koordinatlarından ve 1694 metre rakımdan toplanmıştır (Şekil 3.2.). Kazdağları Kuzeybatı Anadolu'da yer almakta olup Marmara ve Ege bölgelerinin doğal sınırını oluşturmaktadır. Ayrıca bu dağlar Avrupa- Sibiryaya, Akdeniz ve İran-Turan flora bölgelerinin de kesişim alanında yer almaktadır. En yüksek noktası 1774 m olan dağda büyük oranda paleozoik şistler yaygınken zirve kısımlarında kristalize kalkerler bulunmaktadır. Bu dağdaki endemiklerin bir çoğu Kazdağları'nın izole bir masif olmasından dolayı sadece bu dağa özgü ve dar yayılışlıdır (Özel ve Gemici, 2001).

DNA barkodlaması çalışmasında *Digitalis trojana* ve *Sideritis trojana* türlerine ait dizilerle kullanılmak üzere gen bankasından toplam 44 türe ait dizi alınmıştır. *trnH-psbA* lokusuyla çalışılmış *D. trojana* türüne ait dizi ile birlikte kullanılmak üzere 5 türe ait dizi (dizilerin hepsi *Plantaginaceae* familyası türlerine aittir, aksesyon numaraları: AF531772.1, AJ429349.1, AJ429346.1, AF052002.1, AF375185.1), *matK* lokusuyla çalışılmış *D. trojana* türüne ait dizi ile birlikte kullanılmak üzere 5 türe ait dizi (dizilerin hepsi *Scrophulariaceae* familyası türlerine aittir, aksesyon numaraları: AF531772.1, AJ429349.1, AJ429346.1, AF052002.1, AF375185.1), *trnH-psbA* lokusuyla çalışılmış *S. trojana* türüne ait dizi ile birlikte kullanılmak üzere 5 türe ait dizi (dizilerin hepsi *Lamiaceae* familyası türlerine aittir, aksesyon numaraları: AY792671.1, AY792670.1, EU590862.1, EU590859.1, EU590864.1), *matK* lokusuyla çalışılmış *S. trojana* türüne ait dizi ile birlikte kullanılmak üzere 28 türe ait dizi (dizilerin hepsi *Lamiaceae* familyası türlerine aittir, aksesyon numaraları: AB284176.1, AB284182.1, AB284177.1, AB284175.1, AB284180.1, AB284179.1, AF315305.1, AB284178.1, AF315298.1, AF315297.1, AF477756.1, AF315296.1, AF315300.1, AF315294.1, AF315295.1, AF336235.1, AF477758.1, EF395812.1, EF395811.1, EF395815.1, EF395814.1, EF395813.1, EF395816.1, EF395810.1, AJ429332.1, AF531780.1, AF477761.1, AF315304.1) gen bankasından alınmıştır.



Şekil 3.1. *Digitalis trojana* Ivan. (bitki, Balıkesir- Kaz Dağları'ndan toplanmıştır. Bitkinin toplandığı koordinatlar: 39° 39' 52,9" N, 26° 56' 31,1" E, Rakım 807 metre).



Şekil 3.2. *Sideritis trojana* Bornm. (bitki, Balıkesir- Kaz Dağları'ndan toplanmıştır. Bitkinin toplandığı koordinatlar: 39° 41' 30,2" N, 26° 52' 30,1" E, Rakım 1694 metre).

Bitkisel materyaller (*Digitalis trojana* ve *Sideritis trojana*) Türkiye B1 Balıkesir Çanakkale Kaz Dağ'ında toplandıktan sonra bitkilerin yaprak kısımları Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Moleküler Biyoloji laboratuvarında mikrosantrifüj tüplerine konulmuş ve mikrosantrifüj tüplerin kapağına delik açılarak sıvı azot içerisine aktarılmış ve dondurulmuştur. Aristotle Üniversitesi'ne götürülmek üzere -80°C'da muhafaza edilmiştir. Ayrıca Aristotle Üniversitesi'ne *Digitalis trojana* ve *Sideritis trojana* türlerine ait taze örnekler de götürülmüştür. DNA barkodlaması çalışması için taze örnekler kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

DNA barkodlama yöntemi genel olarak 7 basamağı içermektedir.

- 1) Genomik DNA Özütünün Eldesi
- 2) DNA Çöktürülmesi
- 3) Elektroforez
- 4) PCR
- 5) PCR Ürününün Elektroforezi
- 6) PCR Ürününün Dizi Analizi
- 7) Biyoinformatik

3.2.1. Genomik DNA Ayrıştırılması

a. Bitkisel materyaller sıvı azot içerisinde öğütülmüştür ve mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır.

b. Her bir bitki için 400 µl olacak şekilde özüt tamponu hazırlanmıştır. (özüt tampon içeriği: 200 mM Tris-Cl pH: 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH: 8, %0,5 SDS, steril su) Her bir mikrosantrifüj tüp içerisindeki öğütülmüş bitkisel materyal üzerine 400 µl özüt tampon eklenmiştir. 10-15 saniye boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Özüt tamponunun hazırlanışı ekler bölümünde verilmiştir (Ek 1).

c. Karıştırma işlemi sonrasında 13200 rpm'de 5 dk santrifüj uygulanmıştır.

d. 300 µl dökelti kısım alınıp yeni, steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve üzerine 300 µl izo- propanol eklenmiştir (vorteks kullanılmadan karıştırma işlemi yapılmıştır).

e. 300 µl dökelti ve 300 µl izo- propanol içeren karışımın santrifüjü 13200 rpm'de 5 dk olarak uygulanmıştır.

f. Dökelti kısım atılarak, çökelti üzerine %70'lik etanol eklenmiştir ve tekrar 13200 rpm'de 5 dk santrifüj uygulanmıştır.

g. Dökelti kısım atılarak, çökelti 1 saat boyunca Hava Üfleme Kabin (Laminar Air Flow) içerisinde kurumaya bırakılmıştır.

h. Dökeltinin kurumasının ardından her bir mikrosantrifüj tüpünün içerisine 100 µl 10:1 Tris- EDTA (1 ml 1M Tris- Cl pH: 8,0 ve 0,2 ml 0,5 M EDTA karıştırılarak son hacim dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır) konulmuştur.

i. DNA'nın daha iyi çözülebilmesi için 10:1 Tris- EDTA (TE) çözeltisi içindeki çökelti 1 gece boyunca +4°C'da bekletilmiştir (tercihen +20°C'da 1 saat bekletilebilir) (Weigel ve Glazebrook, 2002).

Genomik DNA ayrıştırılması için kullanılan stok çözeltilerin hazırlanışı ekler bölümünde verilmiştir (Ek 2).

3.2.2. DNA'nın Çöktürülmesi

Genomik DNA ayrıştırılmasını takiben PCR'da daha iyi sonuçlar almak için DNA'yı sulu çözeltilerden, RNA ve proteinlerden arındırmak amacıyla presipitasyon işlemi yapılmıştır.

a. +4°C'dan alınan mikrosantrifüj tüplerinin içine son derişim 100- 200 µg/ml olacak şekilde RNaz eklenmiş ve 37°C'da 2 saat su banyosunda bekletilmiştir.

b. Fenol:kloroform (25:24 v/v): Bu aşamada eklenen fenol- kloroform miktarı başlangıç örnek miktarıyla eşit olmalıdır (+4°C'dan alınan mikrosantrifüj tüplerinin içerisinde 100 µl örnek olduğu için 100 µl fenol:kloroform (25:24 v/v) eklenmiştir). 30 saniye boyunca çok iyi bir şekilde vorteks ile karıştırılmıştır. Vorteks işlemi ardından 13200 rpm'de 15 dk santrifüj uygulanmıştır.

c. Dökelti kısım steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Aktarılan dökelti kısmın 2,5 katı kadar saf etanol eklenmiştir. Ve aktarılan dökelti kısmın 1/10'u kadar 3 M sodyum asetat (pH: 5,2) eklenmiştir. Mikrosantrifüj tüp içerisindeki karışımın hafifçe elle karışması sağlanmış ve -20°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir.

d. -20°C'da 1 gece bekletilen örnekler dikkatli bir şekilde dondurucudan alınarak 13200 rpm'de 15 dk santrifüj uygulanmıştır.

e. Dökelti kısım atılmıştır ve çökelti üzerine %70'lik etanol çözeltisinden 600 µl eklenmiştir. 13200 rpm'de 5 dk santrifüj uygulanmıştır.

f. Dökelti kısım tekrar atılmıştır ve çökelti 1 saat boyunca Hava Üfleme Kabin (Laminar Air Flow) içerisinde kurumaya bırakılmıştır.

g. Çökeltinin kurumasının ardından her bir mikrosantrifüj tüpü içerisine 100 µl Tris- EDTA (TE 10:1) konulmuştur.

h. DNA'nın daha iyi çözülebilmesi için 10:1 Tris- EDTA (TE) çözeltisi içindeki çökelti 1 gece boyunca +4°C' da bekletilmiştir (tercihen +20°C' da 1 saat bekletilebilir) (Sambrook ve Russell, 2001'den uyarlanmıştır).

DNA çöktürülmesi için kullanılan stok çözeltilerin hazırlanışı ekler bölümünde verilmiştir (Ek 3).

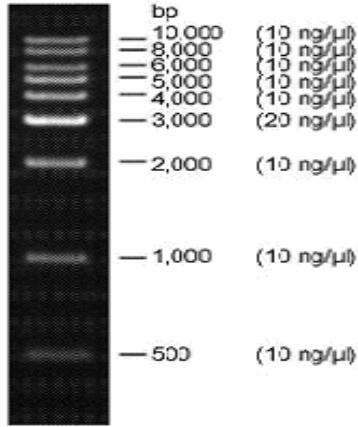
3.2.3. Elektroforez

Agaroz jelin hazırlanması Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Elektroforezde kullanılan stok çözeltilerin, hazırlanışı ekler bölümünde verilmiştir (Ek 4, Ek 5). (1XTAE tamponu eldesi için 50XTAE tamponundan 20 ml alınarak 980 ml dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 50XTAE tamponunun saklama koşulları oda sıcaklığı, 6X yükleme tamponunun saklama koşulları -20°C).

Çizelge 3.1. Agaroz jelin hazırlanması

Kimyasal	Alınan miktar	Çözeltinin son hacmi
Agaroz (Sigma A5093)	0,8 gr	
1XTAE	100 ml	
Ethidium Bromür (10mg/ml)	5 µl	
		100 ml

Örneklerin yükleme için hazırlanması için 5 µl örnek 1,5 µl 6X yükleme tamponu (Bromophenol Blue) karıştırılmıştır. 1 kb DNA marker (Genscript, Katalog numarası: M1010) jele yüklenmiştir. 100 volt 95 miliamper akımda 40 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittikten UV ışığında gözlenmiş, fotoğrafları çekilmiştir.



0.8% agarose gel

Şekil 3.3. Kullanılan DNA Marker(Genscript, Katalog numarası: M1010).

3.2.4. PCR

3.2.4.1. PCR ile DNA Bölgelerinin Çoğaltılması İşlemi

PCR Takara firmasına ait PCR kitiyle (Katalog numarası: RR001A) gerçekleştirilmiştir. PCR karışımları, bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.2’de her verilmiştir. PCR reaksiyon kurulumu buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Primerler, protein kodlama yapan *matK* (maturase K) genine ve kodlama yapmayan *trnH-psbA* (intergenic spacer) bölgesine göre dizayn ettirilmiştir. *matK* genine göre dizayn edilmiş 390F ve 1326 R primerleri (Cuénoud ve ark., 2002) ve *trnH-psbA* (intergenic spacer) bölgesine göre dizayn edilmiş *trnHf* ve *psbA3’f* primerleri kullanılmıştır (Kress ve ark., 2005). *matK* (maturase K) genine ve *trnH-psbA* (intergenic spacer) bölgesine ait primerlerin baz dizilişleri Çizelge 3.3.’de gösterilmiştir. PCR reaksiyon segmentleri ve döngü sayısı Çizelge 3.4.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR karışımları, bileşenleri ve miktarları

PCR Karışımları	Bileşen	Miktar (µl)
Karışım I	10X Ex Taq Buffer (MgCl ₂ içeriyor)	2 µl
	dNTP mix (2,5 mM each)	2 µl
	Primer 1 (final konsantrasyon 6pmol)	1 µl
	Primer 2 (final konsantrasyon 6pmol)	1 µl
	Distile su	8 µl
	Kalıp DNA	1 µl
Karışım II (HOT MIX)	10X Ex Taq Buffer (MgCl ₂ içeriyor)	0,5 µl
	Steril su	9,4 µl
	TaKaRa Ex Taq TM (5 units/µl)	0,1 µl
Toplam Hacim		25 µl

Çizelge 3.3. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

<i>Primer</i>	<i>Baz dizilişi</i>
(matK) 390F düz	5’- CGATCTATTCATTCAATATTTTC- 3’
(matK) 1326R ters	5’- TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT- 3’
(trnH- psbA) psbA’f forward	5’- GTTATGCATGAACGTAATGCTC- 3’
(trnH- psbA) trnHf reverse	5’- CGCGCATGGTGGATTCACAATCC- 3’

Çizelge 3.4. PCR segmentleri ve döngü sayısı

Segment	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	2	1
Denatürasyon	94	0,5	
Annealing (primerlerin bağlanması)	53	0,5	30
Uzama	72	2	
Son uzama	72	4	1

3.2.5. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR sonucu elde edilen PCR ürününden 5 µl alınmış ve 1,5 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak %0,8 TAE agaroz jelde 100 volt, 95 miliamper akımda 40 dakika yürütülmüştür (Agaroz jel 0,5 µl/100ml Ethidium Bromür içermektedir). PCR ürününün boyutunun ölçülmesi için 1 kb DNA marker (Genscript, Katalog numarası: M101O) jele yüklenmiştir.

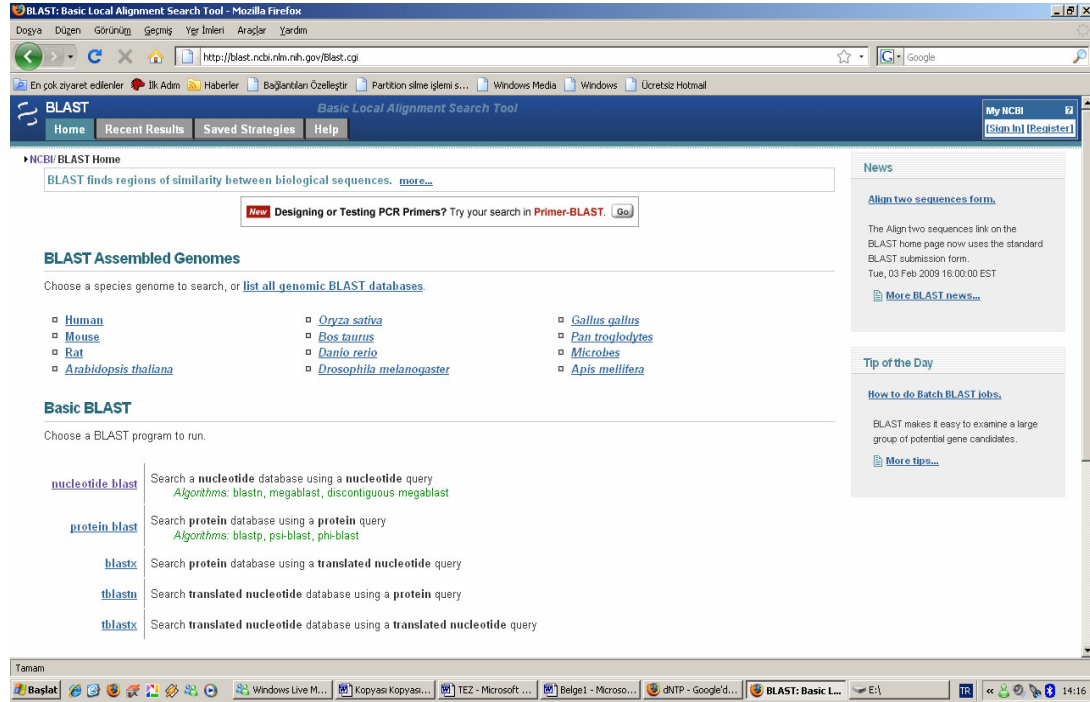
3.2.6. PCR Ürünlerinin Dizi Analizi

İlgili bantın varlığının tespit edilmesi sonucu, bantı veren PCR ürününden 10 µl alınmıştır. 10 µl PCR ürünü 10 µl steril su ile steril PCR tüpü içerisinde seyreltilmiştir. PCR ürünlerinin dizi analizi MACROGEN firması tarafından yapılmıştır (Sekans, *matK* primelerini içeren türlerde sadece *matK390F* primeri, *trnH-psbA* primerlerini içeren türlerde *psbA3'*f primeri kullanılarak yapılmıştır).

