



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**BAZI ENDEMİK *Colchicum* L. TAKSONLARININ KLOROPLAST
GENOM DİZİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Okan ÜNLÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

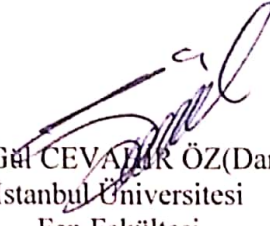
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ**

Temmuz, 2019

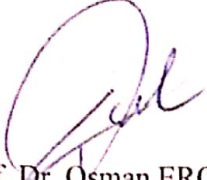
İSTANBUL

Bu çalışma, 26.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Gül CEVAPCI ÖZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Osman EROL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Şener AKINCI
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33794 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında beni yönlendiren, planlamasından yürütülmesine her aşamasında bilgi birikimini, tecrübelerini, önerilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ'e teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Yoğun bir şekilde çalışmasına rağmen değerli vaktini ayırarak, çalışmamın deneysel ve teorik kısımlarında bilgi ve deneyimleri paylaşması ile bana bilimsel bakış açısı kazandıran, kıymetli bilgi ve görüşlerini esirgemeyen, deneylerimin yetismeyeceği kaygısıyla laboratuvarında benimle beraber geceyarılarına kadar kalıp yardım eden, tüm bu süreçte iş yoğunluğum ve eşimin hamileliğinin getirdiği sorumluluklar ışığında pes etme noktasına geldiğimde beni yeniden canlandıran, hem akademisyen hem de arkadaş olmanın getirdiği hassasiyetle bu projenin tamamlanmasına benim gösterdiğim hassasiyetin daha ötesinde bir hassasiyet gösteren ve dost meclisimin başköşesinde yerlerini çoktan almış olan değerli bilim insanı dostlarım Dr. Öğr. Gör. Hande MORGİL'e, Öğr. Gör. Yusuf Can GERÇEK'e, Öğr. Gör. Kadir BOZTAŞ'a, Öğr. Gör. Adayı Uzm. Biyolog Kayhan DERECİK'e, tez yazım sürecindeki desteğinden ötürü Yüksek Biyolog Barbaros MÜLAYİM'e ve biyoinformatik analiz aşamasında Dr. Işıl TULUM ve Dr. Öğr. Gör. Vahap ELDEM'e gönülden teşekkür ederim. Yine bu yoğun süreçte iş hayatımda aksamalar meydana geldiğinde, şirkette her daim destek olan değerli iş ortağım Hüseyin ŞAHİN'e de teşekkür etmek istiyorum.

Bitki örneklerimi almamda yardımcı olan Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Bilim Bölümü Sorumlusu Burçin ÇINGAY'a ve aynı kurumun Soğanlı Bitkiler Koleksiyonu Sorumlusu Ebru AKYÜZ'e teşekkürü borç bilirim.

Yaşamım ve uzatmalı eğitim hayatım boyunca benden sevgi ve desteklerini esirgemeyen, her zaman bana inanan, çalışmalarımın başlangıcını görüp bitmesini göremeden rahmetli olan gözümün nuru annem Gülten AKSÜT'e ve sevgili kardeşim Gülay ÜNLÜ'ye, hem eğitim hayatımda hem de mesleki yaşamımda bilgisini, sevgisini, desteğini hiç eksik etmeyen sevgili eşim Ayda Göyçek ÜNLÜ'ye ve tüm bu süreci, tezimin bitmesine birkaç gün kala doğmak üzere olduğu için daha bir kaygı dolu ve meşakkatli kılarak sabır ve sebat erdemlerimin gelişimine dolaylı olarak katkı sağlayan canım kızım Lidya Karmel'e kalbî şükranlarımı sunuyorum.

Temmuz 2019

Okan ÜNLÜ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1 ENDEMİZM VE TEHLİKE ALTINDAKİ TAKSONLAR.....	3
2.1.1 Endemik Bitki Nedir?	3
2.1.2 Türkiye’de Endemik Bitkiler	3
2.1.3 Kırmızı Listedeki Bitkiler	4
2.1.3.1 Tehdit Kategorileri.....	5
2.2 <i>COLCHICUM</i> BİTKİSİ VE ÖNEMİ	7
2.2.1 Kolşisin Alkoloidi	8
2.2.2 Türkiye’de <i>Colchicum</i> Dağılımı	9
2.3 BİTKİLERDE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR	17
2.3.1 Kloroplast DNA’sı	18
2.3.2 Spesifik Markörler.....	20
2.3.3 DNA Dizileme Metotları	22
2.3.3.1 Birinci Nesil DNA Dizileme Metotları	24
2.3.3.2 İkinci Nesil DNA Dizileme Metotları	29
2.3.3.3 Üçüncü Nesil DNA Dizileme Metotları.....	31
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	34
3.1 DENEYDE KULLANILAN SARF MALZEMELER VE CİHAZLAR.....	34
3.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler	34
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	34
3.2 BİTKİ MATERYALLERİNİN HAZIRLANIŞI	35
3.3 ÖRNEKLERDEN DNA İZOLASYONU	36

3.4 DNA İZOLATLARININ KALİTE ÖLÇÜMÜ	36
3.5 ÖRNEK DNA'LARININ DİZİLENMESİ VE BİYOİNFORMATİĞİ	37
4. BULGULAR	38
4.1 <i>C. LINGULATUM</i> SUBSP. <i>RIGESCENS</i> BULGULARI.....	38
4.2 <i>C. DAVISII</i> BULGULARI	42
4.3 <i>C. BAYTOPİORUM</i> BULGULARI	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	58
ÖZGEÇMİŞ	59



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: <i>Colchicum</i> 'un genel görünüşü ve taksonomisi.	2
Şekil 2.1: <i>Colchicum autumnale</i> L. bitkisinin genel görünüşü (a) ve kolşisin alkaloidinin kimyasal yapısı (b) (Rodriguez-Garcia ve diğ., 2017).	9
Şekil 2.2: <i>Colchicum baytopiorum</i> petal ve stamen görünümü (Pacific Bulb Society, 2019).	14
Şekil 2.3: Türkiye'ye endemik <i>Colchicum baytopiorum</i> 'un yayılım gösterdiği alan (TÜBİVES, 2019).	14
Şekil 2.4: <i>Colchicum davisii</i> petal ve anter görünümü (Svensson, 2015).	15
Şekil 2.5: Türkiye'ye endemik <i>Colchicum davisii</i> 'nin yayılım gösterdiği alan (TÜBİVES, 2019).	15
Şekil 2.6: <i>Colchicum lingulatum subsp. rigescens</i> petal ve anter görünümü (Brink, 2010).	16
Şekil 2.7: Türkiye'ye endemik <i>Colchicum lingulatum ssp. rigescens</i> yayılım gösterdiği alan (TÜBİVES, 2019).	16
Şekil 2.8: (A) Plastid DNA'sının yapısal olarak belirlenmiş dört kısmı, (B) fonksiyonel olarak ayrılmış üç kısmı (Knox, 2014).	18
Şekil 2.9: Kloroplast DNA'sı ve gen bölgelerinin bir görünümü (Sugiura ve diğ., 1986).	19
Şekil 2.10: Plastid genomunda cpDNA barkotlarına bir örnek; <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinin kloroplast DNA'sının barkotları (Vijayan ve Tsou, 2010).	21
Şekil 2.11: Tüm genomu dizilenen ilk canlı ΦX174 Lambda faj (Sanger ve diğ., 1977).	23
Şekil 2.12: Maxam-Gilbert dizileme yöntemi (Maxam ve Gilbert, 1977).	25
Şekil 2.13: Sanger dizileme yöntemi (Wen ve Zhong, 2018).	27
Şekil 2.14: Pyro dizileme yöntemi (Siqueira ve diğ., 2012).	28
Şekil 2.15: İkinci nesil dizileme yönteminden Illumina'nın çalışma prensibi (Kamps ve diğ., 2017).	30
Şekil 2.16: SMRT dizileme yöntemi (Eid, ve diğ., 2009).	32

Şekil 2.17: Nanopor teknolojisi ile DNA dizileme yöntemi (Göpfrich ve Judge, 2018).	33
Şekil 4.1: <i>C. lingulatum subsp. rigescens</i> halkasal cpDNA'sı.	41
Şekil 4.2: <i>C. davisii</i> halkasal cpDNA'sı.	44
Şekil 4.3: <i>C. baytopiorum</i> halkasal cpDNA'sı.	47
Şekil 5.1: <i>C. lingulatum subsp. rigescens</i> ile <i>C. autumnale</i> cpDNA haritalandırması.	49
Şekil 5.2: <i>C. davisii</i> ile <i>C. autumnale</i> cpDNA haritalandırması.	49
Şekil 5.3: <i>C. baytopiorum</i> ile <i>C. autumnale</i> cpDNA haritalandırması.	49
Şekil 5.4: Tez çalışmasında kullanılan <i>Colchicum</i> taksonlarının başka <i>Colchicum</i> taksonlarından bazıları ve farklı bitkiler ile matK geni üzerinden filogenetik ağacı.	50

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Türkiye’de yetişen <i>Colchicum</i> taksonları ve yetiştikleri bölgeler.....	10
Tablo 2.2: Plastid ve nükleer markörler	21
Tablo 2.3: Nükleer genomda DNA barkotlarına bir örnek; <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinin nrDNA’sının ITS barkotları (Vijayan ve Tsou, 2010).	21
Tablo 2.4: Nükleer genomda DNA barkotlarına bir örnek; <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinin nrDNA’sının ITS barkotları (Vijayan ve Tsou, 2010).	21
Tablo 2.5: Maxam-Gilbert Dizileme’de kullanılan baza özgü DNA kesme ve işaretleme yolları.	24
Tablo 3.1: Tez çalışması esnasında kullanılan sarf malzemelerin listesi.	34
Tablo 3.2: Tez çalışması esnasında kullanılan cihazların görselleri.	34
Tablo 3.3: Tez çalışmasındaki <i>Colchicum</i> taksonlarının nanofotometrik ölçüm değerleri.....	37
Tablo 4.1: <i>C. lingulatum subsp. rigescens</i> ’in cpDNA analizinde atomik kompozisyonu [(a): Tek zincir DNA’dan elde edilen bilgiler, (b): Çift zincir DNA’dan elde edilen bilgiler].	38
Tablo 4.2: <i>C. lingulatum subsp. rigescens</i> ’in cpDNA analizinde nükleotid dağılımı.	38
Tablo 4.3: <i>C. lingulatum subsp. rigescens</i> ’in cpDNA analizinde di-nükleotid sayımı ve frekansı.	39
Tablo 4.4: <i>C. lingulatum subsp. rigescens</i> ’in cpDNA analizinde kodon bölgelerinin kodon istatistikleri, sayımı ve frekansı.	40
Tablo 4.5: <i>C. lingulatum subsp. rigescens</i> ’in cpDNA analizinde kodon pozisyonlarındaki nükleotid sayımı ve frekansı.	41
Tablo 4.6: <i>C. davisii</i> ’nin cpDNA analizinde atomik kompozisyonu [(a): Tek zincir DNA’dan elde edilen bilgiler, (b): Çift zincir DNA’dan elde edilen bilgiler].	42
Tablo 4.7: <i>C. davisii</i> ’nin cpDNA analizinde nükleotid dağılımı.	42
Tablo 4.8: <i>C. davisii</i> ’nin cpDNA analizinde di-nükleotid sayımı ve frekansı.	43
Tablo 4.9: <i>C. davisii</i> ’nin cpDNA analizinde kodon bölgelerinin kodon istatistikleri, sayımı ve frekansı.	43

Tablo 4.10: <i>C. davisii</i> 'nin cpDNA analizinde kodon pozisyonlarındaki nükleotid sayısı ve frekansı.....	44
Tablo 4.11: <i>C. baytopiorum</i> 'un cpDNA analizinde atomik kompozisyonu [(a): Tek zincir DNA'dan elde edilen bilgiler, (b): Çift zincir DNA'dan elde edilen bilgiler].	45
Tablo 4.12: <i>C. baytopiorum</i> 'un cpDNA analizinde nükleotid dağılımı.	45
Tablo 4.13: <i>C. baytopiorum</i> 'un cpDNA analizinde di-nükleotid sayısı ve frekansı.	46
Tablo 4.14: <i>C. baytopiorum</i> 'un cpDNA analizinde kodon bölgelerinin kodon istatistikleri, sayısı ve frekansı.	46
Tablo 4.15: <i>C. baytopiorum</i> 'un cpDNA analizinde kodon pozisyonlarındaki nükleotid sayısı ve frekansı.	47



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
cm	: Santimetre
gr	: Gram
m	: Metre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
rpm	: Revolutions per minute / rotations per minute (dakikadaki devir)
Kısaltmalar	Açıklama
CBOL	: Consortium for the Barcoding of Life (Yaşam Barkot Konsorsiyumu)
cpDNA	: Kloroplast DNA'sı
DNA	: Deoksiribo nükleik Asit
IUCN	: Doğayı koruma Birliği
M.Ö.	: Milattan önce
nrDNA	: Nükleer DNA
PWG	: Plant Working Group (Bitki Çalışma Grubu)
WCU	: Dünya Koruma Birliği
WWF	: Doğal Hayatı Koruma Vakfı
yy.	: Yüzyıl
A	: Adenin (Deoksiribo nükleik Asit)
APS	: Adenozin fosfosülfat
ATP	: Adenosine Three Phosphate
C	: Sitozin (Deoksiribo nükleik Asit)
CAS ID	: Chemical Abstracts Service Identifier
CCD	: Charged Coupled Device
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat

dCTP	: Deoksisitozin trifosfat
ddATP	: Dideoksiadenozin trifosfat
ddCTP	: Dideoksisitozin trifosfat
ddGTP	: Dideoksiguanozin trifosfat
ddNTP	: Dideoksinükleotid trifosfat
ddTTP	: Dideoksitimidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
dNTP	: Nükleozit trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
G	: Guanin (Deoksiribo nükleik Asit)
ITS	: Internal Transcribed Spacer
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
OH	: Hidroksit
PVP	: Polivinilpirolidon
T	: Timin (Deoksiribo nükleik Asit)
TÜBİVES	: Türkiye Bitkileri Veri Servisi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ENDEMİK *Colchicum* L. TAKSONLARININ KLOROPLAST GENOM DİZİLERİNİN BELİRLENMESİ

Okan ÜNLÜ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Colchicum bitkisi içerdiği alkaloidler nedeniyle farmasotik açıdan, araştırma çalışmalarında kullanılan laboratuvar reaktif sarfları açısından ticari değere sahip bir bitkidir ve birçok taksonu ülkemizde yaygındır. Bu çalışmada, Türkiye’ye endemik olan *Colchicum* taksonlarından *Colchicum baytopiorum*, *Colchicum davisii* ve *Colchicum lingulatum subsp. rigescens* taksonlarından elde edilen total genomu yeni nesil dizileme yöntemiyle dizilenmiş ve genomik DNA’dan kloroplast DNA’sı ayıklanmıştır. Elde edilen veriler ile kloroplast DNA’sının bitki markörleri olan bazı genler üzerinden kloroplast DNA’ları arasındaki farklar ve benzerlikleri ortaya çıkarmak, filogenetik çalışmalara ışık tutmak, yeni markörlerin ortaya çıkması için bir adım atmak hedeflenmiştir. Bu çalışmada, toplanan 3 farklı *Colchicum* taksonunun yaprak numunelerinden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve Illumina HiSeq2000 yeni nesil dizileme (NGS) cihazında örnek materyallerin DNA tüm dizisi çıkarılmış ve CLC Genomics programı ile bu verilerin biyoinformatik analizi yapılmış ve yorumlanmıştır.

Temmuz 2019, 73 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Colchicum*, DNA izolasyonu, cpDNA, yeni nesil dizileme, biyoenformatik

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF CHLOROPLAST GENOME SEQUENCES OF SOME ENDEMIC *Colchicum* L. TAXA

Okan ÜNLÜ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Genus *Colchicum* has a commercial value in terms of laboratory reagent consumables used in research studies because of the alkaloids it contains and many taxa are common in our country. In this study, some endemic taxa from Turkey; *Colchicum baytopiorum* (C.D.Brickell), *Colchicum davisii* (C.D.Brickell) and *Colchicum lingulatum subsp. rigescens* (K.Perss.) genome, derived from leaves, sequenced with next generation sequencing methods and genomic DNA from a chloroplast DNA has been extracted. With the obtained data, it is aimed to reveal the differences and similarities between chloroplast DNAs through some genes which are plant markers of chloroplast DNA, to shed light on phylogenetic studies and to take a step for emergence of new markers. In this study, genomic DNA was isolated from leaf samples of 3 different *Colchicum* taxa, and DNA whole sequence of sample materials was extracted from Illumina HiSeq2000 new generation sequencing (NGS) device and bioinformatics analysis of these data was performed with CLC Genomics program and interpreted.

July 2019, 73 pages.

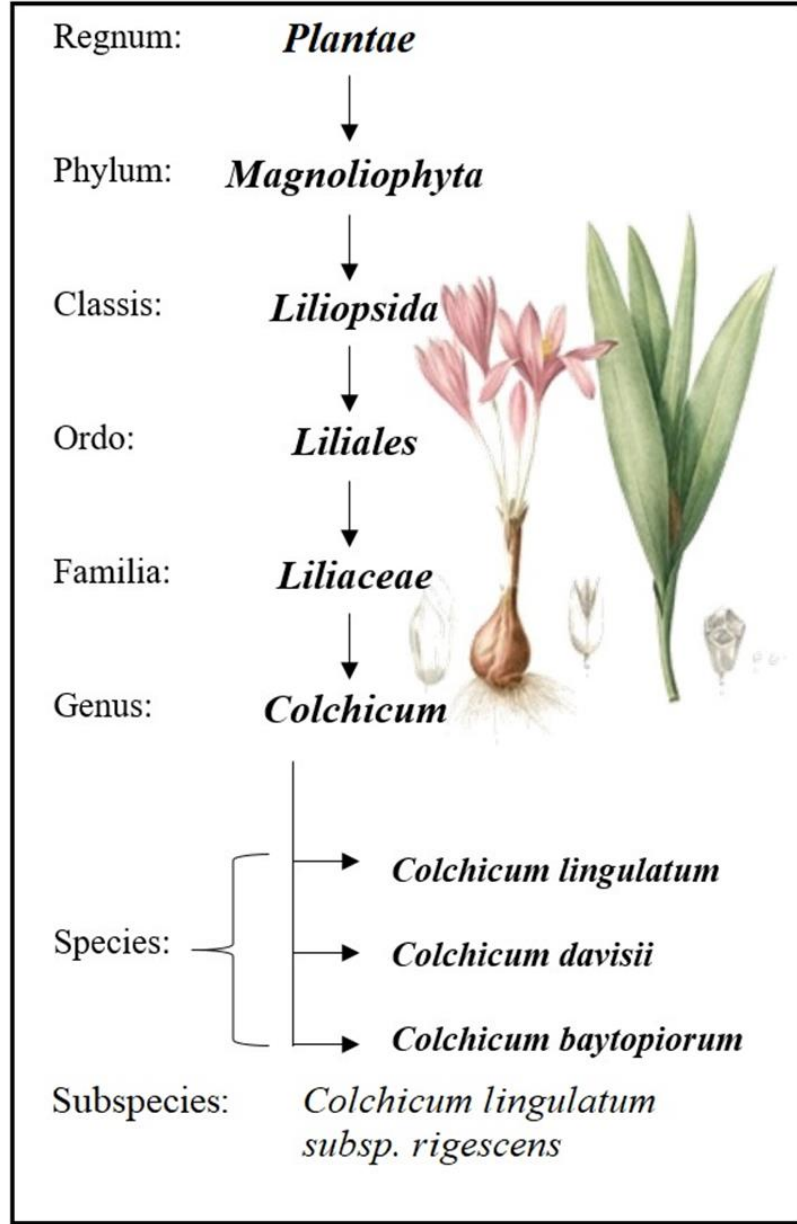
Keywords: *Colchicum*, DNA isolation, cpDNA, Next Generation Sequencing, bioinformatic

1. GİRİŞ

Colchicum, Doğu Karadeniz’den Anadolu ve Orta Avrupa’ya uzanan, yaygın adları arasında “Sonbahar Çiğdemi”, “Çayır Safranı”, “Acı Çiğdem”, “Varget Gülü”, Vargit Çiçeği”, “Güz Çiğdemi” olarak bilinen bir bitkidir. Bilimsel adı olan *Colchicum*, günümüzde Rusya, Gürcistan ve Türkiye topraklarının bir kısmını kapsayan ve Karadeniz kıyılarında bulunan M.Ö. 13. yy.’da kurulmuş antik bir ülke olan Colchis’den gelmektedir. Türkiye’nin birçok bölgesinde bulunmasının yanı sıra günümüzde Akdeniz Bölgesi başta olmak üzere Kastamonu, Giresun, Trabzon, Artvin’de yayılış gösterir.

Colchicum bitkisinin tohum çapı 2-3 mm, gövde boyu ise 25-30 cm’dir. Yaprakları şerit biçiminde olup gövdesi yumrulu, yumurta şeklinde, 500-3000 m yükselti arasında bulunan ormanlık alan açıklıkları, çayırlar ve yamaçlarda doğal olarak yetişen, tek çenekli ve çok yıllık bir bitkidir. Çiçekleri çan şeklinde, sapsız ve 1-3 adet arasında görülmektedir. Sepal yapraklar alt kısımda tüp şeklinde birleşmiş, petal yapraklar ise çiçek tablasının üstünde serbest ve pembe renktedir. Filamentler 10-18 mm boyda ve tüysüz, anterleri ise turuncu renktedir. Sonbaharın ilk aylarında çiçeklenme görülür ve bu çiçeklilik süresi birkaç ay devam eder. Sulak yerlerde yetişen zehirli bir bitkidir. İhtiva ettiği en bilindik alkaloidi kolşisinidir. Yapılan araştırmalarda *Colchicum* türlerinin tüm bitki kısımlarında kolşisin içerdiği gösterilmiştir; ancak tohumlar ve soğanlar diğer bitki kısımlarından daha fazla kolşisin içerir.

İçerdiği kolşisinin kullanım alanlarından dolayı ticari değere sahiptir. Yaygın kullanım sahası olan ilaç sanayisinde Behçet hastalığı, gut ve ailesel akdeniz ateşi (FMF) gibi hastalıkların ilaçlarında etken madde olarak kullanılır. Ülkemizde de farklı taksonları farklı bölgelerde yayılış göstermektedir. Öyle ki birçok türü Türkiye’ye endemiktir ve bu türlerden bazıları da kırmızı listede yer almaktadır. Birçok farklı çalışma disiplinleri açısından “*Colchicum* çalışmaları” hâlâ bakir bir alan olarak öne çıkmaktadır, özellikle de ülkemizdeki endemik ve tehlike altında olan taksonlar ile çalışılması öncelik arz etmektedir.



Şekil 1.1: *Colchicum*'un genel görünüşü ve taksonomisi.

Bu tez çalışmasında *Colchicum lingulatum subsp. rigescens*, *Colchicum davisii*, *Colchicum baytopiorum* türlerinin yaprak numunelerinden total DNA izolasyonları yapıp elde edilen izolatların dizilemesi ve bu dizilerden NCBI verilerinde kloroplast genomunun tüm dizisi bilinen tek *Colchicum* örneği olan *Colchicum autumnale* ile biyoinformatik yazılımlar yardımıyla haritalandırılıp örneklerin kloroplast genom dizilerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen kloroplast genom dizileri ile markör çalışmalarına, filogenetik çalışmalarda yeni yaklaşımlar oluşmasına katkı sağlanabilir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 ENDEMİZM VE TEHLİKE ALTINDAKİ TAKSONLAR

2.1.1 Endemik Bitki Nedir?

Latince “en” içinde, “demos” insanlar kelimeleri ile türetilmiş olan “endemos” sözcüğünden gelen endemik, insanların yaşadığı yer, yerli anlamına gelir. İçinde yaşadığı coğrafyanın ekolojik şartları nedeniyle sadece o coğrafyaya özgü koşullar altında yaşayabilen, başka yerde yaşama olasılığı olmayan, yöreye özgü olan türlerin ekolojik hâline “endemizm”; bitkilere ise “endemik bitki” denir (Oxford University Press, 2019).

Endemik bitkiler, zamanla değişen iklim koşullarından ötürü yayılış alanları değişebilir ya da tamamen son bulabilir. Bunun için her ülke kendi coğrafyasında yayılış gösteren bitkileri ve o bitkilerin özelliklerini iyi bilmeli ve periyodik olarak takibini yapmalıdır ki nesli tükenmek üzere olan bitkilerin kontrolünü sağlayabilsin.

Endemik bitki çeşitleri dört grupta toplanmıştır:

- Paleoendemik bitkiler (Eskiden bir bölgede yaygın olan; ama artık bulunmayan endemik bitki taksonlarıdır.)
- Şizoendemik bitkiler (Aynı kromozom sayısında daha yaygın bir taksonun ortaya çıkmasıdır.)
- Patroendemik bitkiler (Diploid bitkilerden komşu bölgelere poliploid yoluyla takson verme durumudur.)
- Apoendemik bitkiler (Yaygın diploidlerden kaynaklanan sınırlı poliploidler.) (Sivaperuman ve diğ., 2008)

2.1.2 Türkiye’de Endemik Bitkiler

Türkiye’de 10.000’in üzerinde bitki taksonu bulunmaktadır ve bunun 4.000’e yakını endemiktir. Bu sayının diğer Avrupa ülkelerine nispeten fazla olmasının nedeni, Türkiye’nin konumu, zengin iklim ve bitki örtüsüdür. Ayrıca Türkiye, üç farklı flora bölgesi özelliklerini taşır ve bu da endemik bitki sayısının fazlalığını açıklayan nedenlerden biridir. Bu üç farklı

flora bölgeleri “Avrupa Sibirya Flora Bölgesi”, “Akdeniz Flora Bölgesi” ve “İran Turan fitocoğrafik bölgesi”dir (Özhatay ve Kültür, 2006).

Tüm bu özelliklerden dolayı Anadolu ve Trakya kadar dar bir alana çok fazla çeşitlilik hâkim olmuş ve bu çeşitliliğin içinde endemik yüzlerce takson meydana gelmiştir. Bunlara örnek olarak; Kazdağı köknarı (*Abies nordmanniana subsp. equi-trojani*), sığla ağacı (*Liquidambar orientalis*), madımak (*Polygonum cognatum*), Datça hurması (*Phoenix theophrasti*), keten (*Linum usitatissimum*), kuşkonmaz (*Asparagus officinalis*), Istranca meşesi (*Quercus hartwissiana*), kasnak meşesi (*Quercus vulcanica*) gibi bitkilerin bazı taksonları verilebilir. Bu bitkiler arasında acı çiğdem bitkisinin de Türkiye’ye endemik taksonları bulunmaktadır (Atik ve diğ., 2010).

2.1.3 Kırmızı Listedeki Bitkiler

Dünyadaki bitki türlerinin korunması konusunda oldukça ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Bu bitki türlerinin dar ve sınırlı yayılışa sahip endemik olanlarına ve özellikle nesli kaybolma tehdidi altında olanlara öncelik verilmektedir. Bunun için bitki türlerinin uluslararası tehlike sınıflarından hangisine ait oldukları saptanmaktadır. Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN), Dünya Koruma Birliği (WCU), Tehlike Altındaki Bitkiler Komitesi, Dünya Doğal Yaşamı Koruma Vakfı (WWF) gibi kuruluşlar ve de ülkeler tehlike altındaki bitkileri korumak için çeşitli önlemler almaktadır. Bu bağlamda ülkemizde de tehdit altındaki bitki türlerinin listesi ve tehdit kategorileri belirlenmiş, bu amaçla Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı yayımlanmıştır.

Bir bitki türünü korumak ve yaşatmak için sadece ismini öğrenmek yeterli değildir. Bu türlerin tanımlanması, teşhis edilmesi, yayılışları, popülasyon durumları, ekolojik ihtiyaçları, fizyolojisi gibi konular hakkında ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bir bölgede floristik çalışma yapan bilim insanlarının elde ettikleri veriler ve o bölgede yaşayan halkın etnobotanik bilgileri, bir bitkinin tehdit altında olup olmadığını belirlemektedir. Bir bitkinin doğal yaşam alanında sayıca azalmaya başlaması ya da bitkinin yaşam alanının doğal ve beşeri sebeplerle tahribe uğraması o bitki türlerinin yaşamsal olarak tehdit altında olması anlamına gelmektedir (Ekim ve diğ., 2000).

Türkiye’de 2221 bitki tehdit altında bulunmaktadır. Bu bitkilerden 83 tanesi aşırı derecede kritik ve 392 takson ise doğada nesli tükenme tehlikesinin çok yüksek olduğu bir ihtimal seviyesindedir. *Colchicum micranthum* doğada nesli tükenme tehlikesi riskinin çok yüksek olduğu kategoridedir. Bu tez çalışmasında kullanılan *Colchicum baytopiorum* taksonunun ise yakın gelecekte tehdit altında olacağı öngörülmektedir (Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi web sitesi, 2019).