3.2.7. Biyoinformatik

3.2.7.1. BLAST

The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı diziler arasındaki bölgesel benzerlik bölgelerini bulur. Program nükleotid veya protein dizilerini dizi veri tabanları ile karşılaştırır ve karşılaştırılan dizi ile istatistiksel değerleri hesaplar. BLAST gene, genin familyalarını tanımlamada yardım ettiği gibi diziler arasındaki fonksiyonel ve evrimsel ilişkileri anlamak için de kullanılabilir. *Digitalis trojana* ve *Sideritis trojana* türlerinin dizileri için BLAST programı kullanılırken NCBI anasayfası kullanılmıştır (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).



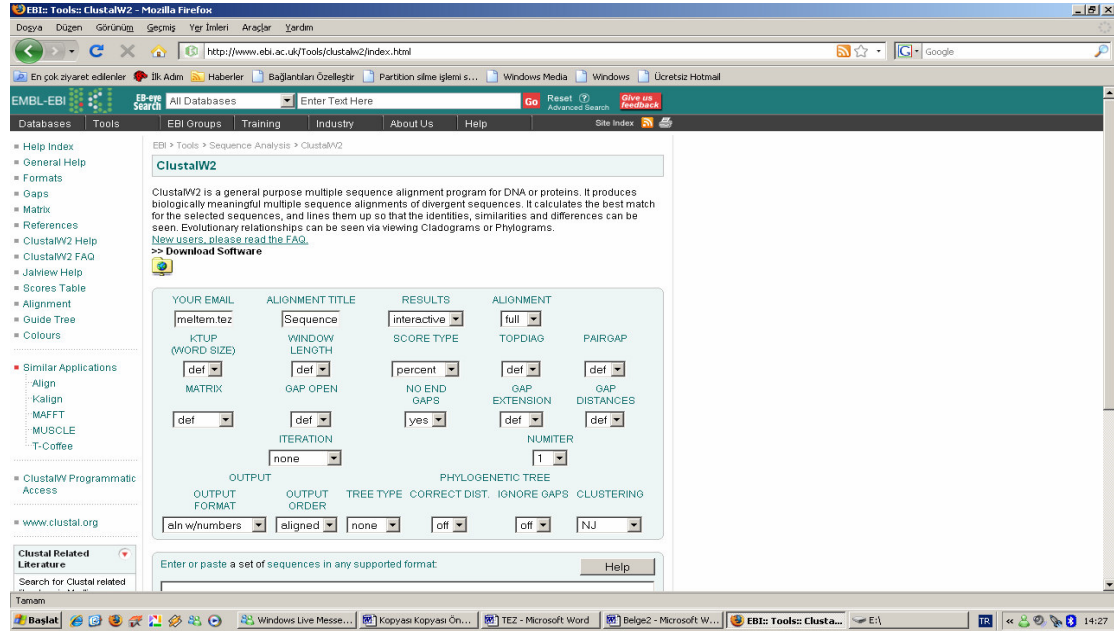
Şekil 3.4. NCBI BLAST programı anasayfası (www.ncbi.nlm.nih.-gov/BLAST/).

Digitalis trojana ve *Sideritis trojana* türlerine ait diziler BLAST programına ayrı ayrı konulmuştur. BLAST programından elde edilen sonuçlara göre *Digitalis trojana* ve *Sideritis trojana* türleri ile aynı familyaya ait olan ve yakından dizi benzerliği gösteren türlere ait diziler CLUSTALW2 Multiple Sequence Alignment ve T-COFFEE Multiple Sequence Alignment programlarında kullanılmak üzere seçilmiştir ve CLUSTALW2 ve T-COFFEE programlarında kullanılmak üzere BLAST programında FASTA formatına çevrilmiştir. Türler ait diziler seçilirken oryantasyonları kontrol edilmiştir. *Digitalis trojana* ve *Sideritis trojana* türlerine ait dizilere göre ters oryantasyona sahip olan dizilerin oryantasyonları yine BLAST programında 'Reverse Complement' seçeneği tıklanarak aynı oryantasyona sahip olacak şekilde düzenlenmiştir.

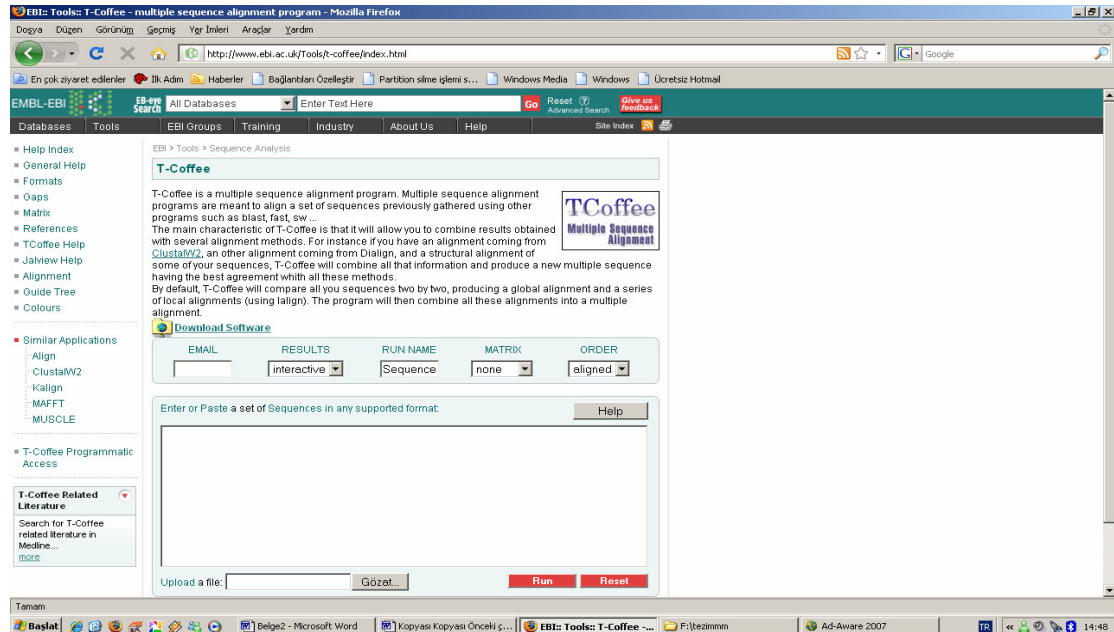
3.2.7.2. CLUSTALW2 ve T-COFFEE

CLUSTALW2 (Larkin ve ark., 2007, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) ve T-COFFEE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>) 'Multiple Sequence Alignment (Çoklu Dizi Sıralama)' programları birçok dizinin birlikte sıralanması (alignment) için kullanılan benzer programlardır. Programlar, dizilere ait korunmuş dizi bölgelerini

sağlamaktadır. Aynı zamanda filogenetik ağaç eldesi için de kullanılabilirler. Her iki program da nükleotid ve protein dizilerini sıralayabilmektedir.



Şekil 3.5. ClustalW2 Multiple Sequence Alignment Programı.

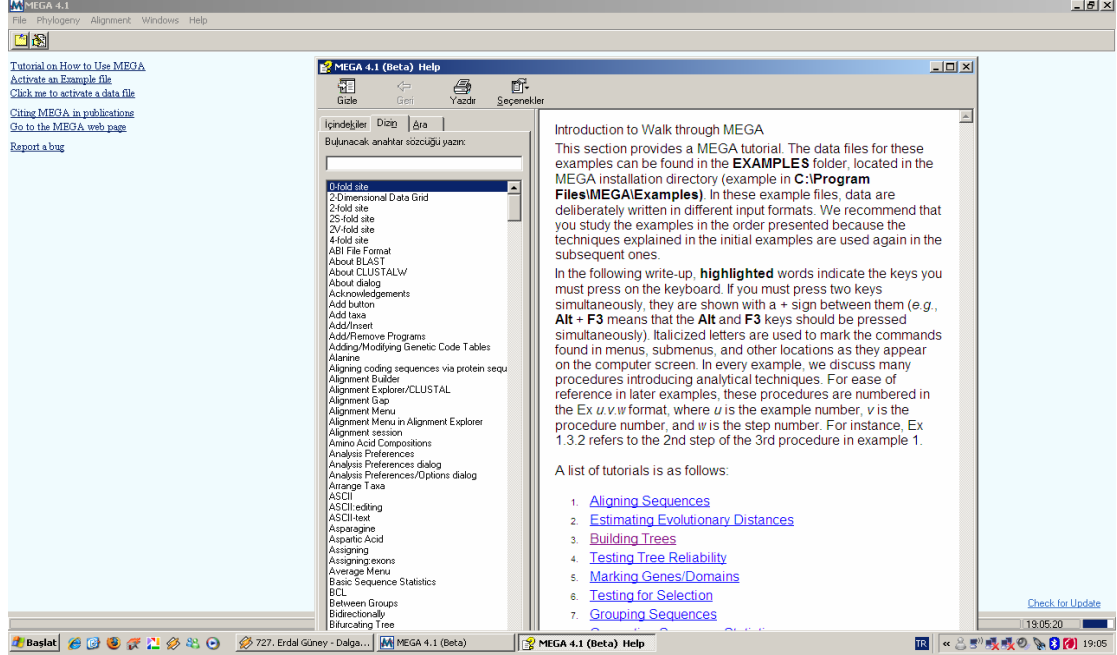


Şekil 3.6. T-COFFEE Multiple Sequence Alignment Programı.

Digitalis trojana ve *Sideritis trojana* türlerine ait diziler BLAST programına ayrı ayrı konulmuştur ve BLAST programından seçilen dizilerle beraber sıralanmaları için CLUSTALW2 ve T-COFFEE ‘Multiple Sequence Alignment’ programlarına FASTA formatında konulmuştur. Sıralama programları kullanılmadan önce BLAST programından alınan dizilerde ve *Digitalis trojana* ve *Sideritis trojana* türlerine ait dizilerde birtakım işlemler yapılmıştır. *trnH-psbA* primerleri ile çalışılmış *D. trojana* ve *S. trojana* dizileri ile CLUSTALW2 ve T-COFFEE programlarında kullanılmak üzere BLAST programından *trnH-psbA* gen bölgesini tamamıyla içeren türlere ait diziler alınmıştır. *D. trojana* ve *S. trojana* türlerine ait diziler içerisinde *trnHf* primerinin tamamlayıcı dizisi bulunmuş (*trnHf* primerinin tamamlayıcı dizisi BLAST programından alınan türlerde de aranmıştır), bu dizi ve bu diziden sonra gelen diziler elimine edilmiştir. Dizilerin elimine edilmesinin ardından *trnH-psbA* primerleri ile çalışılmış *D. trojana* ve BLAST programından alınmış *trnH-psbA* primerleri ile çalışılmış *Plantaginaceae* familyası türlerine ait diziler CLUSTALW2 programına konulmuş ve elde edilen sonuçlar ‘aln.’ dosyası şeklinde kaydedilmiştir. *trnH-psbA* primerleri ile çalışılmış *S. trojana* ve BLAST programından alınmış *trnH-psbA* primerleri ile çalışılmış *Lamiaceae* familyasına ait türlerin dizileri CLUSTALW2 ve T-COFFEE programlarına konulmuş ve CLUSTALW2 programından elde edilen sonuçlar ‘aln.’ dosyası şeklinde, T-COFFEE programından elde edilen sonuçlar ‘.phylip’ dosyası şeklinde kaydedilmiştir. *matK* primerleri ile çalışılmış *D. trojana*, *S. trojana* dizileri ve BLAST programından alınmış *Lamiaceae* ve *Scrophulariaceae* familyalarına ait türlerin dizileri içerisinde *matK* primerleri aranmış ve ilgili diziler elimine edilmiştir. Hem *Scrophulariaceae* hem de *Lamiaceae* türlerine ait dizilerin içerisinde *matK* 390F primerine ait dizi bulunmuş, bu dizi ile beraber bu diziden önceki diziler ve *matK* 1326F primerinin tamamlayıcı dizisi bulunmuş, bu dizi ile bu diziden sonraki diziler elimine edilmiştir (*D. trojana* ve *S. trojana* türlerine ait diziler sadece 1326F primerinin tamamlayıcı dizisini içermektedir) ve böylelikle istenilen bölgeler elde edilmiştir. Dizilerdeki düzenlemeler tamamlandıktan sonra *Lamiaceae* türlerine ait diziler ve *Scrophulariaceae* türlerine ait diziler ayrı ayrı CLUSTALW2 programına konulmuş ve CLUSTALW2 programından elde edilen sonuçlar ‘aln.’ dosyası şeklinde kaydedilmiştir.

3.2.7.3. MEGA 4.1 (BETA)

Mega 4.1, otodizileycilerden DNA dizisinin eldesi için olanakların mevcut olması, web tabanlı çıkarılması, otomatik ve manuel dizi dizilenmesi, evrimsel mesafelerin tahmin edilmesi, dizi sıralarının analizlemesi, filogenetik ağaçların anlaşılması ve ortaya çıkarılması ve evrimsel hipotezlerin test edilmesi üzerinde genişletilmiştir (Tamura ve ark., 2007).



Şekil 3.7. MEGA 4.1 (BETA) biyoinformatik programı.

Mega 4.1 (BETA) versiyonu DNA barkod temelli ağaçların elde edilmesi ve elde edilen ağacın klasik taksonomi ile ne kadar uyum içinde olduğunun gözlemlenmesi için kullanılmıştır. Mega 4 versiyonu kullanılırken CLUSTALW2 programından elde edilen ve uzantısı '.aln' dosyası olarak kaydedilen dizilerin sıralama sonuçları Wordpad programı ile birlikte açılmış, korunmuş dizileri ifade eden yıldızlar silinmiş, dosya tekrar uzantısı '.aln' olacak şekilde kaydedilmiş ve dosya MEGA formatına çevrilmiştir, uzantısı '.meg' olacak şekilde kaydedilmiştir. T-COFFEE programından elde edilen ve uzantısı '.phylip' olarak kaydedilmiş sonuçlar herhangi bir işlem yapılmadan direkt MEGA formatına çevrilmiştir ve uzantısı '.meg' olacak şekilde kaydedilmiştir. Uzantısı '.meg' olarak kaydedilmiş dosyalar MEGA 4 programı tarafından açılmıştır ve program tarafından yöneltilen sorulara ilgili gen bölgesine göre ilgili alternatif tıklanmış, genetik kodun seçilmesi seçenekleri

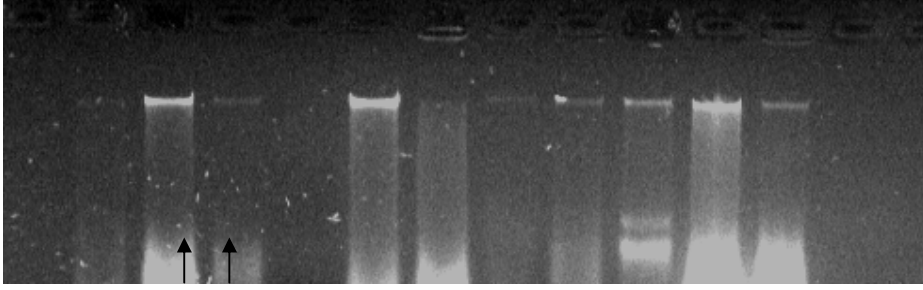
arasından ‘Plant Plastid’ seçilmiştir ve filogeni kurulmasına geçilmiştir. DNA barkod temelli ağacın eldesi için Neighbor joining metodu kullanılmış ve elde edilen filogeninin test edilmesi için Bootstrap seçilmiş ve 1000 replikasyon yapılmıştır. Gaps/Missing Data seçeneğinde Pairwise Deletion seçilmiştir (*trnH- psbA* lokusu içeren türlere ait diziler için Complete Deletion alternatifi de kullanılmıştır). *matK* lokusu içeren türlere ait dizilerin filogenisinin kurulmasında kodon pozisyonu olarak 1st+2nd+3rd+Noncoding alternatifi seçilmiştir. Substitution Model olarak hem *matK* lokusu içeren türlere ait dizilerin hem de *trnH- psbA* lokusu içeren türlere ait dizilerin filogenisinin kurulmasında Kimura 2-Parameter esas alınmıştır ve ilgili DNA barkod temelli ağaç elde edilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

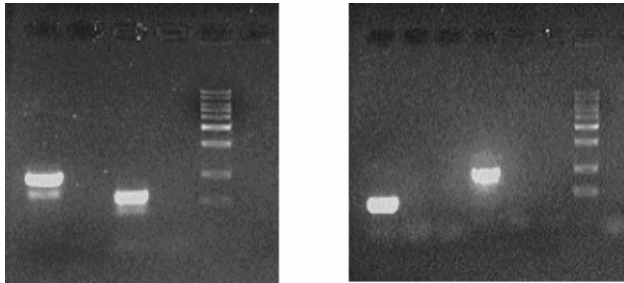
4.1.1. *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* Türlerinin DNA Özütlemesi ve DNA Çöktürülmesi Bulgularına İlişkin Elektroforez Görüntüleri



Şekil 4.1. *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* türlerinin DNA özütlemesi ve DNA çöktürülmesi bulguları.