2.1.3.1 Tehdit Kategorileri

Bitkilerin tehdit altında olma kategorilerine göre farklı semboller kullanılır. Bu semboller aşağıda belirtilmiştir.

- **Takson Tükenmiş** (Son bireyin de öldüğüne hiçbir makul şüphe kalmamıştır.)



İngilizce “tükenmiş, sona ermiş” sözcüğü anlamına gelen “extinct”ın kısaltılmış hâli olan EX harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Kritik** (Neslinin doğada tükenme riskinin aşırı derecede yüksek olduğu kabul edilmektedir.)



İngilizce “kritik” sözcüğü anlamına gelen “criticallay”ın kısaltılmış hâli olan CR harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Tehlikede** (Neslinin doğada tükenme riskinin çok yüksek olduğu kabul edilmektedir.)



İngilizce “tehlikede” sözcüğü anlamına gelen “endangered”ın kısaltılmış hâli olan EN harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Duyarlı** (Neslinin doğada tükenme riskinin yüksek olduğu kabul edilmektedir.)



İngilizce “korunmasız, zayıf” sözcüğü anlamına gelen “vulnerable”ın kısaltılmış hâli olan VU harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Korumaya Tabi** (Yok olma tehlikesine karşı korunma durumundaki taksonlar bu sınıfa girer.)



İngilizce “korumaya tabi” kalıbına tekâmül eden “conservation dependent”ın baş harfleri olan CD harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Düşük Riskli** (Geniş yayılışlı ve nüfusu yüksektir.)



İngilizce “düşük risk” kalıbına tekâmül eden “least concern”ün baş harfleri olan LC harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Tehdide Yakın** (Ölçütleri karşılamaya yakındır veya yakın gelecekte tehdit altında olarak tanımlanma olasılığı vardır.)



İngilizce “tehdide yakın” kalıbına tekâmül eden “near threatened”ın baş harfleri olan NT harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Yetersiz Verili** (Yeterli bilgi bulunmadığı için yayılışına ve/veya nüfus durumuna bakılarak tükenme riskine ilişkin bir değerlendirme yapmak mümkün değildir.)



İngilizce “yetersiz veri” kalıbına tekâmül eden “data deficient”ın baş harfleri olan DD harfleri ile temsil edilir.

- **Takson Değerlendirilmemiş** (Henüz belirlenen ölçütlere göre değerlendirilmemiştir.)



İngilizce “değerlendirilmemiş” anlamına gelen “not evaluated”ın baş harfleri olan NE harfleri ile temsil edilir.

Bu sembollerin altında yazan sayılar, bahsi geçen ülkedeki o kategoride bulunan takson sayını gösterir.

Türkiye’de kırmızı listeye girmiş olan 5 *Colchicum* taksonu mevcuttur. Bunlar:

- *Colchicum balansae* PLANCHON (Düşük Riskli / LC)
- *Colchicum baytopiorum* C. D. BRICKELL (Tehdide Yakın / NT)
- *Colchicum bornmuelleri* FREYN (Düşük Riskli / LC)
- *Colchicum burtii* MEIKLE (Düşük Riskli / LC)
- *Colchicum micranthum* BOISS. (Tehlikede / EN)

(Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi web sitesi, 2019)

2.2 *Colchicum* BİTKİSİ VE ÖNEMİ

Türkiye'deki *Colchicum* türleri üzerinde yapılan morfolojik ve anatomik incelemelere Kasaplıgil (1961) tarafından başlanmıştır. Özyurt (1978a; 1978b), *Liliaceae* ve *Iridaceae* familyası üzerinde yaptığı çalışmalarla Türkiye'deki *Colchicum* türlerinin literatürüne katkıda bulunmuştur. 1980’lerden bu yana Türkiye’deki *Colchicum* türlerinin morfolojik ve anatomik özelliklerine daha fazla dikkat çekilmiş ve bunun üzerine morfolojik, anatomik ve sitolojik çalışmalar başlamıştır (Küçüker, The Morphological, Anatomical and Cytological Studies on

Some *Colchicum* Species of İstanbul Area, 1985). Bazı *Colchicum* türlerinin kromozom sayıları ilk kez bildirilmiştir (Küçüker ve Çelebioğlu, 1986). Örneğin; *Colchicum boissieri* türünün kromozom sayısı $2n=46$ (EGE 16429) olarak verilmektedir (Güner ve diğ., 2000).

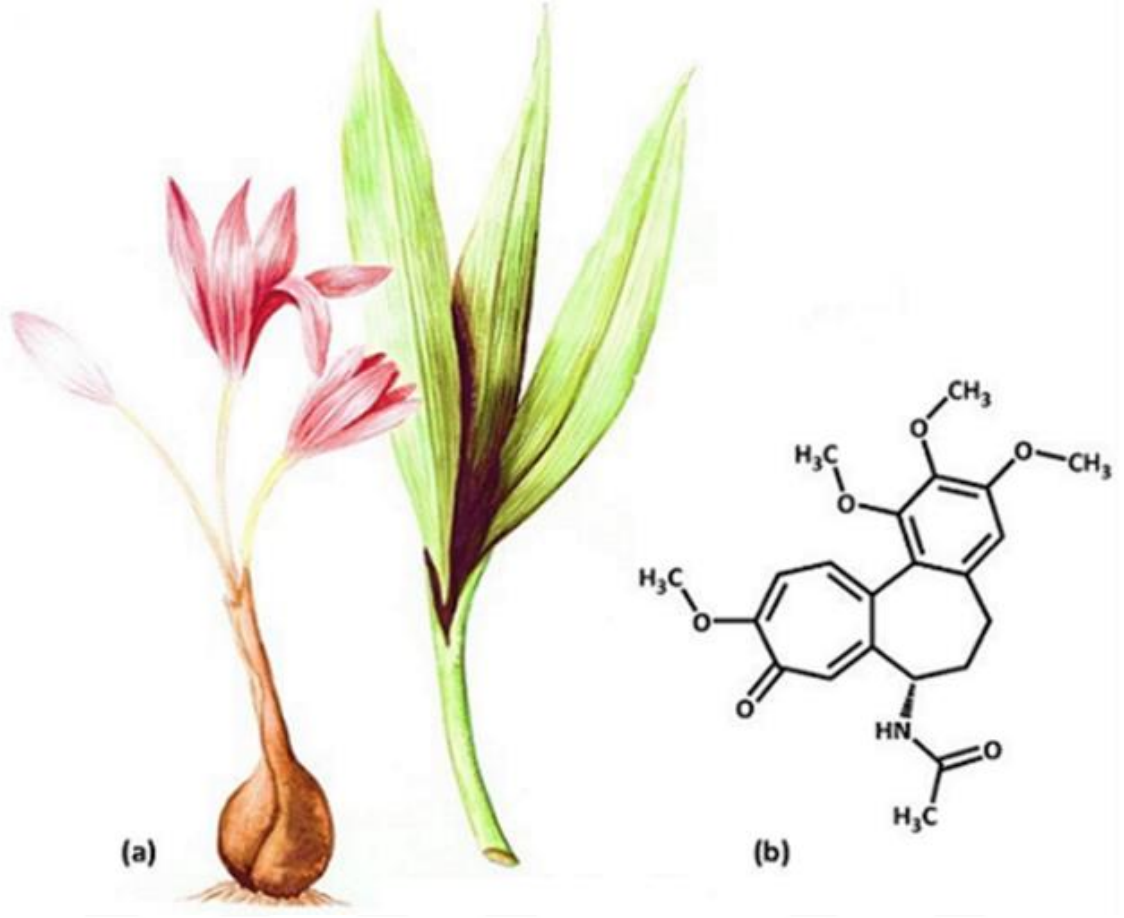
Bugüne kadar yaprak, meyve ve tohum gibi organların morfolojik ve anatomik özellikleri detaylı olarak verilmiştir (Küçüker ve Çelebioğlu, 1988). Türkiye'de ilk kez gözlenen bazı morfolojik oluşumlar bildirilmiştir (Küçüker, 1992). Öte yandan, Türkiye'deki bazı *Colchicum* türlerinin yaprak, meyve, tunik ve tohum yüzeylerinin mikromorfolojik özellikleri de (SEM) bildirilmiştir (Engel ve Küçüker, 1994).

Tohumunda bulunan kolşisin (colchicine) alkaloidi tıbbi ilaçlarda kullanılmaktadır. Behçet hastalığı, gut, Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF), romatizma, artrit gibi hastalıkların tedavisinde kolşisin kullanılmaktadır. Aynı zamanda laboratuvar çalışmalarında ticari bir ürün olarak da kullanılan kolşisin, tübülinden mikrotübüllerin oluşumuna ket vurup mitoz evresinde iğ iplikçiklerin kromozomları hücrenin kutuplarına çekmesini engeller. Bu alkaloid, kromozomların en iyi görüntülenebildiği evre olan metafaz evresinde hücreye verildiğinde hücre bölünmeyi durdurur. Sitogenetik çalışmalarda kromozomları gözleme ve karyotipleme için kolşisin kullanılmaktadır.

2.2.1 Kolşisin Alkaloidi

Colchicum taksonlarında bulunan en önemli alkaloid kolşisindir. Bu alkaloid, bitkinin yaprağında, gövdesinde, tohumunda ve diğer organlarında bulunma oranları taksondan taksona farklılık gösterebilir. Kolşisin ile ilgili olarak:

- Kimyasal formülü: $C_{22}H_{25}NO_6$
- Molekül ağırlığı: 399.437 g/mol (PubChem, 2019)
- CAS ID numarası: 64-86-8, 30512-31-3, 5843-86-7 (ChemIDplus, 2019)
- IUPAC adı: N-[(7S)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-6,7-dihydro-5H-benzo[a]heptalen-7-yl]acetamide (PubChem, 2019).



Şekil 2.1: *Colchicum autumnale* L. bitkisinin genel görünüşü (a) ve kolşisin alkaloidinin kimyasal yapısı (b) (Rodriguez-Garcia ve diğ., 2017).

2.2.2 Türkiye’de *Colchicum* Dağılımı

Türkiye, dünya genelinde yaklaşık 90 tür olan *Colchicum* listesine en yüksek katkıya sahiptir. Doğu Ege Adaları haricinde Türkiye’de 39 *Colchicum* taksonu bulunmaktadır. Bu yüksek dağılım içinde Türkiye, *Colchicum* türleri açısından en zengin ülke olma özelliği göstermektedir (Sevgi ve Küçüker, 2011).

Tablo 2.1: Türkiye’de yetişen *Colchicum* taksonları ve yetiştikleri bölgeler.

	Takson Adı ve Yazarı	Yayın	Yayılım Gösterdiği Başlıca Bölgeler
1	<i>*Colchicum antepense</i> (K.Perss.)	Bot. Jahrb. Syst. 127(2): 169 (2007)	Gaziantep, Kilis
2	<i>Colchicum atticum</i> (Spruner ex Tommas)	Flora 23 2: 730 (1840)	Sakarya, Antalya
3	<i>Colchicum balansae</i> (Planch.)	Ann. Sci. Nat., Bot. sér. 4(4): 145 (1855)	Muğla, Antalya, İçel, Gaziantep
4	<i>*Colchicum baytopiorum</i> (C.D.Brickell)	Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh 41(1): 49 (1983)	Antalya, Isparta
5	<i>Colchicum bivonae</i> (Guss.)	Cat. Pl. Hort. Boccadifalco 4 (1821)	Tekirdağ, Çanakkale, Balıkesir, Bilecik, Bolu
6	<i>Colchicum boissieri</i> (Orph.)	Atti Congr. Int. Bot. Firenze 1874: 31 (1876)	Balıkesir, İzmir, Manisa, Aydın, Konya
7	<i>*Colchicum bornmuelleri</i> (Freyn)		Amasya, Bolu, Eskişehir, Çankırı, Ankara, Sinop
8	<i>*Colchicum burtii</i> (Meikle)	Bot. Mag. 181: 134 (1977)	Çanakkale, Kütahya, Denizli, Muğla, Antalya, Konya
9	<i>Colchicum chalcedonicum</i> (Azn.)	Bull. Soc. Bot. France 44: 174 (1897)	
10	<i>Colchicum chalcedonicum subsp. chalcedonicum</i>		İstanbul
11	<i>*Colchicum chalcedonicum subsp. punctatum</i> (K.Perss.)	Candollea 53: 405 (1998)	Muğla, Aydın

Tablo 2.1 (devam): Türkiye’de yetişen *Colchicum* taksonları ve yetiştikleri bölgeler.

12	* <i>Colchicum chlorobasis</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 62: 182 (2006)	Konya
13	<i>Colchicum cilicicum</i> (Boiss.) Dammer	Gard. Chron., III, 23: 34 (1898)	Muğla, Isparta, Niğde, İçel, Adana, Osmaniye, Hatay, Kahramanmaraş
14	<i>Colchicum crocifolium</i> (Boiss.)	Diagn. Pl. Orient. 5: 67 (1844)	Urfa, Erzurum, Kars, Van, Hakkari, Diyarbakır
15	* <i>Colchicum davisii</i> (C.D.Brickell)	New Plantsman 5: 15 (1998)	Adana
16	<i>Colchicum decaisnei</i> (Boiss.)	Fl. Orient. 5: 157 (1882)	Antalya, Hatay
17	<i>Colchicum dolichantherum</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 126 (1999)	Antalya, Adana, Gaziantep
18	* <i>Colchicum figlalii</i> (Varol) Parolly & Eren	Willdenowia 37: 267 (2007)	Doğu Akdeniz
19	* <i>Colchicum heldreichii</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 98 (1999)	Konya
20	* <i>Colchicum hirsutum</i> (Stef.)	Sborn. B lghar. Akad. Nauk 22: 34 (1926)	Doğu Anadolu
21	* <i>Colchicum ignescens</i> (K.Perss.)	Bot. Jahrb. Syst. 127: 191 (2007)	Güneydoğu Anadolu
22	* <i>Colchicum imperatoris-friderici</i> (Siehe ex K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 129 (1999)	İçel
23	* <i>Colchicum inundatum</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 99 (1999)	Konya
24	<i>Colchicum kotschyi</i> (Boiss.)	Diagn. Pl. Orient. 13: 38 (1853)	Bolu, İzmir, Isparta, İçel, Kahramanmaraş, Gaziantep, Mardin, Diyarbakır, Bitlis, Muş
25	<i>Colchicum kurdicum</i> (Bornm.) Stef.	Sborn. B lghar. Akad. Nauk 22: 42 (1926)	Hakkari
26	* <i>Colchicum lagotum</i> (K.Perss.)	Bot. Jahrb. Syst. 127: 197 (2007)	Doğu Karadeniz, Doğu Anadolu
27	* <i>Colchicum leptanthum</i> (K.Perss.)	Bot. J. Linn. Soc. 135: 85 (2001)	Doğu Karadeniz

Tablo 2.1 (devam): Türkiye’de yetişen *Colchicum* taksonları ve yetiştikleri bölgeler.

28	<i>Colchicum lingulatum</i> (Boiss. & Spruner)	Diagn. Pl. Orient. 5: 66 (1844)	
29	* <i>Colchicum lingulatum</i> ssp. <i>rigescens</i> (K.Perss.)	Candollea 53(2): 411 (1998)	İstanbul, Muğla
30	<i>Colchicum macrophyllum</i> (B.L.Burt)	Kew Bull. 5: 433 (1951)	Muğla, Hatay
31	* <i>Colchicum manissadjianii</i> (Azn.) K.Perss.	Bot. Jahrb. Syst. 127: 202 (2007)	Orta Karadeniz
32	* <i>Colchicum micaceum</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 95 (1999)	İzmir, Denizli
33	* <i>Colchicum micranthum</i> (Boiss.)	Fl. Orient. 5: 162 (1882)	İstanbul
34	* <i>Colchicum minutum</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 90 (1999)	Antalya
35	* <i>Colchicum munzurensense</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 86 (1999)	Tunceli
36	* <i>Colchicum paschei</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 110 (1999)	Adıyaman
37	<i>Colchicum persicum</i> (Baker)	J. Linn. Soc., Bot. 17: 430 (1879)	Gaziantep, Şanlıurfa
38	<i>Colchicum polyphyllum</i> (Boiss. & Heldr.)	Diagn. Pl. Orient., II, 4: 121 (1859)	İçel, Adana
39	<i>Colchicum raddeanum</i> (Regel) K.Perss.	Fl. Iran. [Rechinger] 170: 22 (1992)	Erzurum, Kars
40	* <i>Colchicum sanguicolle</i> (K.Perss.)	Edinburgh J. Bot. 56: 92 (1999)	Muğla, Antalya
41	<i>Colchicum serpentinum</i> (Woronow ex Misch.)	Fl. Cauc. Crit. 3(4): 114 (1912)	Karadeniz, Güneydoğu Anadolu Bölgesi
42	* <i>Colchicum sieheanum</i> (Hausskn. ex Stef.)	Sborn. B'lgar. Akad. Nauk 22: 47 (1926)	Adana
43	<i>Colchicum soboliferum</i> (Fisch & C.A.Mey.) Stef.	Sborn. B'lgar. Akad. Nauk 22: 44 (1926)	Sakarya, Konya, Urfa, Hakkari, Adana

Tablo 2.1 (devam): Türkiye’de yetişen *Colchicum* taksonları ve yetiştikleri bölgeler

44	<i>Colchicum speciosum</i> (Steven)	Observ. Pl. Ross. 2: 69 (1824)	Bolu, Amasya, Kastamonu, Ankara, Erzurum, Gümüşhane, Giresun, Trabzon, Rize, Artvin
45	<i>Colchicum stevenii</i> (Kunth)	Enum. Pl. 4: 144 (1843)	İzmir, Antalya, İçel
46	<i>Colchicum szovitsii</i> (Fisch. & C.A.Mey.)	Index Sem. Hort. Petrop. 1: 24 (1835)	
47	<i>Colchicum szovitsii</i> subsp. <i>brachyphyllum</i> (Boiss. & Hausskn.) K.Perss.	Bot. Jahrb. Syst. 127: 221 (2007)	Adana
48	<i>Colchicum szovitsii</i> subsp. <i>szovitsii</i>		Tekirdağ, İstanbul, Sakarya, Kütahya, Isparta, Bolu, Ankara, Konya, Antalya, İçel, Adana, Kahramanmaraş, Diyarbakır, Erzincan, Gümüşhane, Erzurum, Kars, Ağrı, Van, Hakkari
49	<i>Colchicum trigynum</i> (Steven ex Adam) Stearn	J. Bot. 72: 344 (1934)	Konya, Erzurum, Kars, Van, Hakkari, Antalya, Ege Bölgesi, Karadeniz Bölgesi, İçanadolu Bölgesi
50	<i>Colchicum triphyllum</i> (Kunze)	Flora 29: 755 (1846)	Manisa, Denizli, Afyonkarahisar, Antalya, Ankara, Yozgat, İçel, Adana, Tokat, Sivas, Tunceli
51	<i>Colchicum turcicum</i> (Janka)	Oesterr. Bot. Z. 23: 242 (1873)	İstanbul, Yalova
52	<i>Colchicum umbrosum</i> (Steven)	Nouv. Mém. Soc. Imp. Naturalistes Moscou 7: 268 (1829)	Bursa, Bolu, Kastamonu, Amasya, Samsun, Trabzon, Artvin
53	<i>Colchicum variegatum</i> (L.)	Sp. Pl. 342 (1753)	İzmir, Muğla, Aydın, Burdur, Isparta, Antalya, Konya

* Türkiye'ye endemik olan taksonlar.

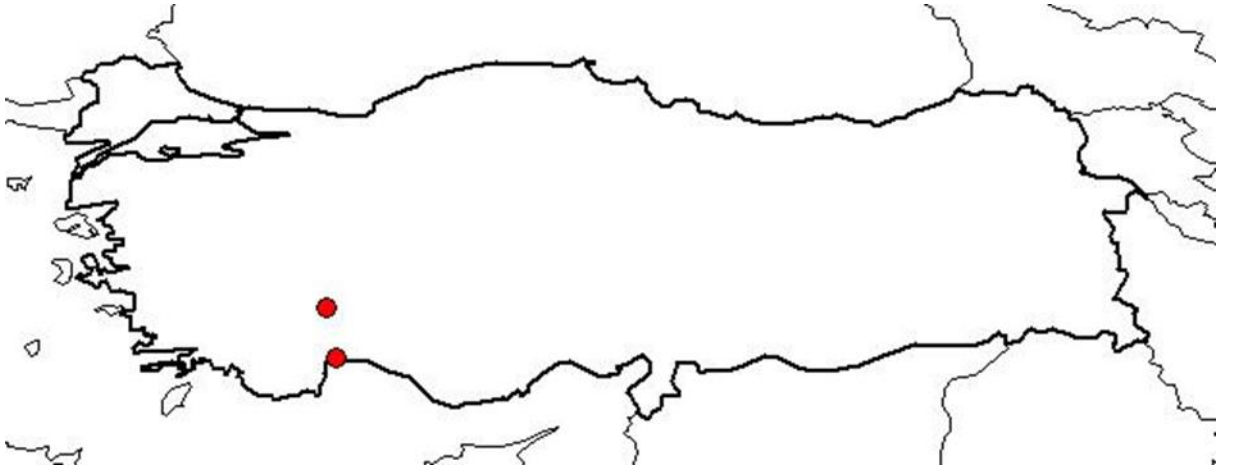
Bu çalışmanın örnekleri olan *Colchicum baytopiorum*, *Colchicum davisii* ve *Colchicum lingulatum* subsp. *rigescens* için Türkiye’deki yayılım gösterdiği bölgeler:

- *Colchicum baytopiorum*

Türkiye'nin batısından Rodos Adası'na yayılım gösteren; ama Rodos'da tükenmiş olan taksondur. 4 cm çapında pembe-mor petalleri vardır. İlkbaharda yaprak üretmekten ziyade, çiçek açarken sonbaharda küçük yapraklar üretmesi, cinsinde alışılmadık bir durumdur. Ünlü Türk Kadın Botanikçi Asuman BAYTOP (1920-2015) onuruna tür adı “baytopiourm” verilmiştir.



Şekil 2.2: *Colchicum baytopiorum* petal ve stamen görünümü (Pacific Bulb Society, 2019).



Şekil 2.3: Türkiye'ye endemik *Colchicum baytopiorum*'un yayılım gösterdiği alan (TÜBİVES, 2019).

- *Colchicum davisii*

Petalleri soluk pembe renktedir, beyaz bir çiçek tablası ve sarı belirgin anterleri vardır. Sonbaharda yetişir. Soğanları uzundur.



Şekil 2.4: *Colchicum davisii* petal ve anter görünümü (Svensson, 2015).



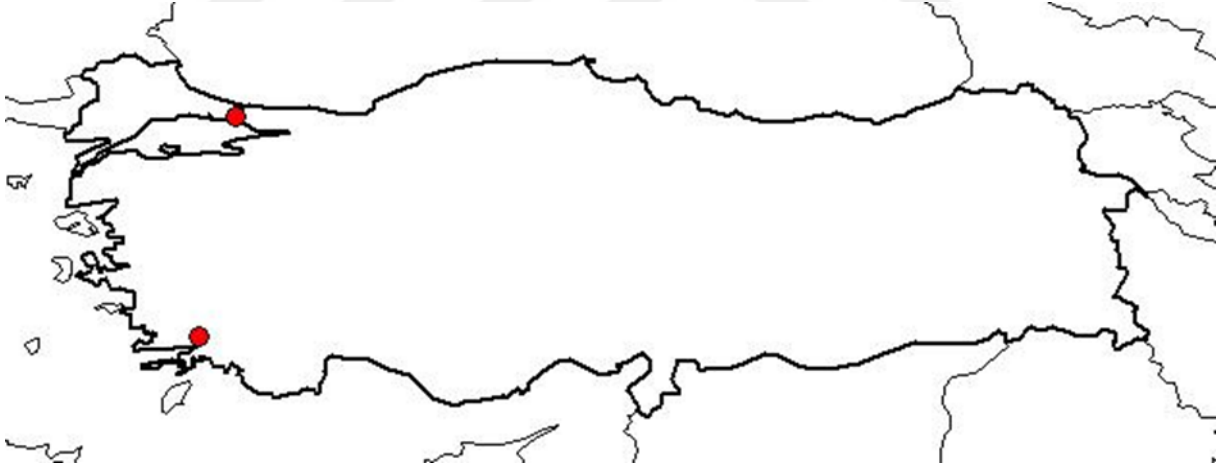
Şekil 2.5: Türkiye'ye endemik *Colchicum davisii*'nin yayılım gösterdiği alan (TÜBİVES, 2019).

- *Colchicum lingulatum subsp. rigescens*

Petalleri geniş aralıklı, 3-4 cm uzunluğunda ve pembe renklidir. Anterleri belirgin sarı renktedir. Sonbaharda çiçek açar, yaprakları çiçeklerden sonra üretilir.



Şekil 2.6: *Colchicum lingulatum subsp. rigescens* petal ve anter görünümü (Brink, 2010).



Şekil 2.7: Türkiye'ye endemik *Colchicum lingulatum ssp. rigescens* yayılım gösterdiği alan (TÜBİVES, 2019).

Bu bilgiler ışığında, Türkiye'ye endemik olan ve tehlike altında bulunan bitkileri korumak, bu bitkiler hakkında daha fazla bilgi elde etmek için ivedi bir şekilde araştırmalar yapmak öncelikle bu coğrafyanın yetiştirdiği bilim insanlarının, bilhassa biyoloji bilim dalından gelen araştırmacıların vazifesidir.

Bu yüksek lisans projesinde, cpDNA'sının tüm genomu tespit edilmesi hedeflenen örnekler arasında *Colchicum baytopiorum* türünün de bulunması, projenin önemini ve hassasiyetini önemli bir noktaya taşımaktadır.

2.3 BİTKİLERDE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR

Biyolojide filogenetik, çeşitli organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkinin incelendiği, yaşam dağılımına ve çeşitliliğine yol açan olayların düzenini yeniden yapılandıran bir bilim dalıdır ve bu ilişkiler filogeni olarak adlandırılır. Filogenetik terimi Yunanca kökenlidir, "kabile, ırk" anlamına gelen "file" veya "filon" ve "doğumla ilişkili" anlamındaki "genetikos" veya "doğum" anlamında olan "genesis" kökünden gelen terimlerden türetilmiştir (Edwards ve Cavalli-Sforza, 1964).

Organizmaların yapılarına, benzerliklerine ve kökenlerine göre sınıflandırılması ve adlandırılması olan taksonomi, filogenetikten büyük miktarda etkilenmiştir. Hem yaşayan hem de tükenmiş, yüksek sayıda yaşam çeşitliliği vardır. Biyologların, bu organizmalar hakkında ve onların birbirleriyle ilişkileri hakkında bilgilere ulaşabilmeleri için, bu organizmaların gruplar halinde sınıflandırılması da gerekir. İdeal olarak, sınıflandırma anlamlı olmalı ve keyfi olmamalıdır, yeni keşfedilen veya az bilinen organizmaların özelliklerini tahmin edebilecek şekilde yaşamın evrimsel tarihine dayanmalıdır.

Filogenetik sistematığın yaklaşımı ise evrimsel sürece, kalıtım yolundaki izleri takip ederek canlılar arasındaki yakınlık derecelerini saptamak üzerinedir (Doolittle, 1999). Bundan dolayıdır ki ana inceleme materyalleri nükleik asit zincirleri ve amino asit zincirleridir. İki canlı arasındaki benzerliği ya da farkı nükleik asit ya da amino asit zincir dizilimlerine bakarak tespit etmeye çalışır. Bitkilerde filogenetik çalışmalar hem kloroplast hem de nükleer kalıtım materyallerinin dizilimleri üzerine çalışmaları kapsar. Özellikle DNA ile yapılan çalışmalarda tüm genom dizi analizi ya da belli bir bölgenin dizi analizi filogenetik sistematığe ışık tutar.

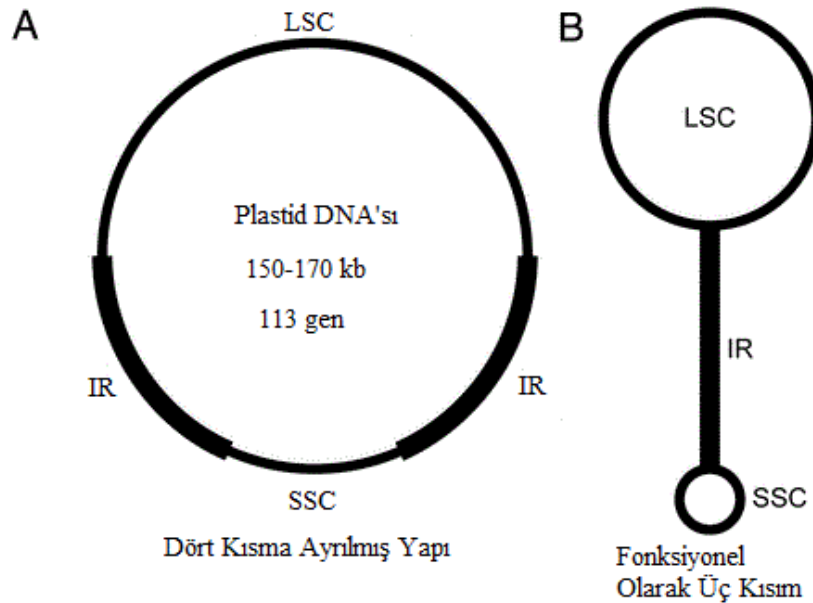
Bu yüzden filogenetik incelemelerde markör ya da tüm genom dizi çalışmaları büyük öneme sahiptir.