3. kuyucuktaki bant *S. trojana* türüne, 4. kuyucuktaki bant *D. trojana* türüne aittir. *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* türlerinin DNA özütlemesi ve DNA çöktürülmesi işlemini takiben DNA kalitesinin ve miktarının gözlemlenebilmesi için yapılan elektroforez sonucunda edinilen görüntü doğrultusunda, *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* türlerine ait elde edilen bantların araştırmanın devamı için yeterli miktar ve kalitede DNA içerdiği gözlemlenmiştir.

4.1.2. *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* Türlerinin PCR Bulgularına İlişkin Elektroforez Görüntüleri



Şekil 4.2. *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* türlerinin PCR bulguları.

Şekil 4.2. içerisinde solda yer alan resimdeki görüntüye ait bantlar *S. trojana* türüne ait PCR bulgularıdır. İlk kuyucuktaki bant *matK* primerleri içeren *S. trojana* türüne, 4. kuyucuktaki bant ise *trnH- psbA* primerleri içeren *S. trojana* türüne aittir. Sağda yer alan resimdeki görüntüye ait bantlar *D. trojana* türüne ait PCR bulgularıdır. İlk kuyucuktaki bant *trnH- psbA* primerleri içeren *D. trojana* türüne aittir. 4. kuyucuktaki bant ise *matK* primerleri içeren *D. trojana* türüne aittir.

matK primerleri içeren *S. trojana* türüne ait PCR ürün boyutu 920 bp, *trnH- psbA* primerleri içeren *S. trojana* türüne ait PCR ürün boyutu 590 bp' dir. *matK* primerleri içeren *D. trojana* türüne ait PCR ürün boyutu 950 bp, *trnH- psbA* primerleri içeren *D. trojana* türüne ait PCR ürün boyutu 400 bp' dir (1 kb boyutunda DNA marker kullanılmıştır).

Sideritis trojana ve *Digitalis trojana* türlerinin PCR bulguları doğrultusunda *trnH- psbA* primerlerini içeren *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* türlerine ait bantlarda dimerizasyona rastlanırken, *matK* primerlerini içeren *Sideritis trojana* ve *Digitalis trojana* türlerine ait bantlarda dimerizasyon gözlemlenmemiştir.

4.1.3. *Sideritis trojana* (*matK* ve *trnH- psbA* Lokuslarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi)

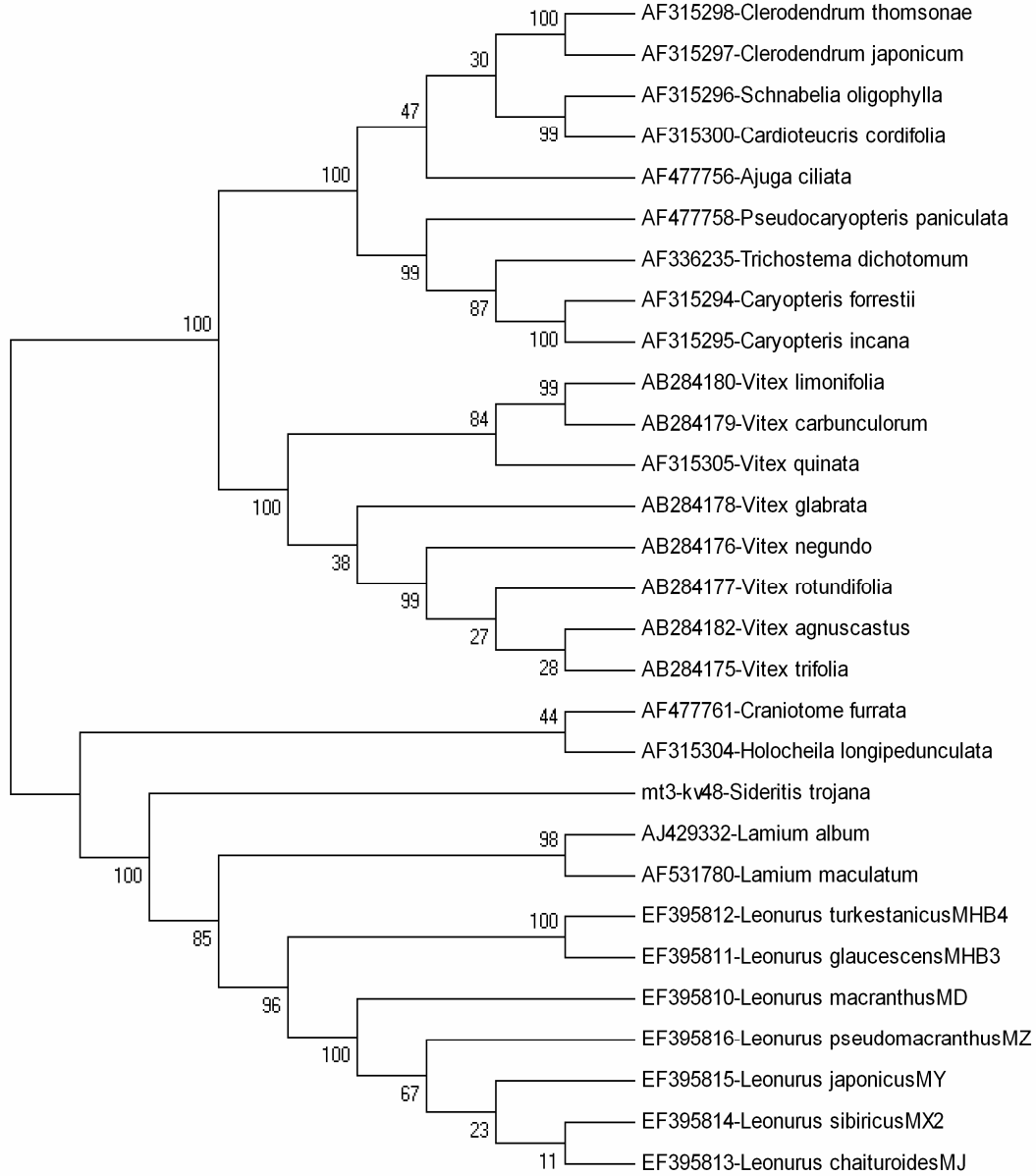
4.1.3.1. *matK* Lokusu

S. trojana türü için *matK* gen bölgesinin çoğaltımı kolaylıkla sağlanmıştır. MACROGEN firması tarafından dizilenen *matK* genine ait primerleri içeren *S. trojana* PCR ürünü 908 baz çiftidir. *Sideritis trojana* türüne ait dizi BLAST programına konulmuş ve benzerlik oranı en yüksek olan türlerin %93 Maximum Identity Rate, Maximum Score 1306, Query Coverage %98, E- value 0,0 değerleriyle *Leonurus turkestanicus* izolat MHB4 (Aksesyon Numarası: EF 395812.1) ve *Leonurus glaucescens* izolat MHB3 (Aksesyon Numarası: EF 395811.1) türleri olduğu gözlemlenmiştir. Programdan yola çıkarak *Sideritis trojana* dizisiyle benzerlik karşılaştırılması yapılmış 100 türe ait BLAST sonucundan *Lamiaceae* familyasına ait türlerin dizileri seçilmiştir.

Dizilerin sıralanması (Multiple Sequence Alignment), *S. trojana* türü de dahil *Lamiaceae* familyasına ait toplam 29 tür için CLUSTALW2 programı kullanılarak yapılmıştır ve dizilerin sıralanmasında herhangi bir problemle karşılaşmamıştır.

29 dizinin CLUSTALW2 programında sıralanması (Multiple Sequence Alignment) ile elde edilen sonuçlara ait dosya, uzantısı '.aln' olacak şekilde kaydedilmiş ve DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için MEGA 4.1 programı ile birlikte açılmıştır. DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için Neighbor Joining metodu ve Kimura 2-

Parametresi kullanılmıştır. Kullanılan yöntem ve alternatifler doğrultusunda ağacın eldesinde bir sorun yaşanmamıştır (Şekil 4.3.). (DNA barkod temelli ağacın eldesiyle ilgili bilgi: No. of Taxa: 29, Data Type: Nucleotide (Coding), Analysis: Phylogeny Reconstruction, Tree Inference- Method: Neighbor- joining, Phylogeny Test and options: Bootstrap (1000 replicates; seed= 64238), Include Sites- Gaps/Missing Data: Pairwise Deletion, Codon Positions: 1st+2nd+3rd+Noncoding, Substitution Model- Model: Nucleotide: Kimura 2- parameter, Substitutions to Include: d: Transitions + Transversions, Pattern among Lineages: Same (Homogeneous), Rates among Sites: Uniform rates, No. of Sites: 907, No of Bootstrap Reps: 1000).



Şekil 4.3. *Lamiaceae* familyasına ait *matK* lokusu içeren 29 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.

DNA barkod temelli ağacın çıkarımına bakılırsa, *S. trojana* türü AJ429332, AF531780, EF395812, EF395811, EF395810, EF395816, EF395815, EF395814, EF395813, AF477761 aksiyon numaralı türlere oldukça yakın bulunmuştur. Bulgular klasik taksonomi ile karşılaştırıldığında *Sideritis*, *Lamium*, *Leonurus*, *Craniotome* cinslerine dahil türler *Lamioideae* subfamilyası adı altında sınıflandırılmaktadır. Ağaca bakıldığında *Lamium* cinsine ait *Lamium* türleri aynı dallanma altında, *Leonurus* cinsine ait

Leonurus türleri birbirleriyle yakınlığın derecesini belirtecek şekilde bir sonraki dallanma altında toplanmıştır. Ağacın geneline bakıldığında *Viticoideae* subfamilyasına ait *Vitex* cinsine ait *Vitex* türleri aynı dallanma altında, *Teucroideae* subfamilyasına ait *Clerodendrum* , *Schnabelia*, *Cardioteucris*, *Ajuga*, *Pseudocaryopteris*, *Trichostema*, *Caryopteris* cinslerine ait türler aynı dallanma altında toplanmıştır. Yine aynı şekilde aynı cinse ait olan türler program tarafından aynı dal altına alınmıştır (örneğin *Clerodendrum* cinsine ait olan türler birlikte, *Caryopteris* cinsine ait olan türler birlikte dallanmıştır). Program tarafından *Lamioideae* subfamilyası içinde yer alan türlerin bulunduğu dallanma altında sınıflandırılmış *Holocheila longipedunculata* türünün, klasik taksonomik bilgilere göre *Lamiaceae* familyası içerisinde yeri belirgin değildir (DNA barkod temelli ağaç ile elde edilen sınıflandırmanın, klasik taksonomik sınıflandırma ile karşılaştırılması BLAST programında yer alan türlere ait klasik taksonomik sınıflandırma bilgileri temel alınarak yapılmıştır). Ayrıca, Olmstead (2005) tarafından “Synoptical Classification of *Lamiales*” adı altında yapılan sınıflandırma temel alındığında *Sideritis*, *Lamium*, *Leonurus*, *Craniotome* cinsleri “Marrubiina” adı altında sınıflandırılmıştır. *Vitex* cinsi *Viticoideae*, *Clerodendrum* , *Schnabelia*, *Cardioteucris*, *Ajuga*, *Pseudocaryopteris*, *Trichostema*, *Caryopteris* cinsleri ise *Teucroideae* subfamilyası altında sınıflandırılmıştır. Ayrıca *Holocheila* cinsi belirli bir yeri olmayan cinslerin yer aldığı *Colebrookeina* adı altına alınmıştır. Kısaca DNA barkod temelli ağacın geneline bakıldığında klasik taksonomi ile uyum içerisinde. Dizi bilgisine göre *Lamioideae* subfamilyası altına alınan *Holocheila* cinsi için bu bulgu, *Holocheila* cinsinin sınıflandırılmasının tekrar gözden geçirilmesine bir fikir sunabilir ve sınıflandırılması problemlili olan *Lamiaceae* familyası gibi birçok problemlili grup için DNA barkod temelli ağaç, sağlıklı bir sınıflandırmanın elde edilebilmesi için klasik taksonomiye yardımcı olabilir.

4.1.3.2. *trnH-psbA* Lokusu

S. trojana türü için *trnH-psbA* genler arası bölgenin çoğaltımı kolaylıkla sağlanmıştır. MACROGEN firması tarafından dizilenen *trnH-psbA* genler arası bölgeye ait primerleri içeren *S. trojana* PCR ürünü 574 baz çiftidir. *Sideritis trojana* türüne ait dizi BLAST programına konulmuş ve benzerlik oranı en yüksek olan türlerin %94 Maximum Identity, 2e-53 E- value, %41 Query Coverage ve Maximum Score 219 değerlerine sahip voucher alt türleriyle *Phlomis* cinsine ait türler olduğu gözlemlenmiştir (Aksesyon Numaraları: AY792670, AY792669, AY792668, AY792667, AY792666, AY792665, AY792664, AY792663, AY792662, AY792661, AY792654, AY792653, AY792646,

AY792645, AY792642, AY792641, AY792640, AY792639, AY792638, AY792637, AY792636, AY792635, AY792634, AY792631, AY792630). Programdan yola çıkarak *Sideritis trojana* dizisiyle benzerlik karşılaştırılması yapılmış 100 türe ait dizinin BLAST sonucundan *Lamiaceae* familyasına dahil 5 türe ait dizi seçilmiştir.

Dizilerin sıralanması (Multiple Sequence Alignment), *S. trojana* türü de dahil *Lamiaceae* familyasına ait toplam 6 tür için öncelikle CLUSTALW2 (Multiple Sequence Alignment) programında yapılmıştır, ancak dizilerin birlikte sıralanması *trnH-psbA* genler arası bölgesinin türler arasında oldukça farklı uzunluğa sahip olması (6 tür arasından, en uzun *trnH-psbA* intergenic spacer bölgesine *S. trojana* türü (546 bç) sahiptir, *Phlomis* türlerine ait diziler 287 bç, *Leonurus japonicus* türüne ait dizi 311 bç, *Scutellaria barbata* türüne ait dizi 371 bç ve *Scutellaria baicalens* türüne ait dizi 405 bç'dir) ve bu bölgenin sıralama tarafından elde edilen sonucuna göre bazlar arasında oldukça boşluklar (gaps) içermesi ve her boşluklu bölgenin türler arasında yerleşiminin değişkenlik göstermesi bulgunun problemli olmasına sebep olmuştur (Şekil 4.4.). Bunun üzerine bir diğer Multiple Sequence Alignment programı olan T-COFFEE 6 türe ait dizinin sıralanması için kullanılmıştır. Ve elde edilen sıralama da herhangi bir problem olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.).