2.3.1 Kloroplast DNA'sı

Bir bitki hücresinin genel anlamda hayvan hücresinden ayıran en önemli özellik plastid içermesidir ve plastidler içinde en yaygın bilineni ise kloroplasttır. Kloroplast, ihtiva ettiği klorofilden ötürü yeşil rengi absorbe etmez; yansıtır, bu nedenle de yeşil görünür ve bitkinin yeşil kısımlarında mevcuttur. Kloroplast, bitkinin fotosentezinden sorumlu hücre içi organelidir, nükleer DNA'dan ayrı, aynı mitokondri gibi kendine özgü halkasal çift zincirli DNA'sı vardır ve bu da evrimsel süreç içerisinde siyanobakter olarak başlı başına bir canlı iken bitki ve bazı alg gibi ökaryotik hücrelerde simbiyotik bir ilişki ile yaşamını devam ettirdiğine işaret etmektedir.

Kendine özgü DNA'ya sahip olan kloroplastlar, DNA dizileme yöntemlerinin baş gösterdiği 1970'li yıllarda araştırmacılar için çalışma alanı olarak çok cazip idi ve ilk fiziksel kloroplast DNA haritası 1976'da mısır için yapıldı (Bedbrook ve Bogorad, 1976). Ardından ilk kloroplast geni 1977'de klonlandı (Gelvin ve diğ., 1977).

Kloroplast DNA'sı temelde 3 kısımdan oluşur. Bunlar; LSC (Large Single Copy/Geniş Tek Kopya), SSC (Small Single Copy/Küçük Tek Kopya) ve bu iki kısmı birbirinden ayıran iki kopya IR (Inverted Repeat/Ters Tekrar).



Şekil 2.8: (A) Plastid DNA'sının yapısal olarak belirlenmiş dört kısmı, (B) fonksiyonel olarak ayrılmış üç kısmı (Knox, 2014).

Tespit edilen bu genler, bitkilerin genelinde yayılış gösterme oranı, baz uzunluğu ve içeriği gibi hususlar ele alınarak taksonların sınıflandırılması ve de filogenetiğin biraz daha aydınlatılmasında etkin olan markör/barkot geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır.

2.3.2 Spesifik Markörler

Her canlı, kendine özgü nükleik asit zincir dizilimine sahiptir. Bu özgün diziler o organizmanın diğer tür ve alt türler arasında moleküler düzeyde ayrımının yapılabilmesini mümkün kılar. Bir canlının DNA'sının tüm dizisini çıkarmak diğer bir canlıdan ayırmak için kesin çözüm olsa da maliyet ve işlem süresi açısından efektif değildir. Akrabalık seviyesi yüksek olan canlılar, DNA'larında çok azı hariç yüksek oranda benzer diziler barındırırlar (Örn. İnsan ve şempanze DNA'sının benzerliği %98'in üzerindedir (Gunter ve Dhand, 2005). Benzer dizilerin dışında kalan diziler, o canlının sahip olduğu; fakat başka canlıda bulunmayan ve taksonomik ayırım için bakılması gereken dizilerdir.

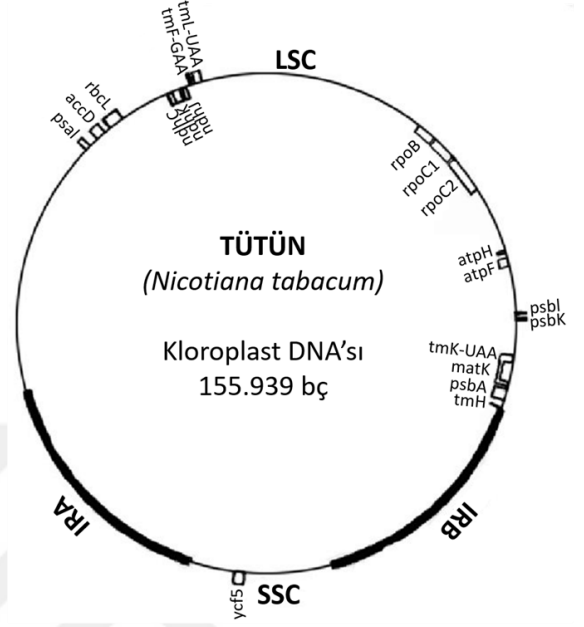
Bahsi geçen bu özgün diziler o canlının barkodu ya da markörü olarak tanımlanır. "DNA barkot" tanımı ilk olarak Hebert ve arkadaşları (2003) tarafından kullanılmıştır. Hayvanlar âleminde MT-CO1 (cox1) geni evrensel barkot olarak kullanılırken bitkiler için durum biraz daha karışıktır. Bitkilerde mitokondriyal genler, nükleotid değişim oranlarının düşük olmasından kaynaklı bitki barkodu kullanımına uygun değildir (Mower ve diğ., 2007). Bitkiler için cpDNA ve nrDNA üzerinden barkot seçimi yapılmaktadır. Dünya üzerindeki canlıların barkotlarının çıkarılmasını sağlayan, kuruluşu 2008 yılında olan ve ABD Washington DC yerleşkeli Yaşam Barkot Konsorsiyumu (CBOL: Consortium for the Barcoding of Life) bitki barkot seçimini kolaylaştırmak ve evrensel kullanıma sunmak adına farklı çalışma grupları ile değişik barkot lokuslarını araştırmaktadır (Hollingsworth, ve diğ., 2009). İdeal barkotlama, farklı bitki taksonları için kullanılabilecek DNA lokuslarına sahip, taksonları ayırabilecek filogenetik bilgiye sahip yeterlilikte olmalıdır. Ayrıca, barkot bölgesi DNA çoğaltımına izin verebilecek uzunlukta, güvenilebilir ve tekrar edilebilir olmalıdır.

Bitkilerde taksonomik ayırım için plastid genomundan ve nükleer genomdan elde edilen markörler çeşitli kombinasyonlar ile multi lokuslu çalışmalar yapılmaktadır. Bunlara örnek olarak:

Tablo 2.2: Plastid ve nükleer markörler

(Hollingsworth, ve diğ., 2009).

Plastid genomundan kodlama yapan bölge markörleri	Plastid genomundan kodlama yapmayan bölge markörleri	Nükleer ribozomal DNA'dan markörler
matK	atpF – atpH	ITS1
rbcL	trnH-psbA	ITSleu1
rpoB	psbK-psbI	ITS2
rpoC1	trnL-UAA	ITS3
ycf5	trnF-GAA	ITS4
ndhC	-	ITS5
ndhK	-	ITS1-F
ndhJ	-	ITS4-B

**Şekil 2.10:** Plastid genomunda cpDNA barkotlarına bir örnek; *Nicotiana tabacum* bitkisinin kloroplast DNA'sının barkotları (Vijayan ve Tsou, 2010).**Tablo 2.3:** Nükleer genomda DNA barkotlarına bir örnek; *Nicotiana tabacum* bitkisinin nrDNA'sının ITS barkotları (Vijayan ve Tsou, 2010).

Primer	Sekans (5' – 3')	Yorumlar
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Forward; 18S'in 5' bölgesine bağlı
ITSleu1	GTCCACTGAACCTTATCATTTAG	Forward; 18S'in 5' bölgesine bağlı

Tablo 2.4: Nükleer genomda DNA barkotlarına bir örnek; *Nicotiana tabacum* bitkisinin nrDNA'sının ITS barkotları (Vijayan ve Tsou, 2010).

ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	Forward; 5.8S'i amplifiye eden
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Reverse; 5.8S'i amplifiye eden
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse; 26S'in 5' bölgesine bağlı
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Forward; 18S'in 5' bölgesine bağlı
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Forward; 18S'in 5' bölgesine bağlı
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Reverse; 26S'in 5' bölgesine bağlı

Plastid genomundaki en çok çeşitlilik gösteren kodlama bölgelerinden biri olan matK 841 nükleotit uzunluğuna sahiptir (Hilu ve Liang, 1997). Fakat matK bölgesinin PZR'de var olan primer setleri ile çoğaltımı etkili bir şekilde yapılamadığı için 599 nükleotit uzunluğundaki rbcL gen bölgesinin matK'ye kıyasla daha düşük seviyede ayırma gücüne sahip olmasına rağmen pek çok bitki türünün genetik materyalinin çoğaltılmasının ve nükleotit dizilenmesinin daha kolay olduğu tespit edilmiştir. Herhangi iki markörün beraber kullanılması kombinasyonları bu rbcL ve matK markörlerinin beraber ayırım gücünden daha etkili olmadığı belirtilmiştir (Hollingsworth ve diğ., 2009). Buna ek olarak Hollingsworth ve diğ. (2011) rbcL+matK ve ek markör kullanımını tavsiye etmiştir.

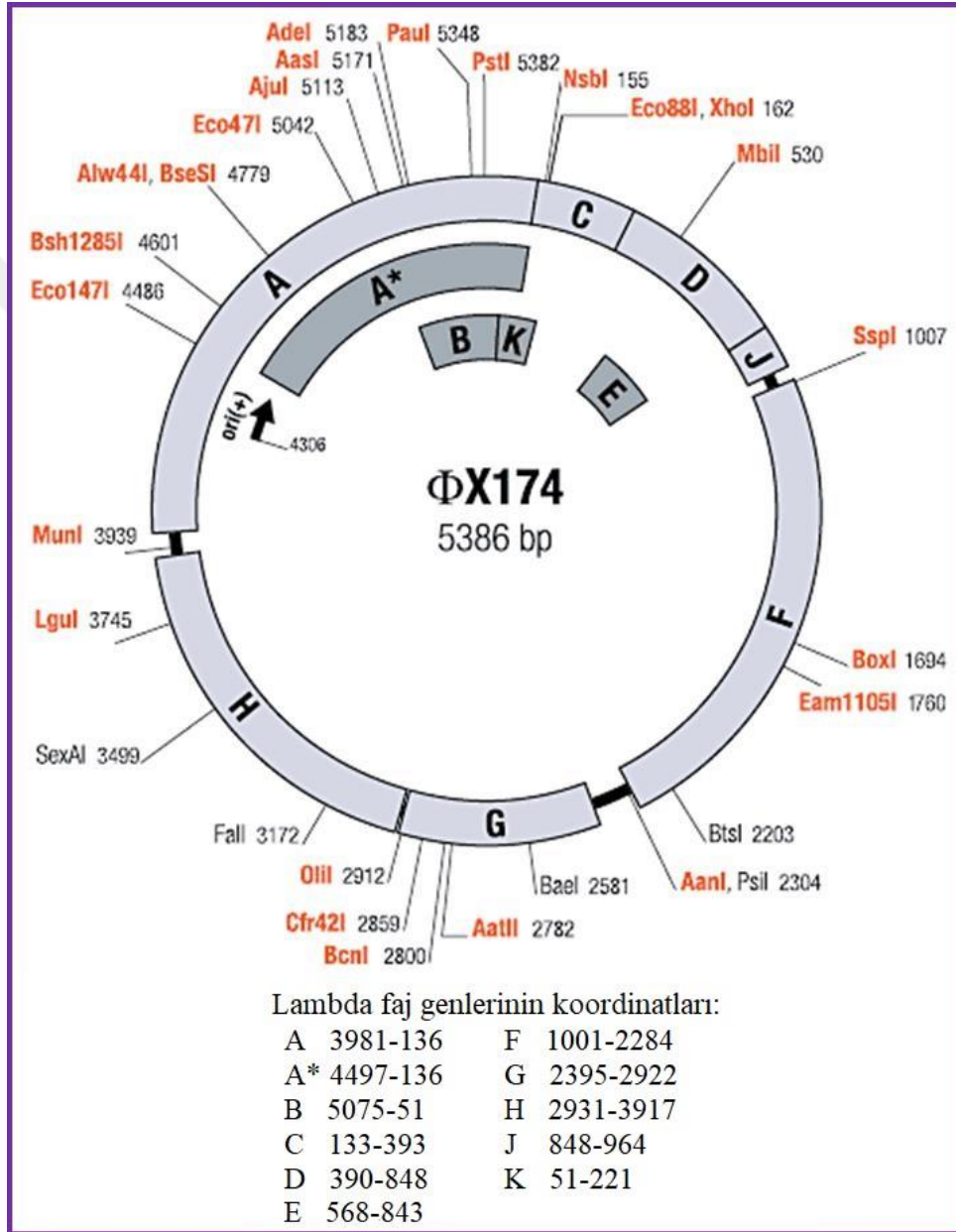
ITS markörleri, bitki filogenetik ve DNA barkodlama analizlerinde en sık kullanılan markörlerdendir. Bu popülerliğe rağmen ITS bölgeleri için PZR primerlerinin evrenselliği ve özgüllüğü amplifikasyon ve dizileme zorluklarından ötürü yeteri kadar tatmin edici değildir. Cheng ve diğ. (2016)'nın çalışmalarında 219 kapalı tohumlu, 11 açık tohumlu, 24 eğreltiotu, 16 yosun, 17 mantar ve 48 diğerleri olmak üzere toplamda 335 örnek çalışılmıştır. Bu çalışmalara göre, GenBank'tan bitki ve mantarların 18S, 5.8S ve 26S dizilerini detaylı bir şekilde inceleyerek tüm ITS bölgesini amplifiye etmek için evrensel ve bitkiye özgü yeni primerler tasarlamışlardır.

Markörler, filogenetik sistematiğe kullanıldığı gibi ekolojik ve çevresel genomik çalışmalarda da kullanılabilir (Valentini ve diğ. 2009). Adli tıpta suç mahallinden alınan DNA örneklerinin markörler ile çalışılması sonucu suçlunun cinsiyeti, ırkı ve hatta fiziksel birçok özellikleri belirlenebilir (Yoon, 1993; Coyle ve diğ., 2005; Mildenhall, 2006). Gıdanın içeriğinin tespiti ve saflığının onayı ve de etiketlenmenin orijinallliği açısından gıda güvenliği desteklenebilir (Galimberti, ve diğ., 2013; Huxley-Jones ve diğ., 2012).

2.3.3 DNA Dizileme Metotları

DNA dizilerinin belirlenmesi için ilk yöntem, 1970 yılında Cornell Üniversitesi'nde Ray Wu tarafından geliştirilen bir bölgeye özgü, primer uzatma prensibiydi. Lambda faj DNA'sının yapışkan uçlarını sıralamak için her ikisi de geçerli sıralama şemalarında belirgin olan DNA polimeraz katalizi ve spesifik nükleotit etiketlemesi kullanılmıştır (Wu, Nucleotide Sequence Analysis of DNA: I. Partial Sequence of the Cohesive Ends of Bacteriophage λ and 186 DNA, 1970). 1970 ve 1973 yılları arasında yapmış oldukları çalışmalar neticesinde Wu ve arkadaşları,

bu yöntemin sentetik yere özgü primerleri kullanarak herhangi bir DNA dizisini belirlemek için kullanılabileceğini gösterdi (Wu ve diğ., 1973). Frederick Sanger, daha sonra MRC Centre, Cambridge, İngiltere'de daha hızlı DNA sıralama yöntemleri geliştirmek için bu primer-uzatma prensibini benimsedi ve 1975'de artı-eksi metodu kısa sürede tercih edilen yöntem oldu (Sanger ve Coulson, 1975).



Şekil 2.11: Tüm genomu dizilenen ilk canlı ΦX174 Lambda faj (Sanger ve diğ., 1977).

Allan Maxam ve Walter Gilbert adındaki iki bilim insanı, 1977 yılında Harvard Üniversitesi'nde yapmış oldukları çalışmada DNA'nın kimyasal modifikasyonu ve ardından spesifik bazlarda kesilmesi esasına dayanan bir DNA dizileme yöntemi geliştirmiştir. Sanger ve Coulson'un artı-eksi dizilemesi hakkında yapmış oldukları yöntem Maxam-Gilbert dizileme yönteminden iki yıl önce (Sanger ve Coulson, 1975) ortaya çıkmış olsa da, daha yaygın olarak kullanılan yöntem olamamıştır (Maxam ve Gilbert, 1977). Buna karşın Sanger daha sonra arkadaşlarıyla birlikte 1977 yılında "zincir sonlandırma yöntemi"nin zaman içinde iyileştirilmesiyle Maxam-Gilbert yöntemi yaygınlığını kaybetti ve yeni Sanger yöntemi daha sık kullanılmaya başlandı (Sanger, ve diğerleri, 1977). Çünkü Maxam-Gilbert yöntemi Sanger yöntemine göre daha karmaşık ve zararlı kimyasalların kullanılması gerekliliğinden dolayı kolay bir şekilde kullanılmasına izin vermemiştir. Günümüzde hâlâ altın metot olarak Sanger'in dizileme yöntemi olan zincir sonlandırma metodu kabul görmektedir.

Geçmişten günümüze kadar dizileme metotlarını 3 nesil olarak ele alınabilir.

2.3.3.1 Birinci Nesil DNA Dizileme Metotları

Bu grupta Maxam-Gilbert Dizileme, Sanger Dizileme ve Pyro Dizileme Metotları yer almaktadır.

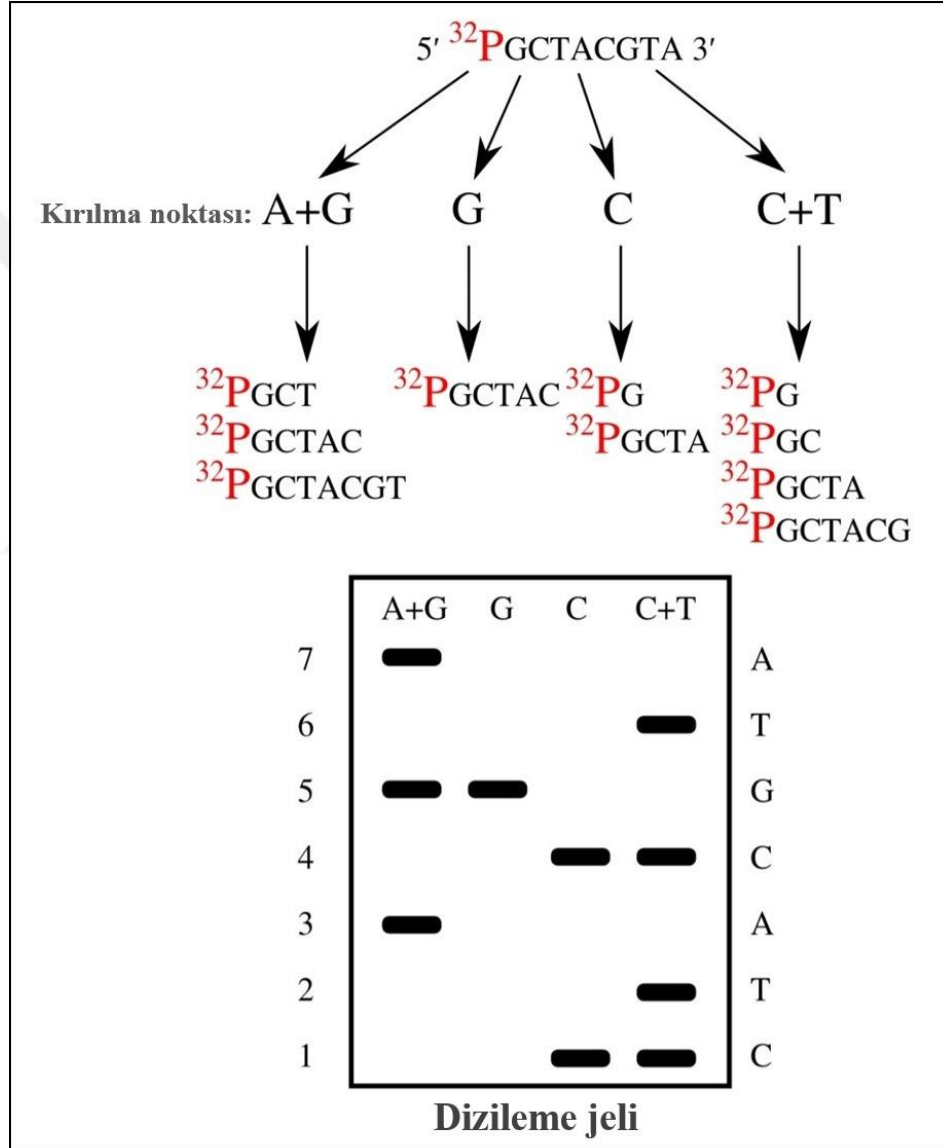
2.3.3.1.1 Maxam-Gilbert Dizileme

Maxam-Gilbert dizileme yöntemi DNA'nın 5' ucunun radyoizotopik olarak işaretlenmesini ve sonra diziye eklenecek DNA parçasının saflaştırılmasını içermektedir. Bu işaretleme Gamma-32P ATP kullanılan bir kinaz tepkimesidir. Uygulanan kimyasal işlemler ile moleküllerin bir kısmında nükleotidlerin bazlarından biri veya ikisinde kesikler meydana gelir. Pürin bazlarının formik asit ile depürine edilmesi, Guanin bazının dimetilsülfat ile metillenmesi, pirimidin bazlarının hidrazin ile metillenmesi bu kesiklere örnektir.

Tablo 2.5: Maxam-Gilbert Dizileme'de kullanılan baza özgü DNA kesme ve işaretleme yolları.

Özgül baz	Baza özgü	Baz ayırmada kullanılan	Zincir kırmada kullanılan
G	Dimetil sülfat	Piperidin	Piperidin
A+G	Asit	Asit	Piperidin
C+T	Hidrazin	Piperidin	Piperidin
C	Hidrazin + baz	Piperidin	Piperidin

Modifiye edilmiş bazlar genellikle piperidin ile DNA zincirden ayrılır. Bu şekilde modifiye edilmiş ve radyoizotopik olarak işaretlenmiş kesikli DNA parçaları elde edilir. Bu parçalar denatüre edilmiş akrilamid jel içinde elektroforez ile ayrıştırılır. Radyoizotopik DNA parçalarının görüntülenmesi için yürütülen jel bir röntgen filminin üzerine konulur ve radyoaktif olan noktalarda röntgen filmi karartı gösterir. Bu şekilde meydana gelen bant serilerinden DNA dizisi çıkarılabilir.



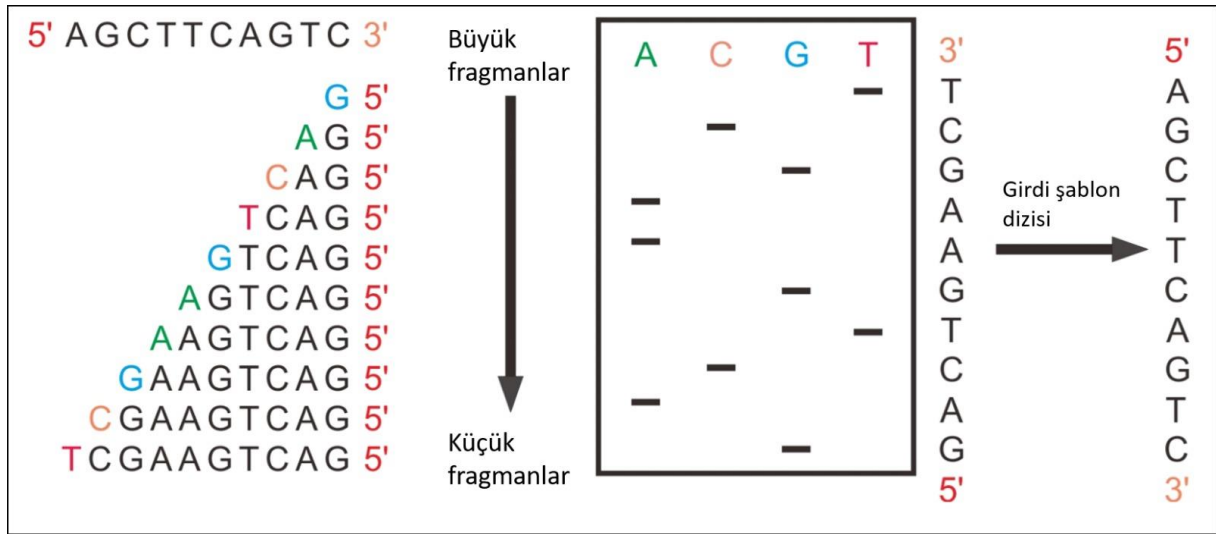
Şekil 2.12: Maxam-Gilbert dizileme yöntemi (Maxam ve Gilbert, 1977).

Sanger yöntemi 2,-3-dideoksinukleotidlerin (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) kullanılması temeline dayanmaktadır. Bu maddeler deoksiribozlarındaki 2. ve 3. konumlarındaki hidroksi moleküllerinin yerine Hidrojen bulunması sebebiyle fosfodiester bağı kuramadıkları için sentez sırasında polimerizasyonu durdurmaktadır. Bu yöntemde, test ortamında, 4 tür ddNTP, DNA polimeraz, polimerizasyon için gerekli 4 tür dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) yanı sıra, ayrıca, baz sırası tayini yapılacak olan kısa tek zincir DNA kalıp sekansı ve bunun 3'-ucundaki DNA bazlarına tamamlayıcı olan ve ^{32}P ile 5'-uçlarından işaretlenmiş çok kısa primer DNA dizileri de bulundurulur. Bu primer DNA parçacıkları, polimeraz enziminin sentezi için basamak oluştururlar.

Teknik olarak dizi analizi 3 basamaktan oluşur.

1. Polimeraz zincir reaksiyonu,
2. Dizileme reaksiyonu,
3. Jel elektroforezi ve bilgisayar programında değerlendirme.

PZR' da denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları ile hedef DNA dizisi çoğaltılabilmektedir. DNA polimeraz, primer kalıp DNA ve dNTP'ler ortama konulup işaretli bazın yapıya eklenmesi sağlanmaktadır. Kullanılan ddNTP'lerin derişimi ise ortamdaki diğer maddelerden daha düşük olmalıdır. İşaretleme primere de yapılabilir. İşaretlemeden sonra zincir sonlandırma tepkimelerine geçilir. Karışım dört bölüme ayrılarak dört ayrı tüpe konulur. Her bir tüpe gerekli enzim etkenleriyle birlikte düşük konsantrasyonlu ve birbirinden farklı ddNTP'ler eklenerek inkübe edilir. ddNTP'ler ve dNTP'ler aynı karışıma eklendiğinde aralarında bir rekabet ortaya çıkar. dNTP'ler bağlandığı sürece uzama devam eder. Ancak, sentezin herhangi bir aşamasında yapıya ddNTP eklendiği anda tepkime durur. Bu şekilde her bir tüpte aynı anda birbirinden bağımsız birçok reaksiyon gerçekleşir. Sonuçta primer sonundan başlayıp prematüre sonlanmaların olduğu kısımlara kadar çeşitli uzunlukta DNA parçaları meydana gelir. DNA dizi analizi sonucu elde edilen diziler jelde gümüş boyama, radyoaktif ve floresan boyalarla işaretlenerek tespit edilebilir. Dizileme reaksiyonu PZR gibi üç ana basamakta ve 30-40 döngüde gerçekleşir.



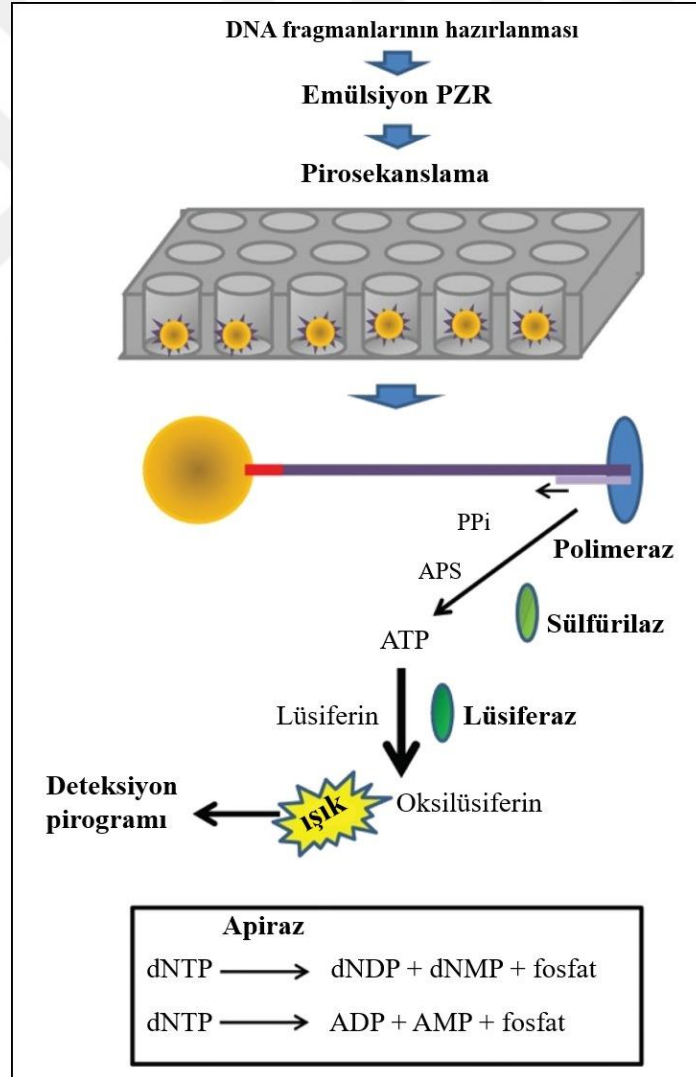
Şekil 2.13: Sanger dizileme yöntemi (Wen ve Zhong, 2018).