CLUSTALW2 programı ile elde edilen bulguların güvenilir olmadığını gözlenmesine rağmen hatalı sıralamanın DNA barkod temelli ağaca yansımalarının gözlemlenebilmesi için elde edilen bulgulara ait dosya, uzantısı '.aln' olacak şekilde kaydedilmiştir ve DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için MEGA 4.1 programı ile birlikte açılmıştır. DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için Neighbor Joining metodu ve Kimura 2- Parametresi kullanılmıştır (Şekil 4.5.).

```

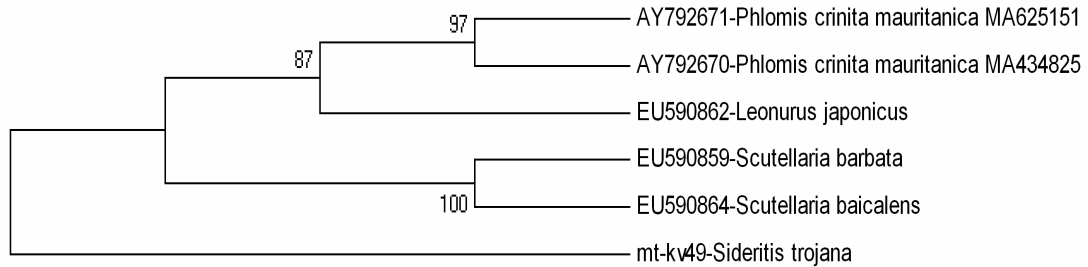
EU590859-scutellaria-barbata      ATAACTTCCTCTAGACTTAGC-TGCTATCGAAGCTCCA---ACAAAATGG 46
EU590864-scutellaria-baicalens    ATAACTTCCTCTAGACTTAGC-TGCTATCGAAGCTCCA---ACAAAATGG 46
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   -----TCGAAGCTCCATCTACAAAATGG 22
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   -----TCGAAGCTCCATCTACAAAATGG 22
EU590862-leonurus-japonicus      ATAAATTTCCCTCTAGACCTAGC-TTCTATCGAAGCTCCA---ACAAAATGG 46
at-kv49-sideritis-trojana        -----CCTTACNACCTAGCCTTCTATCGA-GCTCCA---ACAAAATGG 38
                                     **** *
EU590859-scutellaria-barbata      ATAAAGACTTGCTCTTAGTGTATAGGAGTTTTTGGAA-----TAGATAAA 89
EU590864-scutellaria-baicalens    ATAAAGACTTGCTCTTAGTGTATAGGAGTTTTTGGAA-----TAGATAAA 89
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   ATAAAGACTTGCTCTTAGTGTATAGGAGTTTTTGGAAATAGAAATAGATAAA 72
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   ATAAAGACTTGCTCTTAGTGTATAGGAGTTTTTGGAAATAGAAATAGATAAA 72
EU590862-leonurus-japonicus      ATAAAGACTTGCTCTTAGTGTATAGGAGTTTTTGGAAATAGAAATAGATAAA 86
at-kv49-sideritis-trojana        ATAAAGACTTGCTCTTAGTGTATAGGAGTTTTTGGAA-----TAGATAAA 90
                                     **** *
EU590859-scutellaria-barbata      TATAAGGAGCAATAAACTCTTCTTCTTCTATCAAAGAGGGGTT--ATTGC 137
EU590864-scutellaria-baicalens    TAGAAGGAGCAATAAACTCTTCTTCTTCTATCAAAGAGGGGTT--ATTGC 137
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   TATAAGGAGCAATAAACTCTTCTTCTTCTTCTATCAAAGAGGGGTT--ATTGC 120
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   TATAAGGAGCAATAAACTCTTCTTCTTCTTCTATCAAAGAGGGGTT--ATTGC 120
EU590862-leonurus-japonicus      TATAAGGAGCAATAAA--CCCTCTTCTGATAAAAAAGAGAGTTAATTGC 144
at-kv49-sideritis-trojana        TAAAAAGGAGCAATAAAACCCTTCTTCTTCTTCTATCAAAGAGGGGTT--ATTGC 128
                                     ** *
EU590859-scutellaria-barbata      TCCTTTATTTTCTTTTCAATTAGTAGTCTTCTAGACTTTTCTTTCC 187
EU590864-scutellaria-baicalens    TCCTTTATTTTCTTTTCAATTAGTAGTCTTCTAGACTTTTCTTTCC 187
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   TCCTTAATTTTCTTTTCAATTACT-----TTTTTCTTTCC 156
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   TCCTTAATTTTCTTTTCAATTACT-----TTTTTCTTTCC 156
EU590862-leonurus-japonicus      TCCTTAATTTTCTTTTCAATTACT-----TTTTTCTTTCC 180
at-kv49-sideritis-trojana        TCCTTTATTTTCTTTTCAATTACT-----TTTTTCTTTCC 164
                                     **** *
EU590859-scutellaria-barbata      ATTAAG-----AATAAATAAAGAG-----206
EU590864-scutellaria-baicalens    ATTAAGCTAGACTTATTTCTTTCATTAAATAAATAAAGAG-----230
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   ATTAAGGATTC-----168
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   ATTAACA-----162
EU590862-leonurus-japonicus      ATTAACA-----186
at-kv49-sideritis-trojana        ATTAAGGATTCAGAAAAAGAAAAAGAGGGGGGATTCCTTAAGGATTAAGATTA 214
                                     ****
EU590859-scutellaria-barbata      -GAGAAAAAATAATTGAAATTCATTTTTATCTTA-----CAAG 245
EU590864-scutellaria-baicalens    -GATAAAAAATGATTGAAATTCATTTTTATCTTATTTTATCTTACAAAG 279
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   -----A-----169
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   -----GG-----164
EU590862-leonurus-japonicus      -----GG-----188
at-kv49-sideritis-trojana        TGAATTAATTTATTTATTTATTTATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTT 264
                                     ** *
EU590859-scutellaria-barbata      TTCTAAAAATTCAAAA-TTGAAGAAATC--GAATTCGTAATGTAAATGAA 292
EU590864-scutellaria-baicalens    TTCTAAAAATTTAAAA-TTGAAGAAATC--GAATTCGTAATGTAAATGAA 326
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   ----GAAAAAGAAAAG-AAGAAAAAAA--TGATT-TTAAATTCATT--G 207
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   ATTCAGAAAAAGAAAAG-AAGAAAAAAA--TGATT-TTAAATTCATT--G 207
EU590862-leonurus-japonicus      ATTCAGAAAAAGAAAAG-AAGAAAAAAA--AAATGATTAATTAATTAATTTA 234
at-kv49-sideritis-trojana        TTGTAATAAATAAATAAAGGTTGTAAGTTTTTTTATTTTAAAGATAAATAAAG 314
                                     ** *
EU590859-scutellaria-barbata      ATATTACATCAAAAAAAC-T---AATGAATTTAAAAGTAAATTTA--TAGT 336
EU590864-scutellaria-baicalens    ATATTACATCAAAAAAAC---ATTTAATTTTAAAGTAAATTC---TAGT 370
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   AT-TTTCATTTGAAAAGTAA---ATTCATTTTCATTATAGTAA---TAGT 250
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   AT-TTTCATTTTAAAAGTAA---ATTCATTTTCATTATAGTAA---TAGT 250
EU590862-leonurus-japonicus      TT--TGGAATTTAAAAGTAA---ATTTATTTTCATTATAGTAA---TAGT 276
at-kv49-sideritis-trojana        AAAAGCAGAAAAATAAATAAAGTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA 364
                                     *
EU590859-scutellaria-barbata      AGAGGGGCGGATGTAGCCAAATGGAATCAAGGCAGT-----371
EU590864-scutellaria-baicalens    AGAGGGGCGGATGTAGCCAAATGGAATCAAGGCAGT-----405
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   AGAGGGGCGGATGTAGCCAAATGGAATCAAGGCAGTAA-----287
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   AGAGGGGCGGATGTAGCCAAATGGAATCAAGGCAGTAA-----287
EU590862-leonurus-japonicus      AGAGGGGCGGATGTAGCCAAATGGAATCAAGGCAGT-----311
at-kv49-sideritis-trojana        ATAAATAATTTATTTATTTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA 414
                                     *
EU590859-scutellaria-barbata      -----
EU590864-scutellaria-baicalens    -----
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   -----
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   -----
EU590862-leonurus-japonicus      -----
at-kv49-sideritis-trojana        AATTTTCATTTTGAATTAATTTAGAACTTGTAAAGATAAATAAATTCAGTTC 464
-----
EU590859-scutellaria-barbata      -----
EU590864-scutellaria-baicalens    -----
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   -----
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   -----
EU590862-leonurus-japonicus      -----
at-kv49-sideritis-trojana        ATTTTGAATTAATTAATAAAGTAAATTCATTCATTATAGTAAATAGTTCA 514
-----
EU590859-scutellaria-barbata      -----
EU590864-scutellaria-baicalens    -----
\Y792671-phlomis-crinitamaurit   -----
\Y792670-phlomis-crinitamaurit   -----
EU590862-leonurus-japonicus      -----
at-kv49-sideritis-trojana        GGGCCGCAATGATGCCAAGTGCATCAAGGCAGT 546

```

Şekil 4.4. *Lamiaceae* familyasına ait *trnH-psbA* lokuslarının 6 türe ait dizilerinin CLUSTALW2 Multiple Sequence Alignment bulgusu.

CLUSTALW2 programı ile elde edilen sıralamaya göre *trnH-psbA* intergenic spacer bölgesinin türler arasında çok farklı uzunluklarda olması, baz çiftleri arası boşlukların çok fazla olması ve boşlukların yerleşim yerlerinin değişkenlik göstermesi dizilerin kayması, doğru eşleşmemiş baz karşılaştırılması ve bazların son kısımlarının boş kalması sonucunu doğurmuştur. Bu bulgularla yine de barkod temelli ağaç eldesi denenmiştir (Şekil 4.5.) (DNA barkod temelli ağacın eldesiyle ilgili bilgi: No. of Taxa: 6, Data Type: Nucleotide, Analysis: Phylogeny Reconstruction, Tree Inference- Method: Neighbor-joining, Phylogeny Test and options: Bootstrap (1000 replicates; seed=64238), Include Sites- Gaps/Missing Data: Pairwise Deletion, Substitution Model- Model: Nucleotide: Kimura 2-parameter, Substitutions to Include: d: Transitions + Transversions, Pattern among sites Lineages: Same (Homogeneous), Rates among Sites: Uniform rates, No. of Sites: 582, No of Bootstrap Reps: 1000).

Ancak problemlili sıralama bulgusu nedeniyle elde edilen ağaç güvenilir değildir. Çünkü bu sıralama sonucu ile elde edilen ağaca göre *Scutellarioideae* subfamilyasına ait olan *Scutellaria* cinsi türleri *Lamioideae* subfamilyasına ait olan *Leonurus japonicus* ve *Phlomis* alt türlerine, *Lamioideae* subfamilyasına ait *Sideritis trojana* türüne göre daha yakın olarak dallanmıştır ve *Sideritis trojana* türü kümelenmenin dışında kalmıştır. Dolayısıyla elde edilen ağaç da sıralamanın doğru olmaması sebebiyle güvenilmezdir.



Şekil 4.5. *Lamiaceae* familyasına ait *trnH-psbA* lokusu içeren 6 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.

CLUSTALW2 (Multiple Sequence Alignment) programı ile elde edilen problemlili sıralama sebebiyle bir başka Multiple Sequence Alignment programı olan T-COFFEE programı ile sıralama tekrar denenmiştir ve türlere ait dizilerin sıralanmasında herhangi bir sorunla karşılaşmamıştır (Şekil 4.6.). T-COFFEE programına ait bulguların dosyası,

uzantısı ‘.phylip’ olacak şekilde kaydedilmiş ve DNA barkod temelli ağaç elde edilmiştir (Şekil 4.7.).

```

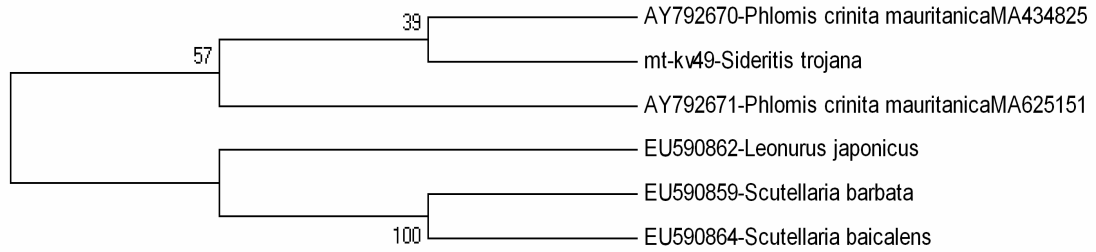
AY792670-P-crinitamaurit -----TCGAA GCTCC ATCTACAAA TGGATAAGACTTG
AY792671-P-crinitamaurit -----TCGAA GCTCC ATCTACAAA TGGATAAGACTTG
EU590859-S-barbata      ATAACTTCC CTCTAGACTTAG-CTGCTATCGAA GCTCCA---ACAAATGGATAAGACTTG
EU590864-S-baicalens    ATAACTTCC CTCTAGACTTAG-CTGCTATCGAA GCTCCA---ACAAATGGATAAGACTTG
mt-kv49-S-trojana       -----CCTTACNA CCTAGCCTTCTATCGA- GCTCCA---ACAAATGGATAAGACTTG
EU590862-L-japonicus    ATAAATTTCC CTCTAGACTTAG-CTTCTATCGAA GCTCCA---ACAAATGGATAAGACTTG
                        *****
AY792670-P-crinitamaurit GTCCTTAGTG TATAGGAGTTT TTTGAAAATA GAATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACTCT
AY792671-P-crinitamaurit GTCTTAGTG TATAGGAGTTT TTTGAAAATA GAATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACTCT
EU590859-S-barbata      TTCTTAGTG TATAGGAGTTT TTTG---AATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACTCT
EU590864-S-baicalens    GTCTTAGTG TATAGGAGTTT TTTGAAAATA GAA-----TAAAAGGAGCAATAAACTCT
mt-kv49-S-trojana       GTCTTAGTG TATAGGAGTTT TTTGAAAATA GAATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACTCT
EU590862-L-japonicus    GTCTTAGTG TATAGGAGTTT TTTGAAAATA GAATAGATAAATATAAGGAGCAATAAACTCT
                        *****
AY792670-P-crinitamaurit TTCTTGTTT TATCAAG--AGGGGTTATTGCTCCTTAATTTTCTTTTGAATTACT-----
AY792671-P-crinitamaurit TTCTTGTTT TATCAAG--AGGGGTTATTGCTCCTTAATTTTCTTTTGAATTACT-----
EU590859-S-barbata      TTCTTGTTT TATCAAG--AGGGGTTATTGCTCCTTTATTTTCTTTTCAATTAGTAGCTT
EU590864-S-baicalens    TTCTTGTTT TATCAAG--AGGGGTTATTGCTCCTTTATTTTCTTTTCAATTAGTAGCTT
mt-kv49-S-trojana       TTCTTGTTT TATCAAG--AGGAGTTATTGCTCCTTTATTTTCTTTTCAATTACT-----
EU590862-L-japonicus    --CTTGATAAAAACAAGAAA GAGTTAA TTGCTCCTTAATTTTCTTTTCAATTACT-----
                        *****
AY792670-P-crinitamaurit -----TTTTTCTTTC ATTCAGGATT-----
AY792671-P-crinitamaurit -----TTTTTCTTTC ATTCAGGATT-----
EU590859-S-barbata      TCCTAGACTTTT-----
EU590864-S-baicalens    TCCTAGACTTTATTTCTTTC ATTCAG-----CTAGA-----
mt-kv49-S-trojana       -----TTTGTCTTTT CATTACAGGATC CAGAAAAGAAA GAGGGGGATTCTTAAAG
EU590862-L-japonicus    -----TTTTTCTTTC ATTCAGGATT-----
                        **
AY792670-P-crinitamaurit -----
AY792671-P-crinitamaurit -----
EU590859-S-barbata      -----
EU590864-S-baicalens    -----
mt-kv49-S-trojana       GATTGATTAATGATTG AATATTTATTTGTATAAATTTTTTTTATTTTTATTTATTTAACTTC
EU590862-L-japonicus    -----
AY792670-P-crinitamaurit -----CAGA---AAAA GAAAGAA GA
AY792671-P-crinitamaurit -----CAGA---AAAA GAAAGAA GA
EU590859-S-barbata      -----TTCTTTC CATTAA GA--ATAAA TAAAGAG GA
EU590864-S-baicalens    -----CTTATTTCTTTC CATTAA GA--ATAAA TAAAGAG GA
mt-kv49-S-trojana       TTGTAAAAA TAAAGGTTGGTAA GTTTTTATTTTTA --AGATAAAAA GAAAGAC GA
EU590862-L-japonicus    -----CAGA---AAAA GAAAGAA GA
                        *****
AY792670-P-crinitamaurit AA---AAAATGA TTTTAAATTC A-----ATTGATT-----
AY792671-P-crinitamaurit AA---AAAATGA TTTTAAATTC A-----ATTGATT-----
EU590859-S-barbata      GA---AAAATAA TTGAAATTC CATTTTTTATC-----T
EU590864-S-baicalens    TA---AAAATGA TTGAAATTC CATTTTTTATC--TTATTTTATC-----T
mt-kv49-S-trojana       AATAAAAAATGATTA AAAATTC ACTTTTTTTATTTACTTTATAA TAAATTTATTTACTT
EU590862-L-japonicus    AAAAAAAAATGATTA AAAATTC A-----ATTTATT-----
                        *
AY792670-P-crinitamaurit -----TTGCATTTT-----
AY792671-P-crinitamaurit -----TTGCATTTG-----
EU590859-S-barbata      TACAAGTTC TAAAAATTC AAAATTG AAGAA-----TCGAATTC-----
EU590864-S-baicalens    TACAAGTTC TAAAAATTC AAAATTG AAAAA-----TCGAATTC-----
mt-kv49-S-trojana       TATAAATAATATAA TTAATTTTATAAAAAA TTTCATTTGAA TTAATTTAGAACTT
EU590862-L-japonicus    -----TGGAATTTA-----
AY792670-P-crinitamaurit -AAAG---TAAATTC-----ATTTT-----CATTA
AY792671-P-crinitamaurit -AAAG---TAAATTC-----ATTTT-----CATTA
EU590859-S-barbata      GTAA-ATG-TAAATGAAATATTCACA-----TCAAAAAC-TAATGAA TT--TAA
EU590864-S-baicalens    GTAA-ATG-TAAATTC AATATTCACA-----TCAAAAAAA TATTTAATTT--TAA
mt-kv49-S-trojana       GTAAGATAATAAATTC AA-GTTCATTTG AATTAA TTAATAAAGTAAATTCATTCATTA
EU590862-L-japonicus    -AAAG---TAAATTT-----ATTTT-----CATTA
                        **
AY792670-phlomis-crinitamaurit TAGTAAT---AGTAGAGGGGCGGATGTAGC CAA GTGGA TC AAGGCAGTAA
AY792671-phlomis-crinitamaurit TAGTAAT---AGTAGAGGGGCGGATGTAGC CAA GTGGA TC AAGGCAGTAA
EU590859-scutellaria-barbata AAGTAATTTATAGTAGAGGGGCGGATGTAGC CAA GTGGA TC AAGGCAGT--
EU590864-scutellaria-baicalens AAGTAATTC-TAGTAGAGGGGCGGATGTAGC CAA GTGGA TC AAGGCAGT--
mt-kv49-sideritis-trojana   TAGTAAT---AGTTCAGGGGCGGATGTAGC CAA GTGGA TC AAGGCAGT--
EU590862-leonurus-japonicus TACTAAT---AATAGAGGGGCGGATGTAGC CAA GTGGA TC AAGGCAGT--
                        *