Sentezlenen DNA ya bir ddNTP'nin katılması 3' ucunda hidroksi grubu olmadığı için sentezi durdurur. Reaksiyon sonunda dNTP'ler ile uzamış ve ddNTP'lerle sonlanan diziler elde edilir. Ayrıca sonlandırıcı özellikteki bazlar floresan boyalarla işaretlenebilir. Elde edilen DNA dizilerine akrilamid jel elektroforezi uygulanabileceği gibi otomatik dizi analizi cihazlarında da okuma yapılabilir. Akrilamid jel elektroforezinde DNA parçaları elektriksel alanda ağırlıklarına göre sıralanır ve DNA dizisi jelden röntgen filmi yardımıyla okunur. Poliakrilamid jeller yüksek ayırım gücüne sahiptir. Poliakrilamid jeller uygun süre ve uygun voltajda tek bir nükleotid farkını bile ayırabilmektedir.

2.3.3.1.2 Pyro Dizileme

Dizi analizi için en sık kullanılan yöntem olan Sanger metodunun uzun sürmesi, birçok aşamayı içermesi gibi çeşitli dezavantajlarını ortadan kaldıran, 1986 yılında Pal Nyrén tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Single-nükleotide addition (SNA) yani tek nükleotid eklenmesi yöntemi ile dizi analizi yapmaktadır. Sentez yaparak dizi analizi yapma prensibine dayanır. DNA sentezi esnasında açığa çıkan pirofosfat'ların saptanması esasına dayanan bir real-time (gerçek-zamanlı) kantitatif dizi analizi tekniğidir. İşlem PZR ürünlerinin tek zincir DNA (ssDNA) ya dönüşmesi ile başlar. Tek zincir DNA kalıp olarak kullanılmak üzere izole edilir, her bir primer çifti biotin ile 5' ucundan işaretlenir. Sekans primeri PZR ile çoğaltılmış olan bir tek zincir DNA ile hibridize edilir. Enzim olarak DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lüsisferaz ve apiraz kullanılır. Substrat olarak adenosin 5' fosfosülfat ve lusiferin ile inkübe edilir.

dNTP (deoksiribonükleotid trifosfat) lardan ilki reaksiyona eklenir. Eğer dNTP kalıp DNA'daki baza komplementer ise ortamda bulunan DNA polimeraz, bu dNTP'nin DNA sarmalına eklenmesini kataliz eder. dNTP DNA kalıbına bağlanırken dNTP üzerindeki 2 adet fosfat açığa çıkar ve ortama 2 fosfatlı bir yapı olan pirofosfat (PPi) ortama geçmiş olur. Her nükleotid eklenmesinde bir pirofosfat serbest kalır. Ortama çıkan pirofosfat; ATP sulfurylase yardımı ile ATP'ye çevrilir. Oluşan ATP'nin yardımı ile lusiferin, oksilüsiferin'e dönüşür. Oksilüsiferin ise görünür bir ışın yayar. Oluşan bu ışın miktarı ATP miktarı ile orantılıdır. Oluşan ışın CCD (kızıl ötesi) kamera ile tespit edilir ve seri tepecik şeklinde kaydedilir. Işımların seri tepecik şeklinde kaydedilmesine Pyrogram adı verilir. Işın pyrogramda bir yükseklik veya tepecik şeklinde görülür. Her bir tepeciğin yüksekliği eklenmiş olan nükleotid sayısı ile orantılıdır.



Şekil 2.14: Pyro dizileme yöntemi (Siqueira ve diğ., 2012).

Nükleotid parçalayıcı bir enzim olan apiraz devamlı olarak ATP ve dNTP' leri parçalar. Böylece ışık oluşumu kesilir. Yani ortamda yeni reaksiyon oluşturacak d NTP ve ATP kalmamış olur ve bu şekilde ortam ikinci nükleotidin ilave edilmesine hazırlanmış olur. Bu teknoloji ile DNA parçacığının 100 nükleotidi okunmuş olur. Dört enzimin yer aldığı bu aşamalar kapalı bir sistemde, plakta ve tek bir kuyucukta yapılabilir. Apiraz ATP'yi ve bağlanmamış olan dNTP'leri parçalar ve böylece ışık kesilir.

Sanger tekniğindeki gibi işaretli primer, işaretli nükleotid ve jel elektroforezine ihtiyaç duyulmaz. Metilasyon analizleri, adli tıp çalışmalarında, viral, bakteriyel ve fungal tiplendirme ve de direnç araştırmalarında kullanılan bir yöntemdir (Durmaz, 2001).

2.3.3.2 İkinci Nesil DNA Dizileme Metotları

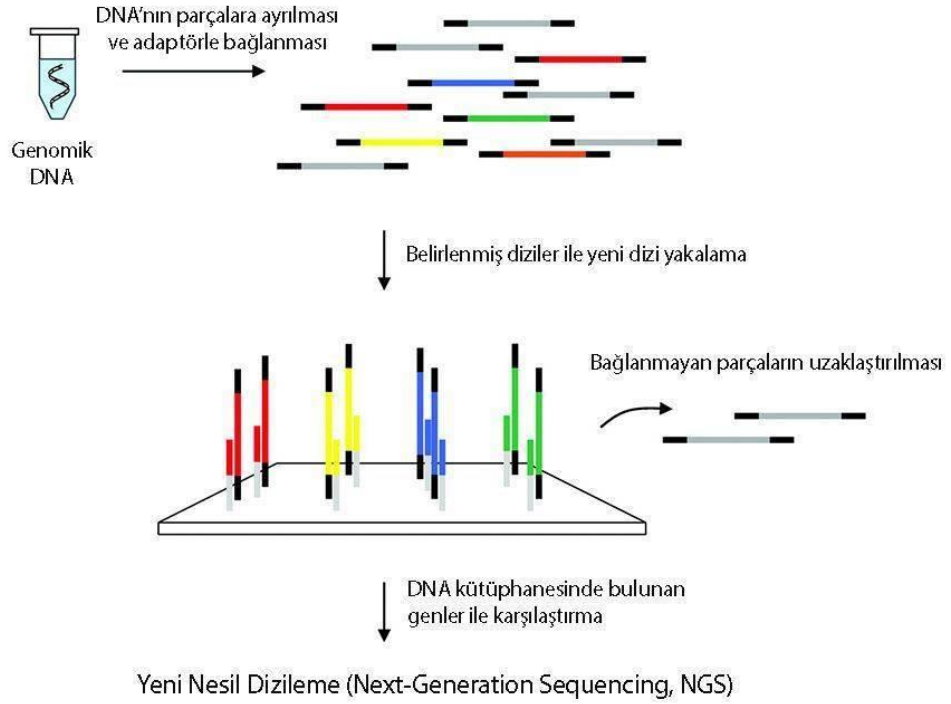
Bu kategoride NGS (Next Generation Sequencing) diye bilinen Yeni Nesil Dizileme yer almaktadır. Bu dizileme 2007 yılından sonra yaygınlaşmış ve çok daha uzun dizilerin okunabilmesini daha düşük maliyetle daha hızlı yapılmasını sağlamıştır. Bu sebeple genom projelerinde bu metot oldukça sık kullanılır. Firmalar tarafından farklı prensiplerle farklı markalar altında ticarileşen NGS metoduna örnek olarak Illumina (iSeq100 System, MiniSeq System, MiSeq Serisi, NextSeq Serisi, HiSeq Serisi, NovaSeq), Thermo Fisher (Ion PGM Dx System, Ion One Touch 2 System, Ion Chef System, Ion GeneStudio S5 Serisi), Roche (454 GS FLX) verilebilir.

NGS reaksiyonları için kalıp model hazırlamada iki yöntem vardır, tek zincir DNA'dan klonlama olarak çoğaltılmış kalıplar ve doğrudan DNA tek zincirinin kullanıldığı kalıplar. Kalıpların DNA polimeraz ile çoğaltım işlemi de CRT (Cyclic Reversible Termination/Döngüsel Tersine Sonlandırma), SNA (Single Nucleotide Addition/Tek Nükleotid Ekleme) ve eş zamanlı dizileme olarak üç yönteme ayrılır. DNA polimerazın DNA ligaz ile değiştirildiği bir başka yaklaşım olan SBL (Sequencing by Ligation/Ligasyonla Sıralama) yöntemi de kullanılmaktadır.

NGS genel anlamda, birbirinden ayrılmış yüzey bölgelerinin her birine sabitlenmiş binlerce kalıp DNA parçacıklarının sabitlenmesi, sabitlenen bu kalıp dizilerinin nükleotid sıra bilgisine göre tamamlayıcı olacak şekilde tasarlanmış adaptör dizilerinin farklı yerlerden rast gele kesilip çoğaltılmış hedef genomik DNA parçalarına eklenmesi, adaptör eklenmiş DNA parçacıklarının sabit yüzeydeki diziler ile eşleşip ortamdaki reaktifler vasıtasıyla çift zincir uzaması aşamasında

her bir baz türüne özgü farklı floresan boyalarla etiketlenmiş bazlar ile çoğaltılıp CCD (Charged coupled device/Şarj eşleştirmeli cihaz) kameralar ile çoğaltma aşamasında ışımları tespit edilip okumaları bilgisayar ortamında anlamlı grafiklere dönüştürmesini kapsar.

Zincir uzatma reaksiyonu defalarca tekrarlanır ve her defasında yıkama ve tarama işlemi gerçekleşir. Floresan boyalarla işaretlenmiş olan nükleotidler, DNA parçacıklarındaki sıraya göre hizalanır ve uzama reaksiyonu durur. Sonrasında fazla gelen reaktifler yıkanıp ortamdan uzaklaştırılır ve eşleşmiş olan bazlar taranır. Böylelikle her döngüde milyonlarca baz okunur. Bir bölgede eksik ya da yanlış eşleşme olursa onun okuma sonucu ile farklı döngülerde okunan aynı bölgenin okuma sonuçlarını bilgisayar programı tespit eder. Ayrıca okunmuş her DNA parçası bilgisayar programında uç uca ekleyip hedef DNA'nın dizisini tam bir şekilde çıkartırken tekrarlanan dizileri ayıklamak için DNA parçacıklarının başından ve sonundan belli sayıda baz dizilerini yine bilgisayar programı tespit edilip çıkarır (Metzker, 2010).



Şekil 2.15: İkinci nesil dizileme yönteminden Illumina'nın çalışma prensibi (Kamps ve diğ., 2017).

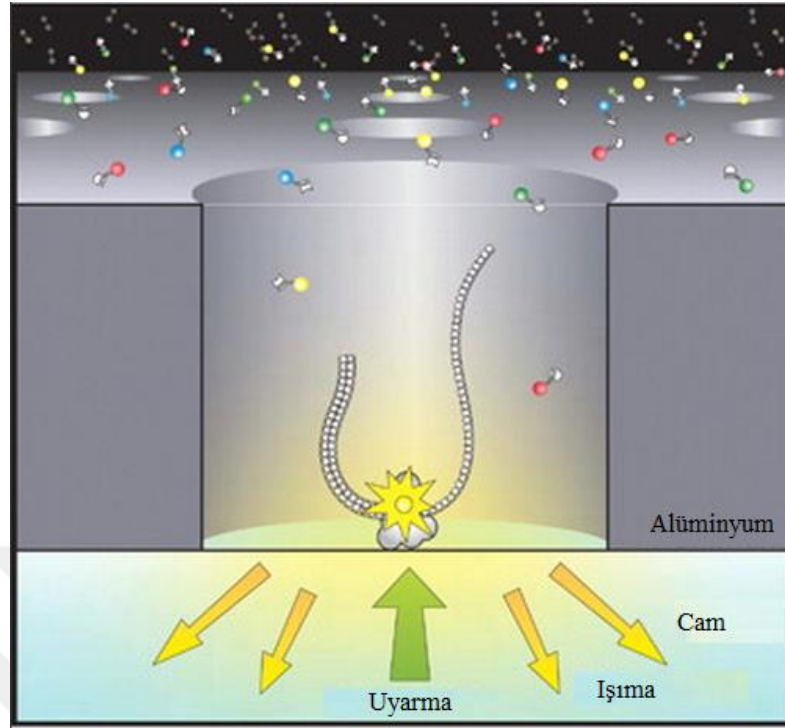
2.3.3.3 Üçüncü Nesil DNA Dizileme Metotları

Diğer iki nesil dizilemede de genomik DNA parçalara bölünür ve PZR yöntemiyle bu parçaların çoğaltılması temeline dayanılırken 3. nesil dizileme tekniklerinde hedef genomik DNA denatüre edilip tek zincirli hale getirilir ve herhangi bir kesme olmaksızın kalıp olarak tek zincir DNA molekülü ele alınır. Bu bağlamda yeni yöntemler denenmektedir. Bunlara örnek olarak:

1. Tek Zincirli DNA Molekülünün Real Time (Eş Zamanlı) Dizilemesi (SMRT)
2. Floresan Rezonans Enerji Aktarımı (FRET) İle RT DNA Dizileme
3. Elektron Mikroskopu (TEM) Temelli DNA Dizileme
4. Nanopor Teknolojisi İle DNA Dizileme
5. Transistör Aracılı DNA Dizileme

2.3.3.3.1 SMRT DNA Dizileme

Pasific Biosciences tarafından geliştirilen tek zincirli DNA molekülünün RT (Real Time / Eş Zamanlı) dizileme yöntemi DNA polimerazın hızına ve aktivitesine doğrudan etki eder. Çift zincirli DNA oluşturulması sırasında büyük bir nükleotid havuzundan bazların tek tek alınıp doğru sırada hizalanması ve ZMW (Zero Mode Waveguides / Sıfır Mod Dalga) teknolojisine dayanır. ZMW teknolojisi, mikrodalgaların dalga boyundan çok daha küçük, cam zemin üzerine sabitlenmiş, 100 nm'lik metal filmden yapılmış, nanometre seviyesinde çapları olan açıklıklara sahiptir ve bu açıklıklar boyutları sayesinde daha uzun dalga boylarını geçirmezler. Böylelikle sadece istenen dalga boylarının geçebileceği bir filtre oluşur. Sadece 30 nm'nin altındaki dalga boyları geçiş yapabilir ve ZMW'nin porları içindeki etiketlenmiş nükleotidleri etkiler. ZMW'de tek bir DNA polimeraz molekülü cam tabaka yüzeyine tutturulur. Farklı boyalar ile işaretlenmiş olan nükleotidler gerekli konsantrasyon seviyelerinde ZMW'nin içinde DNA dizisi üzerine salıverilir. İşaretlenmiş olan nükleotidler DNA polimerazın etrafını sarar, doğru nükleotid DNA polimeraz tarafından tanındığı vakit zincir uzama işlemiyle birleştirilir. Bazın zincire oturması sırasında DNA polimeraz tarafından boya serbest bırakılır ve o esnada ışıma meydana gelir, oluşan ışıma tespit edilerek hangi bazın eklendiği belli olur. Ayrılan bu boyalar difüzyona uğrayarak herhangi bir etki oluşturmada ortamdan uzaklaştırılır. Bu işlem saniyeler içinde defalarca tekrarlanır. Böylece DNA dizi bilgisi elde edilir.