```

Şekil 4.6. *Lamiaceae* familyasına ait 6 türe ait *trnH-psbA* lokusunun dizilerinin T-COFFEE Multiple Sequence Alignment bulgusu.

T- COFFEE Multiple Sequence Alignment programı türlere ait sıralama bulgusu ile elde edilen DNA barkod temelli ağaç, sıralamanın doğru elde edilmesine rağmen güvenilir değildir (Şekil 4.7.) (DNA barkod temelli ağacın eldesiyle ilgili bilgi: No. of Taxa: 6, Data Type: Nucleotide, Analysis: Phylogeny Reconstruction, Tree Inference- Method: Neighbor-joining, Phylogeny Test and options: Bootstrap (1000 replicates; seed=64238), Include Sites- Gaps/Missing Data: Pairwise Deletion, Substitution Model- Model: Nucleotide: Kimura 2-parameter, Substitutions to Include: d: Transitions + Transversions, Pattern among sites Lineages: Same (Homogeneous), Rates among Sites: Uniform rates, No. of Sites: 591, No of Bootstrap Reps: 1000).

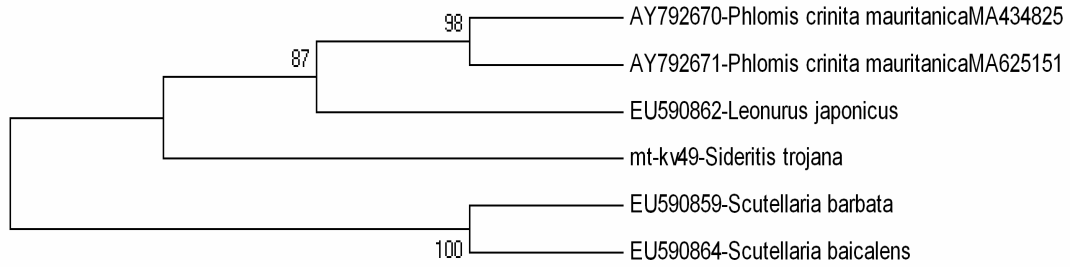
Ağaca bakıldığında *Sideritis trojana* türü ve *Phlomis crinata mauritanica* MA434825 alt türü birlikte aynı dal altında dallanmıştır. Ancak elde edilen ağaç ile dizilerin sıralanması tutarlı değildir. Çünkü sıralamaya bakıldığında *Phlomis* cinsine ait olan alt türlere ait dizilerin karşılaştırılmasında iki alt tür arasında sadece 1 baz çifti farklılığı vardır. Her iki türe ait dizi de *Sideritis trojana* türüne ait olan diziye göre oldukça farklı baz çiftlerine sahiptir, dolayısıyla sıralamaya göre *Phlomis* cinsine ait olan alt türler aynı dal altında dallanmalıdır.



Şekil 4.7. *Lamiaceae* familyasına ait *trnH-psbA* lokusu içeren 6 türün T- COFFEE Multiple Sequence Alignment bulgusuna göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.

Elde edilen ağacın dizilere ait sıralama bulguları ile tutarlı olmamasından dolayı ağacın elde edilmesiyle ilgili bazı parametreler değiştirilmiş ve farklı alternatifler denenmiştir. *trnH-psbA* gen bölgesi çok fazla sıralama boşluğu içermesi sebebiyle Gaps/Missing Data başlığı altında yer alan Complete Deletion alternatifi denenmiştir. Pairwise Deletion seçeneğiyle daha fazla bilgi edinimi olmasına karşın, nükleotid ve amino asit dizilerinin farklı evrimsel güçlerin altında evrimleştikleri düşüncesiyle Complete Deletion seçeneği tercih edilebilir. Complete Deletion seçeneğinde sıralama boşlukları

veya kaybolmuş veriler analiz başlamadan önce kaldırıldığı için *trnH- psbA* gen bölgesi için bu seçeneğin Pairwise Deletion seçeneğine göre daha iyi bulgu vermesi olasılığı düşünülerek ağacın Complete Deletion seçeneği ile eldesi denenmiştir (Şekil 4.8.) (DNA barkod temelli ağacın eldesiyle ilgili bilgi: No. of Taxa: 6, Data Type: Nucleotide, Analysis: Phylogeny Reconstruction, Tree Inference- Method: Neighbor-joining, Phylogeny Test and options: Bootstrap (1000 replicates; seed=64238), Include Sites-Gaps/Missing Data: Pairwise Deletion, Substitution Model- Model: Nucleotide: Kimura 2-parameter, Substitutions to Include: d: Transitions + Transversions, Pattern among sites Lineages: Same (Homogeneous), Rates among Sites: Uniform rates, No. of Sites: 224, No of Bootstrap Reps: 1000).



Şekil 4.8. *Lamiaceae* familyasına ait *trnH- psbA* lokusu içeren 6 türün T- COFFEE Multiple Sequence Alignment bulgusuna göre Complete Deletion alternatifi kullanılarak elde edilen DNA barkod temelli ağaç.

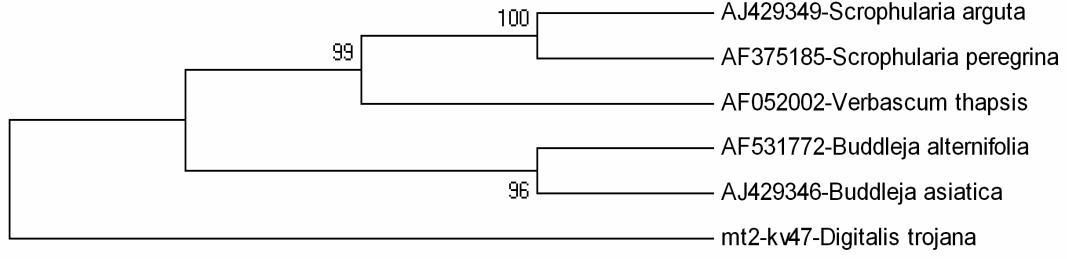
Şekil 4.8.'deki ağaca bakıldığında *Lamioideae* subfamilyasına ait olan *Sideritis trojana* türü *Lamioideae* subfamilyasına ait olan *Phlomis* cinsine ait alt türlere ve *Leonurus japonicus* türüne yakın dallanmıştır. *Scutellarioideae* subfamilyasına ait olan *Scutellaria barbata* ve *Scutellaria baicalens* türleri program tarafından aynı dal altına dahil edilmiştir. Ağaç bu haliyle şekil 4.7.'deki ağaca göre klasik taksonomi ile daha tutarlıdır (DNA barkod temelli ağaç ile elde edilen sınıflandırmanın klasik taksonomik sınıflandırma ile karşılaştırılması BLAST programında yer alan türlere ait klasik taksonomik sınıflandırma bilgileri temel alınarak yapılmıştır).

4.1.4. *Digitalis trojana* (*matK* ve *trnH-psbA* Lokuslarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi)

4.1.4.1. *matK* Lokusu

D. trojana türü için *matK* gen bölgesinin çoğaltımı kolaylıkla sağlanmıştır. MACROGEN firması tarafından dizilenen *matK* genine ait primerleri içeren *D. trojana* PCR ürünü 911 baz çiftidir. *Digitalis trojana* türüne ait dizi BLAST programına konulmuş ve benzerlik oranı en yüksek olan türün %92 Maximum Identity Rate, Maximum Score 1277, Query Coverage %99, E- value 0,0 değerleriyle *Tetranema mexicanum* (*Plantaginaceae*) türü (Aksesyon Numarası: AF375190.1) olduğu gözlemlenmiştir. BLAST programında *Digitalis trojana* ile dizi karşılaştırılması yapılmış 100 diziden sadece *Scrophulariaceae* familyası türlerine ait olan 5 dizi alınmıştır.

Dizilerin sıralanması (Multiple Sequence Alignment), CLUSTALW2 programında yapılmıştır ve dizilerin sıralanmasında herhangi bir problemle karşılaşılması *Digitalis trojana* dizisi ile birlikte 6 dizinin CLUSTALW2 programında sıralanması (Multiple Sequence Alignment) ile elde edilen bulgulara ait dosya, uzantısı '.aln' olacak şekilde kaydedilmiş ve DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için MEGA 4.1 programı ile birlikte açılmıştır. DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için Neighbor joining metodu ve Kimura 2- Parametresi kullanılmıştır. Kullanılan yöntem ve alternatifler doğrultusunda ağacın eldesinde bir problemle karşılaşılması (Şekil 4.9.) (DNA barkod temelli ağacın eldesiyle ilgili bilgi: No. of Taxa: 6, Data Type: Nucleotide (Coding), Analysis: Phylogeny Reconstruction, Tree Inference- Method: Neighbor-joining, Phylogeny Test and options: Bootstrap (1000 replicates; seed=64238), Include Sites- Gaps/Missing Data: Pairwise Deletion, Codon Positions: 1st+2nd+3rd+Noncoding, Substitution Model- Model: Nucleotide: Kimura 2-parameter, Substitutions to Include: d: Transitions + Transversions, Pattern among Lineages: Same (Homogeneous), Rates among Sites: Uniform rates, No. of Sites: 904, No of Bootstrap Reps: 1000).



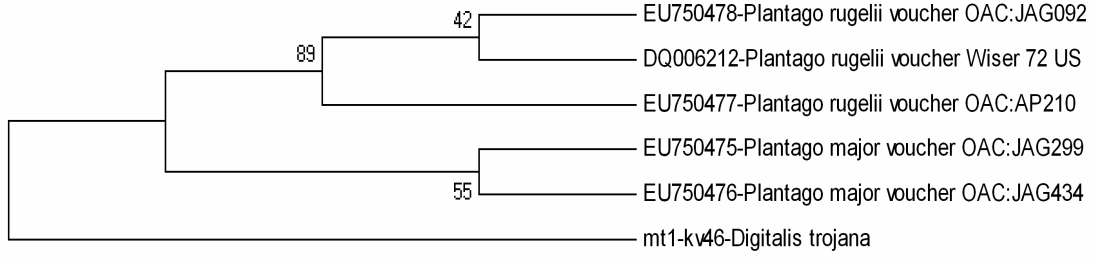
Şekil 4.9. *Scrophulariaceae* familyasına ait *matK* lokusu içeren 6 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.

Buddleja asiatica ve *Buddleja alternifolia* türleri *Buddlejaceae* ordosuna aittir. CLUSTALW2 programında elde edilen sıralama bulgusuna göre dizilerinin benzerliği sebebiyle MEGA 4.1 programı tarafından *Buddleja asiatica* ve *Buddleja alternifolia* türleri aynı dal altına alınmıştır. *Verbascum thapsis*, *Scrophularia arguta*, *Scrophularia peregrina* türleri *Scrophularideae* ordosunda yer almaktadır. Program bu üç türü birbirine çok yakın dallandırmıştır. Ancak dallanmayı yaparken *Scrophularia* cinsine ait olan türleri aynı dal altına almıştır ve *Verbascum* cinsi de *Scrophularia* cinsine ait olan türlerine yakın olarak dallandırılmıştır. Çünkü *Scrophularia arguta* türü *Scrophularia peregrina* türüne göre 11 baz çifti farklıdır, *Verbascum thapsis* türünden ise 22 baz çifti farklıdır. Ayrıca *Verbascum thapsis* 200-205. sıralar arasında yer alan ‘TTCAA’ baz çiftlerine sahip değildir. Buna karşın *Scrophularia arguta* ve *Scrophularia peregrina* türleri 200- 205. sıralar arasında yer alan ‘TTCAA’ baz çiftlerine sahiptir. (*Buddleja asiatica*, *Buddleja alternifolia*, *Verbascum thapsis*, *Scrophularia arguta*, *Scrophularia peregrina* ile elde edilen DNA barkod temelli ağacın klasik taksonomik sınıflandırma ile karşılaştırılması BLAST programında türlere ait klasik taksonomik sınıflandırma bilgileri temel alınarak yapılmıştır). *Digitalis trojana* türü *Digitalideae* ordosunda yer almaktadır. *Digitalis trojana* türüne ait olan dizi 5 türün dizisine göre oldukça farklıdır. Örneğin, *Buddleja alternifolia*, *Buddleja asiatica* türüne göre en az 8 baz çifti farklılığa sahipken, *Digitalis trojana* *Buddleja asiatica* türünden en az 60 baz çifti farklılığına sahiptir. Dolayısıyla diğer grupların dışında ayrı bir dal olarak ayrılmıştır (*Digitalis trojana* türüne ait taksonomik bilgi <http://www.ipni.org/> “The International Plant Names Index” internet sayfasından kontrol edilmiştir, 19.12.2008). Dolayısıyla DNA barkod temelli ağaç ile elde edilen sınıflandırma klasik taksonomi ile uyum içerisindedir.

4.1.4.2. *trnH-psbA* Lokusu

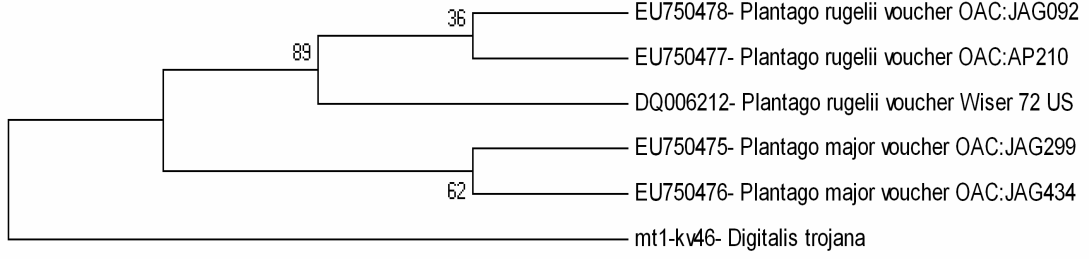
D. trojana türü için *trnH-psbA* genler arası bölgenin çoğaltımı kolaylıkla sağlanmıştır. MACROGEN firması tarafından dizilenen *trnH-psbA* genine ait primerleri içeren *D. trojana* PCR ürünü 365 baz çiftidir. *D. trojana* türüne ait dizi BLAST programına konulmuş ve benzerlik oranı en yüksek olan türlerin EU750476, EU750475, EU750474 aksesyon numaraları ile *Plantago major* voucher türleri (*Plantaginaceae*) olduğu gözlemlenmiştir. Bu türlerin *D. trojana* ile benzerlik oranları Maximum Score 217, %80 Maximum Identity, E-value 3e-53, Query Coverage %97 olarak gözlemlenmiştir.

CLUSTALW2 programında sıralamada kullanılmak üzere BLAST programından *D. trojana* türüne en çok benzerlik gösteren *Plantaginaceae* familyası üyesi olan 5 türe ait dizi seçilmiştir. Çünkü *Scrophulariaceae* familyasına ait hiçbir tür şu ana kadar *trnH-psbA* intergenic spacer bölgesiyle çalışılmamıştır. Dizilerin sıralanması (Multiple Sequence Alignment), CLUSTALW2 programında yapılmıştır ve dizilerin sıralanmasında herhangi bir problemle karşılaşmamıştır. Çünkü türlere ait *trnH-psbA* lokusunun uzunluğu birbirlerine yakındır (DQ006212 aksesyon numaralı *Plantago* voucher (337 baz çifti) dışındaki *Plantago* voucher türleri 340 baz çiftidir). *Digitalis trojana* dizisi ile birlikte 6 dizinin CLUSTALW2 programında sıralanması (Multiple Sequence Alignment) ile elde edilen bulgulara ait dosya, uzantısı '.aln' olacak şekilde kaydedilmiş ve DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için MEGA 4.1 programı ile birlikte açılmıştır. DNA barkod temelli ağacın elde edilmesi için Neighbor joining metodu ve Kimura 2-Parametresi kullanılmıştır (Şekil 4.10.) (DNA barkod temelli ağacın eldesiyle ilgili bilgi: No. of Taxa: 6, Data Type: Nucleotide (Coding), Analysis: Phylogeny Reconstruction, Tree Inference- Method: Neighbor-joining, Phylogeny Test and options: Bootstrap (1000 replicates; seed=64238), Include Sites- Gaps/Missing Data: Pairwise Deletion, Codon Positions: 1st+2nd+3rd+Noncoding, Substitution Model- Model: Nucleotide: Kimura 2-parameter, Substitutions to Include: d: Transitions + Transversions, Pattern among Lineages: Same (Homogeneous), Rates among Sites: Uniform rates, No. of Sites: 904, No of Bootstrap Reps: 1000).



Şekil 4.10. *trnH-psbA* lokusu içeren *Plantaginaceae* familyası türlerine ve *Digitalis trojana* türüne ait 6 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.

CLUSTALW2 Multiple Sequence Alignment sıralama bulgusuna bakıldığında *Digitalis trojana* 5 türe nazaran oldukça farklı bir diziye sahiptir. *Plantago rugelii* voucher türler ile *Plantago major* voucher türler karşılaştırıldığında, *Plantago rugelii* voucher türler ile *Plantago major* voucher türler birbirlerinden 2- 5 baz çifti farklılığa sahipken, *Digitalis trojana*, *Plantago major* voucher ve *Plantago rugelii* voucher türlerinden en az 80 baz çifti farklılığa sahiptir. Ve sıralama bulgusu ile elde edilen ağaç da *Digitalis trojana* dizisinin çok farklı olması nedeniyle *Digitalis trojana* türü dallanmanın dışında kalmıştır. Ancak elde edilen ağaca bakıldığında gözden kaçan bir nokta vardır. Ağaçta EU750478-Plantago rugelii voucher OAC:JAG092, DQ006212-Plantago rugelii voucher Wiser 72 US türü ile aynı dal altına alınmıştır. Ancak dizilerle karşılaştırılma yapıldığında EU750478-Plantago rugelii voucher OAC:JAG092 ve EU750477-Plantago rugelii voucher OAC:AP210 347- 340. sıralar arasında kalan 'AGT' baz çiftlerine sahipken, DQ006212-Plantago rugelii voucher Wiser 72 US türü 347- 340. sıralar arasında kalan 'AGT' baz çiftlerine sahip değildir. Bu yüzden EU750478-Plantago rugelii voucher OAC:JAG092 ve EU750477-Plantago rugelii voucher OAC:AP210 aynı dal altına alınmalıdır. Doğru ağacın kazanımı için MEGA 4.1 programında Gaps/Missing Data verisi altında yer alan Complete Deletion alternatifi kullanılarak ağaç eldesi sağlanmıştır (Şekil 4.11). Complete Deletion alternatifi kullanılarak elde edilen DNA barkod temelli ağaç CLUSTALW2 Multiple Sequence Alignment programından elde edilen sıralama sonucuyla tutarlı hale gelmiştir ve EU750478-Plantago rugelii voucher OAC:JAG092 ve EU750477-Plantago rugelii voucher OAC:AP210 aynı dal altına alınmıştır.



Şekil 4.11. *trnH- psbA* lokusu içeren *Plantaginaceae* familyası türlerden ve *Digitalis trojana* türünden Complete Deletion alternatifi kullanılarak elde edilen DNA barkod temelli ağaç.

4.2. Tartışma

Literatüre bakıldığında DNA barkodlama tekniğinin yeni bir teknik olması ve bitkilerle ilgili ilk DNA barkodlaması çalışmasının 2005 yılı gibi yakın bir zamanda yapılması sebebiyle henüz bitkilerle ilgili fazla çalışmanın olmadığını görmekteyiz. Ancak DNA barkodlama tekniğinin çok fazla avantajı olması ve bitkilerle ilgili çok farklı alanlarda kullanılabilirliği olması sebebiyle bu teknikle ilgili ve bitkilere özgü evrensel bir barkodun bulunabilmesi için araştırmalar devam etmektedir.

Daha önce bitkilerle ilgili gerçekleştirilmiş olan çalışmaların sonuçlarına baktığımız zaman birçok çalışmanın elde etmiş olduğumuz verilerle paralellik gösterdiğini görmekteyiz.

Kress ve ark. 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada kullanmış oldukları takson kümesindeki genusların çoğunluğunda yüksek oranda dizi farklılığı ve her bir test örneğinde yüksek çoğaltım bakımından *trnH- psbA* genler arası plastid bölgesini daha ileriki analizler için odak barkod noktası olarak belirlemişler ve bu bölgeyi DNA barkod dizisi için en iyi plastid opsiyonu olarak önermişlerdir. Kress ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmada *trnH- psbA* spacer plastid bölgesinin yüksek çoğaltım başarısı ve yüksek oranda dizi farklılığı göstermesi çalışmamızla paralellik göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda *trnH- psbA* lokusunun yeterli varyasyona sahip olduğu bulgusu, Shaw ve ark. (2005) tarafından yapılmış bir başka çalışmayla da desteklenmektedir.

Vischi ve ark. (2006) *trnH- psbA* genler arası bölge ile yapmış oldukları çalışmada, çalışmamızın sonucuyla paralellik gösterecek şekilde *trnH- psbA* genler arası bölgenin her bir 4 ayçiçek türüne ait doğru tanımlama için yeterli değişkenliğe sahip olduğunu bulmuşlardır.

Yüksek oranda insersiyon veya delesyondan kaynaklanan sebeplerden dolayı *trnH-psbA* lokusunun sıralamasının problemlili olduğu, bu lokusun sıralamasının angiospermilerin birçok geniş aileleri arasında oldukça belirsiz olduğu Chase ve ark. tarafından 2007 yılında yayınlanmış olan makalede belirtilmiştir. Çalışmamızda *Lamiaceae* familyası için *trnH-psbA* lokusuyla yapılan sıralamadaki problem az önceki yapılan açıklama tarafından desteklenir niteliktedir.

Kress ve Erickson (2007) 9 lokusu farklı özellikleri bakımından karşılaştırmış ve uygun barkodu belirlemeye çalışmışlardır. Sadece *trnH-psbA* ve *rbcL* lokusları standart primerler kullanılarak yüksek oranda PCR başarısı sergilemiştir. Düşük PCR başarısından ve bu nedenle az miktarda elde edilebilir karşılaştırma sonucu vermesinden dolayı *matK* lokusunun ITS dışındaki diğer lokuslardan belirgin bir farklılık göstermediğini belirtmişlerdir. Bu bulgu, sonuçlarımızla uyumsuzdur çünkü *matK* lokusunun PCR çoğaltım başarısı, en az *trnH-psbA* lokusu kadar başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir.

Kress ve Erickson (2007) sıralama probleminin barkodlama üzerinde çok az bir etkiye sahip olduğunu çünkü asıl amaçlarının tür tanımlaması olduğunu ve doğru dizileme gerektiren filogeni kurulması olmadığını savunmuşlardır. Ancak Blaxter (2004), barkod lokuslarının kullanılabilirliğini değerlendirirken sıralama kolaylığını da bir kriter olarak belirlemiştir. *trnH-psbA* lokusunun türler arasında yüksek seviyede varyasyonuna rağmen, çok sayıda indelden kaynaklanan sıralamanın zorluğu kadar kısa uzunluğundan da kaynaklanan sadece tür seviyesinde filogeni kurulumunda sınırlı bulunmuştur (Ackerfield ve ark., 2003; Hamilton ve ark., 2003). Çalışmamızda DNA barkod temelli ağaçların eldesi için sıralama kolaylığı da Blaxter (2004) adlı araştırmacının savunduğu gibi barkodun kullanılabilirliğini değerlendirirken önemli bir kriter olarak karşımıza çıkmıştır.

Kondo ve ark. (2007) Legume ailesiyle yapmış oldukları çalışmada *matK* lokusu ile elde ettiğimiz sonuçların aksine *matK* lokusunun tek başına tür tanımlamasında yeterli olmadığını savunmuşlardır.

Newmaster ve ark. (2007) 6 kodlama yapan ve 1 kodlama yapmayan kloroplast lokusunun *Myristicaceae* familyası için barkodlama çalışmalarında kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. *matK* ve *trnH-psbA* lokuslarının tür tanımlaması için önemli derecede varyasyona sahip olduğunu bulmuşlardır ve *Myristicaceae* familyası için barkodlamada umut vaat ettiklerini açıklamışlardır. Ancak çalışmamızda gözlemlendiği gibi, yapmış oldukları çalışmada *trnH-psbA* genler arası bölgenin *matK* bölgesine göre tür tanımlamasında daha fazla varyasyon içerdiğini belirtmişlerdir.

Lahaye ve ark. (2008c) yapmış oldukları çalışma *matK* ve *trnH-psbA* lokuslarının çoğaltım başarısı ve lokuslara ait sıralanma sonuçları bakımından çalışmamızla paralellik göstermektedir. Test edilen her bir potansiyel barkod (*matK*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*) için çoğaltım başarısını genel olarak başarılı bulmuşlardır. *matK* için dizilerin sıraya konulması probleme sebep olmazken, *trnH-psbA* (yüksek düzeyde uzunluk varyasyonundan dolayı) sıralamada önemli derecede zorluk sunmuştur. CLUSTAL X tarafından elde edilen sıralama güvenilir olmadığı için aynı türden olan türler arasında öncelikle görsel bir sıralama gerçekleştirmişler ve sonra aynı türler arasında türler arası hesaplamaları homolog tutabilmek için gerekli olduğu kadar boşluk (gaps) eklenmiştir ve bütün taksonlar bu şekilde sıralanmıştır. Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde Lahaye ve ark. yapmış oldukları çalışma, çalışmamızı destekler nitelikte *matK* geninin bitkilerde DNA barkodlaması çalışmalarında tek lokus olarak kullanılabileceğini önermişler, problematik gruplar içinse ek barkodların geliştirilebileceğini savunmuşlardır. Ayrıca *trnH-psbA* lokusunun yüksek düzeyde uzunluk varyasyonundan dolayı sıralamada sunduğu problem, çalışmamızda *trnH-psbA* lokusu içeren *Sideritis trojana* ve *Lamiaceae* familyasına ait 5 bitki türü için de sıralama zorluğu problemine sebep olmuştur.

Çalışmamızı destekleyen bir diğer çalışma da Lahaye ve ark. (2008a) tarafından yapılmıştır. Lahaye ve ark. (2008a) yaptıkları bir diğer çalışmada 8 potansiyel barkod bölgesini test etmişlerdir. *matK* ve *trnH-psbA* primerleri için çoğaltımı genel olarak başarılı bulmuşlardır. *matK* genine ait sıralama oldukça düzgün bulunmuş ancak *trnH-psbA* genine ait sıralama problem yaratmıştır ve birçok boşluğun eklenmesi gerektirmiştir. Tür içi ve türler arası divergansları değerlendirmek için birçok metrik değerlendirmişlerdir. Sonuçları toplu olarak değerlendiklerinde *matK* ve *trnH-psbA* bölgelerinin bitki DNA barkodlaması için en uygun bölgeler olduğunu işaret etmişlerdir. *matK* ekzonuna ait ikinci yarı (5' uç) kısımdan dolayı *matK* ekzonunun çoğaltılması ve sıralaması çok kolay gerçekleşmiştir ve çiçekli bitkiler için bu bölgeyi evrensel DNA barkodu olarak önermişlerdir. Çalışmamızda *trnH-psbA* lokusu içeren *Sideritis trojana* ve *Lamiaceae* familyasına ait 5 bitki türünde gözlenen sıralama problemi Lahaye ve ark. tarafından yapılmış çalışmada da gözlemlenmiş ve *matK* lokusunun çoğaltılması ve sıralamasında bir problemle karşılaşılmamıştır.

Ferri ve ark. (2008) 30 farklı bitki ile çalışmışlar ve *trnH-psbA* ve *trnF-trnE* genler arası bölgelere özgü primerler kullanmışlardır. Her iki bölge için çoğaltım ve dizileme oldukça kolay olmuştur. Araştırmacılar BLAST programından yola çıkarak iki genin birlikte analiz edilmesiyle doğru tür tanımlama olasılığının oldukça açık olduğunu

belirtmişlerdir. *trnH-psbA* lokusuna ait çoğaltım kolaylığı ve düzgün sekanslama özelliği bakımından elde edilen sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Selvaraj ve ark. 2008 yılında yapmış oldukları araştırmada *Zingiberaceae* familyasında *matK* geni ile çalışmışlardır. *matK* gen dizisini gen bankasından sağlamışlar ve analizler için kullanmışlardır. Araştırmacılar filogeni analizleri dışında *matK* geninin DNA barkodlaması için kullanımıyla ilgili açıklama getirmişlerdir. *Zingiberaceae* familya üyelerinin ayrılmaları için barkod olarak *matK* genine ait 115- 130, 680- 690 ve 1455- 1465 nükleotid pozisyonlarından seçilebileceğini önermişlerdir. *matK* geninin *Zingiberaceae* bitki familyası için DNA barkodlamada yeterli varyasyon içerdiğini ve DNA barkodlamada iyi bir aday olduğunu belirtmişlerdir.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

DNA barkodlaması tekniği şu ana kadar birçok hayvanda başarıyla uygulanmıştır. Mitokondrial sitokrom oksidaz 1 geni hayvanların çoğunda yeterli değişkenlik içermesi ve birçok hayvan grubunda başarılı bir barkod olarak kullanılmış olması sebebiyle hayvanlar için evrensel DNA barkodu olarak önerilmiştir. Ancak aynı durum bitkiler için söz konusu değildir. Bitkiler için Mitokondrial sitokrom oksidaz 1 geni yeterli değişkenlik içermemesi sebebiyle barkod olarak kullanılamamaktadır. Bitkilerle şu ana kadar yapılan çalışmalarda da bitkiler için kesin bir evrensel barkodun varlığının bulunduğunu söylemek doğru değildir. Ancak bitkiler için de DNA barkodlaması çalışması için evrensel barkod olabilecek aday barkodlar önerilmiştir.

Çalışmada sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, *matK* ve *trnH-psbA* primerlerini içeren *S. trojana* ve *D. trojana* türlerine ait çoğaltım başarıyla sağlanmıştır. CLUSTALW2 “Multiple Sequence Alignment” sıralama programı sonuçları *matK* lokusu içeren *D. trojana* ile birlikte 6 *Scrophulariaceae* familyası türleri için, *S. trojana* ile birlikte 29 *Lamiaceae* familyası türleri için ve *trnH-psbA* lokusu içeren *D. trojana* türü ve *Plantaginaceae* familyası türleri için problemsiz bir şekilde elde edilmiştir. Ancak *trnH-psbA* lokusu içeren *S. trojana* ile birlikte 6 *Lamiaceae* familyası türü için CLUSTALW2 programından elde edilen sıralama problemlidir. *trnH-psbA* lokusunun 6 tür için çok farklı uzunlukta olması ve bazılar arasında çok fazla boşluklar içermesi ve bu boşlukların yerinin her bir tür için farklı yerlerde olması sebebiyle, bazılarının yerleşimlerinde kaymalar ve bunun sonucunda ise sıralama da doğru eşleşmemiş bazılar gözlemlenmiştir. Bu da sıralamanın doğru olmaması sonucunu doğurmuştur. Bunun üzerine başka bir sıralama programı olan T-COFFEE “Multiple Sequence Alignment” kullanılmıştır ve türlere ait dizilerin sıralanmasında herhangi bir probleme rastlanmamıştır.

matK lokusu içeren *Lamiaceae* ve *Scrophulariaceae* familyası türleri dizileri ile elde edilen DNA barkod temelli ağaçta sıralama sonucunda göz önüne alındığında, klasik taksonomi ile uyum içerisinde bir sınıflandırma elde edilmiştir. Ancak *trnH-psbA* lokusu içeren türlere ait elde edilen DNA barkod temelli ağaç, dizilerin karşılaştırılmalı sıralama sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, bazı tutarsızlıklar gözlemlenmiştir. Bu yüzden ağacın eldesine bazı seçenekler değiştirilerek gidilmiştir ve sıralama sonuçlarıyla daha tutarlı ağaç eldesi sağlanabilmiştir.

Her iki lokus da (*matK* ve *trnH-psbA*) türlerin sınıflandırılmasında lokuslara ait dizi bakımından yeterli varyasyon içermektedir. Ancak *trnH-psbA* genler arası bölgesinin *matK* gen bölgesine göre daha fazla değişkenlik içerdiği gözlemlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada kullanılan örnekler doğrultusunda *matK* lokusu türlerin dizilerine ait sıralamada ve DNA barkod temelli ağaç elde etmedeki kolaylığı, lokusun dizi bakımından *trnH-psbA* genler arası bölgesine göre daha az değişkenlik göstermekle beraber genel olarak yeterli değişkenlik içermesi sebebiyle kara bitkileri için öz barkod adayı olarak belirlenebilir. Ancak *matK* gen bölgesinin farklı gen bölgeleriyle kombinasyon halinde kullanılmasının tür tanımlamasının temel olarak alındığı barkodlama çalışmalarında daha iyi sonuç vereceği önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Ackerfield J. ve Wen J., 2003. Evolution of Hedera (The Ivy Genus *Araliaceae*): Insights from Chloroplast DNA Data. *Int. J. Plant Sci.*, 164 (4): 593-602.
- Anker A., Hurt C. ve Knowlton N. 2007. Revision of the *Alpheus nuttingi* (Schmitt) Species Complex (Crustacea: Decapoda: Alpheidae), with Description of a New Species from the Tropical Eastern Pacific. *Zootaxa*, 1577: 41- 60.
- Armstrong K.F. ve Ball S.L., 2005. DNA Barcodes for Biosecurity: Invasive Species Identification. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360(1462): 1813-1823.
- Aydın S., Öztürk Y, Beis R. ve Başer K.H.C., 1996. Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta*, *Satureja cuneifolia* Essential Oils for Analgesic Activity. *Phytotherapy Research*, 10: 342-344.
- Başer K.H.C, Honda G. ve Miki W., 1986. *Herb Drugs and Herbalists in Turkey*. Studia Culturae Islamicae 27, Institute for The Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Tokyo, p 54.
- Başer K.H.C. ve Kırimer N., 1998. Bazı Yeni Bitki Türleri ve Türkiye Florası için Yeni Kayıtlar. *TAB Bülteni* (13-14), 57-65.
- Baytop T., 1984. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey*. Istanbul University Press, Istanbul (Turkey), 197-198.
- Baytop T., 1999. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, No 3255, 193 s.
- Berkov A., Feinstein J. Small, J. ve Nkamany M., 2007. Yeasts Isolated from Neotropical Wood Boring Beetles in SE Peru. *Biotropica*, 39: 530-538.
- Besansky N.J., Severson D.W. ve Ferdig M.T., 2003. DNA Barcoding of Parasites and Invertebrate Disease Vectors: What You Don’t Know Can Hurt You. *Trends Parasitol.*, 19: 545-546.
- Blaxter M.L., 2004. The Promise of a DNA Taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, 359: 669-679.
- Bondi M.L., Bruno M., Piozzi F., Başer K.H.C. ve Simmonds M.S.J., 2000. Diversity and Antifeedant Activity of Diterpenes from Turkish Species of *Sideritis*. *Biochem. Sys. Eco.*, 28: 299-303.

- Brennicke A., Grohmann L., Hiesel R., Knoop V. ve Schuster W., 1993. The Mitochondrial Genome on Its Way to the Nucleus: Different Stages of Gene Transfer in Higher Plants. *FEBS Lett.*, 325: 140-145.
- Bucklin A., Wiebe P.H., Smolenack S.B., Copley N.J., Beaudet J.G., Bonner K.G., Farber Lorda J. ve Pierson J.J., 2007. DNA Barcodes for Species Identification of Euphausiids (*Euphausiacea, Crustacea*). *J. Plankton Res.*, 29: 483-493.
- Carew M.E., Pettigrove V. ve Hoffmann A.A., 2005. The Utility of DNA Markers in Classical Taxonomy: Using Cytochrome Oxidase I Markers to Differentiate Australian Cladopelma (Diptera: *Chinomidae*) Midges, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 98: 587-594.
- Chase M.W., Salamin N., Wilkinson M., Dunwell J.M., Kesanakurthi R.P., Haidar N. ve Savolainen V., 2005 Land plants and DNA Barcodes: Short-Term and Long-Term Goals. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 1889-1895.
- Chase M.W., Cowan R.S., Hollingsworth P.M., Berg C.V.D., Madriñán S., Petersen G., Seberg O., Jørgensen T., Cameron K.M., Corine M., Pedersen N., Hedderson T.A.J., Conrad F., Salazar G.A., Richardson J.E., Halligsworth M.L., Barraclough T.G., Kelly L. ve Wilkinson M., 2007. A Proposal for a Standardised Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon*, 56 (2): 295-299.
- Chiba Y., 1951. Cytochemical Studies on Chloroplasts I. Cytologic Demonstration of Nucleic Acids in Chloroplasts. *Cytologia*, (Tokyo) 16: 259-264.
- Cuénoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L.W., Powell, M., Grayer, R.J., Chase, M.W. 2002. Molecular Phylogenetics of Caryophyllales Based on Nuclear 18 rDNA and Plastid *rbcL*, *atpB* and *matK* DNA Sequences. *American Journal of Botany* 89: 132-144
- Davis P.H., 1972, 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburg University Press, Vol 4: 10, Edinburg.
- Davis P.H., 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburg University Press, Vol.10, p 203, Edinburg.
- Davis P.H., 2000. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburg University Press, Vol.11, p 201, Edinburg.

- Ebach M.C. ve Holdrege C., 2005. DNA Barcoding is No Substitute for Taxonomy. *Nature*, 434: 697.
- Edwards D., Horn A., Taylor D., Savolainen V. ve Hawkins J.A., 2008. DNA Barcoding of a Large Genus *Aspalathus* L. *Taxon*, 57 (4): 1317-4E(-1312).
- Ekrem T., Willassen E. ve Stur E., 2007. A Comprehensive DNA Sequences Library is Essential for Identification with DNA Barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 530-542.
- Evans M.K., Wortley H.A. ve Mann G.D., 2007. An Assessment of Potential Diatom “Barcode” Genes (*coxI*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and Their Effectiveness in Determining Relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*, 158: 349-364.
- Ferri G., Alú M., Corradini B., Angot A. ve Beduschi G., 2008. Land Plant Identification in Forensic Botany: Multigene Barcoding Approach. *Forensic. Sci. Int. Gene. Suppl.*, 1 (1): 593-595.
- Frézal L. ve Leblois R., 2008. Four Years of DNA Barcoding: Current Advances and Prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 727-736.
- Gomez A., Wright P.J., Lunt D.H., Cancino J.M., Carvalho G.R. ve Hughes R.N., 2007. Mating Trials Validate the Use of DNA Barcoding to Reveal Cryptic Speciation of a Marine Bryozoan Taxon. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 274: 199-207.
- Gompert Z., Nice C.C., Fordyce J.A., Forister M.L. ve Shapiro A.M., 2006. Identifying Units for Conservation Using Molecular Systematics: The Cautionary Tale of the Karner Blue Butterfly. *Molecular Ecology*, 15: 1759-1768.
- González A.G., Fraga B.M., Hernández M.G. ve Luis J.G., 1972. Siderin, a New Coumarin from *Sideritis canariensis*. *Phytochem.*, 11 (6): 2115.
- Gregory T.R., 2005. DNA Barcoding Does Not Compete with Taxonomy. *Nature*, 434: 1067.
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N. ve Hickey D.A., 2007. DNA Barcoding : How It Complements Taxonomy, Molecular Phylogenetics and Population Genetics. *TRENDS in Genetics*, 23 (4): 167-172.
- Hamilton M.B, Braveman J.M ve Soria Hrnanz D.F., 2003. Patterns and Relative Rates of Nucleotide and Insertion/Deletion Evolution at Six Chloroplast Intergenic

- Regions in New World Species of the *Lecythidaceae*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20: 1710-1721.
- Handfield D. ve Handfield L., 2006. A New Species of *Plusia* (*Lepidoptera: Noctuidae*) from North America. *Can. Entomol.*, 138: 853-859.
- Hebert P.D., Cywinska A. Ball S. ve deWaard J.R., 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. B*, 270: 313-321.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S. ve Francis C.M., 2004. Identification of Birds Through DNA Barcodes. *PLoS Biol.*, 2 (10): e312.
- Huang J., Xu Q., Sun Z.J., Tang G.L. ve Su Z.Y., 2007. Identifying Earthworms Through DNA Barcodes. *Pedobiologia*, 51: 301-309.
- International Hapmap Consortium, 2005. A Haplotype Map of the Human Genome. *Nature*, 437: 1299-1320.
- Jansen R.K., Kaittanis C., Lee S.B., Sasaki C., Tomkins J., Alverson A.J. ve Daniell H., 2006. Phylogenetic Analyses of *Vitis* (*Vitaceae*) Based on Complete Chloroplast Genome Sequences: Effects of Taxon Sampling and Phylogenetic Methods on Resolving Relationships Among Rosids. *BMC Evol. Biol.*, 6: 32.
- Janzen D.H., 2003. Spatio Temporal Dynamics and Resource Use in the Canopy. In *Arthropods of Tropical Forests* (Basset Y., Novotny V., Miller S.E. and Kitching R.L., eds), Cambridge University Press, p 369-379.
- Janzen D.H., 2004. Setting Up Tropical Biodiversity of Conservation through Non Damaging Use: Participation by Parataxonomists. *J. Appl. Ecol.*, 41: 181-187.
- Janzen D., Hajibabaei M., Burns J.M., Hallwachs W., Remigio E. ve Hebert P.D.N., 2005. Wedding Biodiversity Inventory of a Large and Complex *Lepidoptera* Fauna with DNA Barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 1835-1845.
- Kırimer N., Tabanca N., Tümen G., Duman H. ve Başer K.H.C., 1999. Composition of the Essential Oils of Four Endemic *Sideritis* Species from Turkey. *Flav. and Frag.J.*, 14: 421-425.
- Kondo, K., Shiba, M., Yamaji, H., Morota, T., Zhengmin, C., Huixia, P., Shoyama, Y. 2007. Species Identification of *Licorice* Using nrDNA and cpDNA Genetic Markers. *Biol. Pharm. Bull.* 30(8): 1497-1502

- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weight L.A. ve Janzen D.H., 2005. Use of DNA Barcodes to Identify Flowering Plants. *PNAS*, 102 (23): 8369-8374.
- Kress W.J. ve Erickson D.L., 2007. A Two Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Codings *rbcL* Genes Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *Public Library of Science Biology*, 2: e508.
- Lahaye R., Bank M.V.D., Bogarin D., Warner J., Pupilin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Baraclough T.G. ve Savolainen V., 2008a. DNA Barcoding of the Floras of Biodiversity Hotspots. *PNAS*, 105 (8) 2934-2928.
- Lahaye R., Bank M.V.D., Maurin O., Duthoit S. ve Savolainen V., 2008b. A DNA Barcode for the Flora of the Kruger National Park (South Africa). *South African Journal of Botany*, 370-371.
- Lahaye R., Savolainen V., Duthoit S., Maurin O. ve van der Bank M., 2008c. A Test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as Potential Plant DNA Barcodes Using the Flora of the Kruger National Park as a Model System (South Afrika). *Nature Preceedings*, hdl: 10101/npre. 2008. 1896. 1: Posted 16 May 2008.
- Lambert D.M., Baker A., Huynen L., Haddrath O., Hebert P.D.N. ve Millar C.D., 2005. Is a Large Scale DNA Based Inventory of Ancient Life Possible. *Journal of Heredity*, 96 (3): 279-284.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna P., McGettigan P.A., McWilliam H., Valetin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. ve Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X Version 2: *Bioinformatics*, 23 (21): 2947- 2948.
- Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M. ve Spratt B.G., 1996. Multilocus Sequence Typing: a Portable Approach to the Identification of Clones Within Populations of Pathogenic Microorganisms. *Proc. Natl. acad. Sci.*, 95 (6): 3140-3145.
- Margulis L., 1970. *Origin of Eukaryotic Cells*, Yale University Press, New Haven.
- Martin W. ve Herrmann R.G., 1998. Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Pl. Physiol.*, 118: 9-17.

- Meier R., Shiyang K., Voidya G. ve Peter K.L.Ng., 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in *Diptera*: A Tail of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, 55: 715-728.
- Meyer C.P. ve Paulay G., 2005. DNA Barcoding Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *Public Library of Science Biology*, 3: e422.
- Nelson L.A., Wallman J.F. ve Dowton M., 2007. Using COI Barcodes to Identify Forensically and Medically Important Blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 21: 44-52.
- Newmaster S.G., Fazekas A.J. ve Ragupathy S., 2006. DNA Barcoding in Land Plants: Evaluation of *rbcL* in a Multigene Tiered Approach. *Can. J. Bot.*, 84: 335-341.
- Newmaster S.G., Fazekas A.J., Steeves A.D. ve Jarovec J., 2007. Testing Candidate Plant Barcode Regions in *Myristicaceae*. *Molecular Ecology Notes*, 8 (3): 480-490.
- Özcan M., Chalchat J.C. ve Akgül A., 2001. Essential Oil Composition of Turkish Mountain Tea (*Sideritis* spp.). *Food Chem.*, 75: 459-463.
- Özel N. ve Gemici Y., 2001. Kazdağları'nda Flora ve Vegetasyon. *Kazdağları 1. Ulusal Sempozyumu Bildirileri*, Edremit.
- Öztürk Y., Aydın S., Öztürk N. ve Başer K.H.C., 1996. Effects of Extracts from Certain *Sideritis* Species on Swimming Performance in Mice. *Phytother. Res.*, 10: 70-73.
- Park H., Park I.J., Lee S.Y., Han K.S., Yang C.Y., Boo K.S., Park K.T., Lee J.W. ve Cho S., 2008. Molecular Identification of *Adoxophyes orana* Complex (Lepidoptera: Tortricidae) in Korea and Japan. *Journal of Asia Pacific Entomology*, 11: 49-52.
- Pegg G.G., Sinclair B., Briskey L. ve Aspden W.J., 2006. MtDNA Barcode Identification of Fish Larvae in the Southern Great Barrier Reef, Australia. *Sci. Mar.*, 70: 7-12.
- Race H.L., Herrmann R.G. ve Martin W., 1999. Why Have Organelles Retained Genomes?. *Trends Genet.*, 15: 364-370.
- Ravi V., Khurana J.P., Tyagi A.K. ve Khurana P., 2008. An Update on Chloroplast Genomes. *Pl Syst. Evol.*, 217: 101-122.
- Ratnasingham S. ve Hebert P.D.N., 2007. Bold: The Barcoding of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x.

- Robba L., Russell S.J., Barker G.L. ve Brodie J., 2006. Assessing the Use of the Mitochondrial *Cox I* Marker for Use in DNA Barcoding of Red Algae (*Rhodophyta*). *American Journal of Botany*, 93 (8): 1101-1108.
- Rubinoff D., Cameron S. ve Will K., 2006. Are Plant DNA a Search for the Holy Grail?. *Trends in Ecology and Evolution*, 21 (1): 1-2.
- Rusch D.B., Halpern A.L., Sutton G., Heiderberg K.B, Williamson S., Yooseph S., Wu D., Eisen J.A., Hoffman J.M., Bemington K., Beeson K., Tran B., Smith H., Baden Tillson H., Stewart C., Thorpe J., Freeman J., Andrews Pfannkoch C., Venter J.E., Li K., Kravitz S., Heidelberg J.F., Utterback T., Rogers Y.H., Falcon LI., Souza V., Bonilla Rosso G., Eguiarte L.E., Karl D.M., Sathyendranath S., Platt T., Bermingham E., Gallardo V., Tamayo Castilla G., Ferrari M.R., Strausberg R.L., Nealson K., Friedman R., Fraizer M. ve Venter J.C., 2007. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: North Atlantic Through Eastern Tropical Pacific. *Plos Biol.*, 5 (3) e77: 398-431.
- Sager R. ve Ishida M.R., 1963. Chloroplast DNA in Chlamydomonas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50: 725-730.
- Sambrook J. ve Russell D.W., 2001. Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. In *Molecular Cloning*, Appendix 8, Volume 3, 3rd Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sass C., Little D.P., Stevenson D.Wm. ve Specht D., 2007. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads. *PLoS ONE*, 2 (11): e1154.
- Savolainen V., Cowan R.S., Vogler A.P., Roderick G.K. ve Lane R., 2005. Towards Writing the Encyclopaedia of Life: an Introduction to DNA Barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360 (1462): 1805-1811.
- Saunders G.W., 2005. Applying DNA Barcoding to Red Macroalgae: A Preliminary Appraisal Holds Promise for Future Applications. *Phil. Trans R. Soc. B*, 360: 1879-1888.
- Seçmen Ö., Gemici Y., Görk G., Bekat L. ve Leblebici E., 1970. *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116 Bornova, İzmir.

- Seifert K.A., Samson R.A., Waard J.R., Houbraken J., Levesque C.A., Moncalvo J.M., Seize Louis G. ve Hebert P.D.N., 2007. Prospects for Fungus Identification Using COI DNA Barcodes, with *Penicillium* as a test case. *PNAS*, 104 (10): 3901-3906.
- Selvaraj D., Sarma R.K. ve Sathishkumar R., 2008. Phylogenetic Analysis of Chloroplast matK Gene from *Zingiberaceae* for Plant DNA Barcoding. *Bioinformation*, 3 (1): 24-27.
- Sezik E. ve Ezer N., 1983. Türkiye’de Halk İlacı ve Çay Olarak Kullanılan Bitkiler Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar I, *Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath. *Doğa Bilim Dergisi Tıp*, 7: 163-168.
- Sezik E. ve Ezer N., 1984. Phytochemical Investigations on the Plants Used as Folk Medicine and Herbal Tea in Turkey. *Acta Pharm.Turc.*, 26: 4-9.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E. ve Small R.L., 2005. The Tortoise and the Hare II: Relative Utility of 21 Noncoding Chloroplast DNA Sequences for Phylogenetic Analyses. *Amer. J. Bot.*, 92: 142-166.
- Schindel D.E. ve Miler S.E., 2005. DNA Barcoding a Useful Tool for Taxonomists. *Nature*, 435 (7038): 17.
- Schneider H. ve Schuettpelz E., 2006. Identifying Fern Gametophytes Using DNA Sequences. *Molecular Ecology Notes*, 6: 989-991.
- Smith M.A., Fisher B.L. ve Hebert P.D.N., 2005. DNA Barcoding for Effective Biodiversity Assessment of a Hyperdiverse Arthropod Group: The Ants of Madagascar. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*, 360: 1825-1834.
- Smith M.A., Woodley N.E., Janzen D.H., Hallwachs W. ve Hebert P.D.N., 2006. DNA Barcodes Reveal Cryptic Host Specificity within the Presumed Polyphagous Members of A Genus of Parasitoid Flies (*Diptera: Tachinidae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 3657-3662.
- Ståhls G. ve Savolainen E., 2008. MtDNA COI Barcodes Reveal Cryptic Diversity in the *Baetis vernus* Group (*Ephemeroptera, Baetidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 82-87.

- Stocking C. ve Gifford E., 1959. Incorporation of Thymidine into Chloroplasts of *Spirogyra*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1: 159-164.
- Stoeckle M., 2003. Taxonomy, DNA and the Bar code of Life. *Biosciences*, 53: 796-797.
- Sugita T., Nishikawa A. ve Shinoda T., 1998. Identification of *Trichosporon asahii* by PCR Based on Sequences of the Internal Transcribed Spacer Regions. *J. Clin. Microbiol.*, 2742-2744.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A, Vermet T., Corthier G., Brochmann C. ve Willerslev E., 2007. Power and Limitations of the Chloroplast *trnL* (UAA) Intron for the Plant DNA Barcoding. *Nucl. Acids Res.*, 35: e14.
- Tamura K., Dudley J, Nei M. ve Kumar S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analyses (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tanker M. ve Tanker N., 1973. *Farmakognozi Ders Kitabı*. Cilt 1 Özlük Matbaası, İstanbul.
- Tanker M., Kurucu S. ve Tarhan O., 1988. Türkiye’de Yetişen *Digitalis* Türlerinin Kalbe Etkili Glikozitlerinin Teknik Ölçüde Elde Edilmesi İmkanlarının ve Maliyet Unsurlarının Saptanması. *Doğa TU Tıp ve Ecz. D.*, 7 (163): 173-182
- Teletchea F., Bernillon J., Duffrais M., Laudet V. ve Hänni C., 2008. Molecular Identification of Vertebrate Species by Oligonucleotide Microarray in Food and Forensic Samples. *J. Appl. Ecol.*, 45 (3): 967-975.
- Timmis J.N., Ayliffe M.A., Huang C.Y. ve Martin W., 2004. Endosymbiotic Gene Transfer: Organelle Genomes Forge Eukaryotic Chromosomes. *Nat. Rev. Genet.*, 5: 123-135.
- Tomas Barreran F., Rejdali M., Harborne J.B. ve Heywood V.H., 1988. External and Vacuolar Flavonoids from Ibero- North African *Sideritis* Species. A Chemosystematic Approach. *Phytochem.*, 27 (1): 165-170.
- Uysal İ. ve Öztürk M., 1991. *Digitalis trojana* Ivan. Endemik Türünün Morfolojisi, Anatomisi ve Ekolojisi. *Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Dergisi*, C:3, S:1, 53-61.

- Vischi M., Arzenton F., De Paoli E., Paselli S., Tomat E. ve Olivieri A.M., 2006. Identification of Wild Species of Sunflowers by a Specific Plastid DNA Sequence. *HELIA*, 29 (45): 11-18.
- Walton C., Sharpe R.G., Pritchard S.J., Thelwell N.J. ve Butlin R.K., 1999. Molecular Identification of Mosquito Species. *Biol. J. Linn. Soc.*, 68: 241-256.
- Weigel D. ve Glazebrook J., 2002. *Arabidopsis A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Chapter 5, 168-169.
- Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H., Karch H., Reeves P.R., Maiden M.C.J., Ochman H. ve Achtman M., 2006. Sex and Virulence in *Escherichia coli*: an Evolutionary Perspective. *Mol. Microbiol.*, 60 (5): 1136-1151.
- Woese C.R., 1996. Phylogenetic Trees: Whither Microbiology?. *Curr. Biol.*, 1060-1063.
- Yeşilada E. ve Ezer N., 1989. The Antiinflammatory Activity of some Sideritis Species Groeng in Turkey. *Int. J. Crude Drug Res.*, 27 (1): 38-40.
- Yoo H.S., Eah J.Y., Kim J.S., Kim Y.J., Min M.S., Paek W.K., Lee H. ve Kim C.B., 2006. DNA Barcoding of Korean Birds. *Molecules and Cells*, 22 (3): 323-327.
- Zhou J., Daevey M.E., Figueras J.B., Rivkina E., Gilichinsky D. ve Tiedje J.M., 1997. Phylogenetic Diversity of a Bacterial Community Determined From Siberian Tundra Soil DNA. *Microbiology*, 143: 3913-3919.
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>.
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>.
- www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.
- The International Plant Names Index. Retrieved December 12, 2008, from http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=8020961&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3Ddigitalis%2Btrojana%26output_format%3Dnormal.

EKLER

Ek 1. Özütleme Tamponu için kullanılan stok çözeltiler

Kullanılan stok çözeltiler	Özütleme tamponu için son derişim	1 ml Özütleme tamponu için stok çözeltilerden alınan hacim
0,5 M Tris- Cl (pH: 7,5)	200 mM Tris-Cl (pH: 7,5)	400 µl
1M NaCl	250 mM NaCl	250 µl
0,25 M EDTA (pH: 8)	25 mM EDTA (pH: 8)	100 µl
%10 SDS	%0,5 SDS	50 µl
dH ₂ O		200 µl
Son Hacim		1000 µl

Ek 2. Genomik DNA ayrıştırılması için kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması

Stok çözelti	Alınan miktar (gr)	Son hacim (ml)*	Son derişim
Tris- Cl (pH: 7,5)**	6,055	100	0,5 M
Tris- Cl (pH: 8,0)**	12,11	100	1 M
EDTA (pH: 8,0)***	9,306	100	0,25 M
EDTA	18,612	100	0,5 M
NaOH	40	100	10 N
NaCl	5,85	100	1 M
HCl	0,3 ml (%37'lik çözelti)	100	0,1N

*Son hacmi tamamlamak için dH₂O kullanılmıştır.

**pH 0,1 N HCl ile ayarlanmıştır.

***pH 10 N NaOH ile ayarlanmıştır.

Ek 3. DNA'nın çöktürülmesi için kullanılan stok çözeltilerin hazırlanması

Stok çözelti	Alınan miktar (gr)	Son hacim (ml)*	Son Derişim
Tris- Cl (pH: 8,0)**	12,11	100	1 M
EDTA	18,612	100	0,5 M
Sodyum Asetat (pH: 5,2)***	24,609	100	3 M

*Son hacmi tamamlamak için dH₂O kullanılmıştır.

**pH 0,1 N HCl ile ayarlanmıştır.

***pH asetik asit ile ayarlanmıştır.

Ek 4. Elektroforezde kullanılan 50XTAE (pH: 8,0)* tamponunun hazırlanması

Kimyasal	Alınan miktar (gr)	Tamponun son hacmi**
Tris baz	242,2	
EDTA	18,6	
		1000 ml

* pH asetik asit ile ayarlanmıştır.

** Son hacmi tamamlamak için dH₂O kullanılmıştır.

Ek 5. Elektroforezde kullanılan 6X yükleme tamponunun hazırlanması

Kimyasal	Alınan miktar	Son derişim	Tamponun son hacmi
Tris baz	12,1 mg	10 mM	
EDTA	223,3 mg	60 mM	
Bromophenol blue (%0,3'lük)	3 mg		
Nükleaz free dH ₂ O	4 ml		
Gliserol (%60'lık)	6 ml		
			10 ml

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Agaroz jelin hazırlanması.....	29
Çizelge 3.2. PCR karışımları, bileşenleri ve miktarları.....	31
Çizelge 3.3. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....	31
Çizelge 3.4. PCR segmentleri ve döngü sayısı.....	31

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Barkod of Life projelerinin önemli bileşenleri ve onların moleküler filogenin kurulmasına ve popülasyon genetiği çalışmalarına katkısı.....	3
Şekil 1.2. DNA barkod verisinin pozisyonunun hem popülasyon genetiği hem defilogenetik veri arasındaki ilişkisi.....	4
Şekil 3.1. <i>Digitalis trojana</i> Ivan. (bitki, Balıkesir- Kaz Dağları'nda toplanmıştır. Bitkinin toplandığı koordinatlar: 39° 39' 52,9" N, 26° 56' 31,1" E, Rakım 807 metre).....	26
Şekil 3.2. <i>Sideritis trojana</i> Bornm. (bitki Balıkesir- Kaz Dağları'ndan toplanmıştır. Bitkinin toplandığı koordinatlar: 39° 41' 30,2" N, 26° 52' 30,1" E, Rakım 1694 metre).....	26
Şekil 3.3. Kullanılan DNA Marker(Genscript, Katalog numarası: M101O).....	30
Şekil 3.4. NCBI BLAST programı anasayfası	33
Şekil 3.5. CLUSTALW2 Multiple Sequence Alignment Programı.....	34
Şekil 3.6. T-COFFEE Multiple Sequence Alignment Programı.....	34
Şekil 3.7. MEGA 4.1 (BETA) biyoinformatik programı.....	36
Şekil 4.1. <i>Sideritis trojana</i> ve <i>Digitalis trojana</i> türlerinin DNA özütlemesi ve DNA çöktürülmesi sonuçları.....	38
Şekil 4.2. <i>Sideritis trojana</i> ve <i>Digitalis trojana</i> türlerinin PCR sonuçları.....	38
Şekil 4.3. <i>Lamiaceae</i> familyasına ait <i>matK</i> lokusu içeren 29 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.....	41
Şekil 4.4. <i>Lamiaceae</i> familyasına ait 6 türe ait dizinin CLUSTALW2 Multiple Sequence Alignment sonucu.....	44
Şekil 4.5. <i>Lamiaceae</i> familyasına ait <i>trnH- psbA</i> lokusu içeren 6 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.....	45
Şekil 4.6. <i>Lamiaceae</i> familyasına ait 6 türe ait dizinin T- COFFEE Multiple Sequence Alignment sonucu.....	46
Şekil 4.7. <i>Lamiaceae</i> familyasına ait <i>trnH- psbA</i> lokusu içeren 6 türün T- COFFEE Multiple Sequence Alignment sonucuna göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.....	47

Şekil 4.8. <i>Lamiaceae</i> familyasına ait <i>trnH- psbA</i> lokusu içeren 6 türün T- COFFEE Multiple Sequence Alignment sonucuna göre Complete Deletion alternatifi kullanılarak elde edilen DNA barkod temelli ağaç.....	48
Şekil 4.9. <i>Scrophulariaceae</i> familyasına ait <i>matK</i> lokusu içeren 6 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.....	50
Şekil 4.10. <i>trnH- psbA</i> lokusu içeren <i>Plantaginaceae</i> familyası türlerine ve <i>Digitalis trojana</i> türüne ait 6 türün dizilerine göre elde edilen DNA barkod temelli ağaç.....	52
Şekil 4.11. <i>trnH- psbA</i> lokusu içeren <i>Plantaginaceae</i> familyası türlerinin ve <i>Digitalis trojana</i> türünün T- COFFEE Multiple Sequence Alignment sonucuna göre Complete Deletion alternatifi kullanılarak elde edilen DNA barkod temelli ağaç.....	53

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Meltem TEZCAN

Doğum Yeri: Çorlu/TEKİRDAĞ

Doğum Tarihi: 26.07.1984

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (İleri Seviye), Almanca (Orta Seviye)

BİLİMSEL FAALİYETLER

Bildiriler- Uluslararası- Ulusal:

Tezcan, M., Akı, C. *Lycopersicon esculentum* Türlerinde Trimiltox Uygulamasının Mitoz Üzerine Etkileri. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Trabzon, 23-27 Haziran 2008, Poster Sunumu.

İŞ DENEYİMİ

- 05.07.2004- 31.08.2004 Çorlu Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Acil Laboratuar
- 01.08.2005- 02.09.2005 Eczacıbaşı Sağlık Ürünleri (Lüleburgaz) Pirojen, Toksikite ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Kalite Denetim Departmanı)
- 16.01.2006- 10.02.2006 Çorlu Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı Acil Laboratuar ve Kan Alma Birimi
- 09.07.2007- 17.08.2007 Özel Çorlu Şifa Hastanesi Laboratuvarı

İLETİŞİM

meltem.tezcan@mynet.com