Şekil 2.16: SMRT dizileme yöntemi (Eid, ve diğ., 2009).

2.3.3.3.2 FRET İle RT DNA Dizileme

VisiGen Biotechnologies, Inc. tarafından geliştirilen bir yöntem olan bu yeni yaklaşıma göre DNA polimerazın floresan boyaları ile işaretlenmiş nükleotidlerin yaydığı FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer / Floresan Rezonans Enerji Aktarımı) sinyallerini tanıması üzerine işlemektedir. Nükleotidlerin kalıp tek zincir DNA ile eşleşmesinden sonra bazlar üzerindeki floresan etiketler ayrılır. Saniyede milyonlarca nükleotid taşıma potansiyeline sahip yüksek teknolojiler için olanak sağlamaktadır; ancak şu an için bunun ölçümü çok zordur. Uygulanabilirliğini gösteren bilimsel bir çalışma ve yayın henüz bulunmamaktadır (Schadt ve diğ., 2010).

2.3.3.3.3 TEM Temelli DNA Dizileme

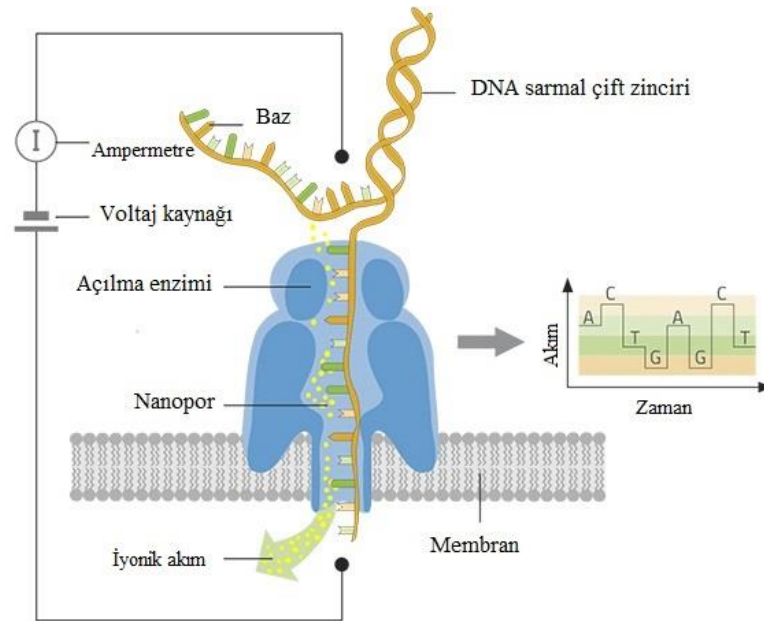
Halcyon Molecular, Inc. DNA zincirindeki bazların kimyasal yapısına bakarak tek tek tanınması ve doğrudan görüntülenmesi bakımından TEM (Transmission Electron Microscopy / Geçirimli Elektron Mikroskopy) kullanarak yeni nesil dizileme metotlarına farklı bir yaklaşım sunmuştur. Bu yöntem, görüntülenen DNA dizisindeki nükleotitlerin fonksiyonel iğneler kullanılarak tek tek bir substrat üzerine oturtulması prensibine dayanmaktadır; ancak şimdiye

kadar bu teknolojinin kullanıldığı herhangi bir çalışma ya da yayın bulunmamaktadır. ZS Genetics, Inc. firmasının yaklaşımına göre DNA dizisindeki işaretlenmiş tek bir baz, yüksek çözünürlüklü elektron mikroskopu yardımıyla diğer işaretlenmiş bazlara göre ebat ve yoğunluk farkına dayalı olarak belirlenir.

2.3.3.3.4 Nanopor Teknolojisi İle DNA Dizileme

DNA molekülünün veya nükleotidlerin bir pordan geçmesi ile nükleotidlerin bu geçiş esnasındaki elektrik akımı ve optik sinyal alıcıları üzerine etkisinin gözlemlenmesi sayesinde bazların belirlenmesi esasına dayanır. Bu teknoloji tek zincirli DNA molekülünü kullandığı için çok çok az miktarlarda bile çok daha hızlı çalışma potansiyeline sahiptir.

Oxford Nanopore, Inc. DNA dizileme için 3 doğal biyolojik moleküle dayanarak çalışan bir sistem geliştirmiştir. Biyolojik nanoporlar dış yüzeyinde ekzonükleaz etkinliğine sahip yapılardır. Bir sentetik siklodekstrin sensör molekülü de kovalent bağ ile porun iç yüzeyine bağlanmıştır. Bu sistem DNA'nın yüklendiği ve ekzonükleaz aktivitesinin olduğu tarafta tuz derişimindeki değişim sayesinde elektrik akımının geçtiği bir lipid tabakası içermektedir. Ekzonükleaz aktivitesi ile nükleotidler tek tek ayrılır. Bu nükleotidlerin ayrılması; pordan geçerken nükleotidlerin iyonik özellikleri ve karakteristik yapılarına göre olur. Ayrılan bu nükleotidler de tek tek tanımlanır (Clarke, ve diğ., 2009).



Şekil 2.17: Nanopor teknolojisi ile DNA dizileme yöntemi (Göpfrich ve Judge, 2018).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 DENEYDE KULLANILAN SARF MALZEMELER VE CİHAZLAR

3.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Tez çalışması esnasında kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Kullanılan Sarf Malzeme	Marka	Katalog Numarası
Proteinaz-K	Eurofins	5226700101
CTAB tozu	Sigma-Aldrich	52365-50G
Etanol	Merck	1.59010
PVP	Sigma-Aldrich	PVP40-500G
Fenolkloroform-izoamil	Sigma-Aldrich	77617-100ML
İzopropanol	Sigma-Aldrich	W292912-1KG-K
Toplama tüpü	Biosigma	C385013

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılmış olan cihazlar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Tez çalışması esnasında kullanılan cihazların görselleri.

1.Santrifüj Cihazı: Eppendorf Centrifuge 5417R 	2.Su Banyosu: Wisd WiseBath WB-11 
---	---

Tablo 3.2 (devam): Tez çalışması esnasında kullanılan cihazların görselleri.

3.Ultra Saf Su Sistemi: Elga Purelab OptionQ 	4.Spektrofotometre: Thermo Scientific Nanodrop 2000 
5.Vorteks: Wisd WiseMix VM-10 	6.Hassas Terazı: Sartorius 

3.2 BİTKİ MATERYALLERİNİN HAZIRLANIŞI

Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi'nden alınan *Colchicum baytopiorum* (2003-00801 D / HDUM 9273), *Colchicum davisii* (2006-00576 / BGNR 1209) ve *Colchicum lingulatum* subsp. *rigescens* (2004-00188 A / AG 13712) yaprakları laboratuvar ortamında 0,2 gr tartıldı ve yaprak yüzeylerinin etil alkol ile yüzey sterilizasyonu sağlandı. Daha sonra yapraklar ayrı havanlarda sıvı azot ile muamele edilerek fiziksel parçalama işlemine tabi tutuldu. İzolasyon öncesi örnekler toz haline getirildi.

3.3 ÖRNEKLERDEN DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu için öncelikle falkon tüpte 9 ml CTAB solüsyonu ile 90 mg CTAB tozu karıştırılmıştır. Daha sonra 90 µl β-merkaptoetanol ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Bu karışım 65°C sıcaklıkta 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Elde edilen CTAB karışımından 1 ml alınıp eppendorf tüpe transfer edilmiş ve üzerine 12 mg PVP ilave edilip karıştırılmıştır. Toz haline getirilmiş her bir yaprak örneğinden 20 mg alınarak CTAB karışımının bulunduğu eppendorf tüplere ilave edilmiş ve 2 dakika vortekslenmiştir. Bu aşamadan sonra tüplere 30 µl Proteinaz-K ilave edilmiş ve 65°C sıcaklıkta 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Ertesi gün her bir tüp 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 1 ml fenolkloroform-izoamil eklenerek 5 dakika vortekslenmiştir. Daha sonra tüm tüpler 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası her bir örneğin supernatantı otomatik pipetle çekilerek yeni steril eppendorf tüplere aktarılmıştır. Yeni tüplere aktarılan supernatant miktarı kadar her birine soğukta bekletilmiş izopropanol ilave edilerek 15 dakika -80°C'de bekletilmiştir. Daha sonra her bir örnek 20 dakika 13000 rpm'de ve 4 dakika santrifüj edilerek pelet dipte kalacak şekilde üst sıvı otomatik pipetle çekilip atılmıştır. Kalan peletlerin üstüne 1 ml %70'lik etanol, 100 µl sodyum asetat ilave edilmiş ve 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pelet dipte kalacak şekilde üst sıvı otomatik pipetle çekilerek atılmıştır. Kalan peletlerin üstüne 1 ml soğuk %70'lik etanol ilave edilip 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Kalan peletler dipte kalacak şekilde üst sıvı otomatik pipetle çekilip atılmış ve tüpler kapakları açık şekilde alkolün tamamen uçup uzaklaşması için 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra peletlerin üstüne 40 µl distile su ilave edilerek vortekslenmiştir.

3.4 DNA İZOLATLARININ KALİTE ÖLÇÜMÜ

DNA izolasyonu yapılan her bitki örneğinden otomatik pipetle 2 µl çekilip nanodrop okuma haznesine sırayla konulmuş ve ölçüm yapılmıştır. Bir örnekten diğerine geçilirken nanodrop okuma haznesi kâğıt mendil ile silinmiştir. Her beş okumada bir nanodrop okuma haznesine blank konulup kalibre edilmiştir. Spektrofotometre sonuçları Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Tez çalışmasındaki *Colchicum* taksonlarının nanofotometrik ölçüm değerleri.

Örnek Adı	Nükleik Asit Konsantrasyonu	A260	A280	260/280	260/230
<i>C. lingulatum</i> subsp. <i>rigescens</i>	634,3	12,685	6,703	1,89	0,84
<i>C. davisii</i>	735,4	14,708	7,941	1,85	0,87
<i>C. baytopiorum</i>	876,5	17,530	9,217	1,90	0,61s

3.5 ÖRNEK DNA'LARININ DİZİLENMESİ VE BİYOİNFORMATİĞİ

Bitki örneklerinden her bir örnek için birden fazla sayıda genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra nanodrop ile kalite ölçümü yapılmıştır ve dizileme için uygun olan DNA'lar farklı uzunluklarda dizilimler içeren her örnek için 1'er genomik kütüphane oluşturmada kullanılmıştır. Bu kütüphaneler Illumina HiSeq 2000 kullanılarak 100bp “paired end” olarak Macrogen firmasında okunmuştur (Macrogen Inc., Kore).

Tez çalışmasında kullanılan *Colchicum lingulatum* subsp. *rigescens*, *Colchicum davisii* ve *Colchicum baytopiorum* bitkilerinin gelen ham datası tekrarlanan bölgelerin ayıklanması için CLC Genomics Workbench versiyon 12.0 programında kırılmıştır. Oluşan ikincil data, total DNA'yı içerdiği için kloroplast genomları belirlenip analiz edilmiştir. Kloroplast genomlarının tespiti için referans olarak NCBI BLAST versiyon 2.9.0 verilerinden *Colchicum autumnale*'nin tüm kloroplast dizisi seçilip yine CLC Genomics Workbench versiyon 12.0 programında her bir örneğin dizisi ile haritalandırılmıştır. Bu kloroplast genomları çok iyi korunmuş olan çift sarmallı halkasal DNA molekülleridir, eldeki sonuçlara göre sırasıyla 156.423 bp, 156.604 bp ve 156.615 bp uzunluğundadır.

4. BULGULAR

DNA örneklerinin kloroplast DNA diziliminden gelen ham datanın CLC Genomics programında işlendikten sonra elde edilen bulguları aşağıda verilmiştir.

4.1 *C. lingulatum* subsp. *rigescens* BULGULARI

Colchicum lingulatum subsp. *rigescens* için DNA dizileme analizi sonucunda cpDNA'nın 156.423bp uzunluğunda, tek zincirinin 48,294Mda çift zincirinin 96,634Mda ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 86 kodlama yapan dizi (CDS), 86 delesyon, 135 gen, 60 insersiyon, 8 rRNA, 38 tRNA tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak elde edilen diğer bilgiler Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: *C. lingulatum* subsp. *rigescens*'in cpDNA analizinde atomik kompozisyonu [(a): Tek zincir DNA'dan elde edilen bilgiler, (b): Çift zincir DNA'dan elde edilen bilgiler].

Atom	Sayım (a)	Sayım (b)	Frekans (a)	Frekans (b)
Hidrojen (H)	1.926.259	3.851.792	0,375	0,375
Karbon (C)	1.534.359	3.069.682	0,299	0,299
Azot (N)	574.803	1.153.712	0,112	0,112
Oksijen (O)	939.258	1.877.064	0,183	0,183
Fosfor (P)	156.422	312.844	0,03	0,03

Tablo 4.2: *C. lingulatum* subsp. *rigescens*'in cpDNA analizinde nükleotid dağılımı.

Nükleotid	Sayım	Frekans
Adenin (A)	48.469	0,310
Sitozin (C)	29.861	0,191
Guanin (G)	28.897	0,185
Timin (T)	49.195	0,314
Pürin (R)	0	0,000
Pirimidin (Y)	0	0,000
Adenin veya Sitozin (M)	0	0,000
Guanin veya Timin (K)	0	0,000
Sitozin veya Guanin (S)	0	0,000
Adenin veya Timin (W)	0	0,000
Adenin hariç (B)	0	0,000
Sitozin hariç (D)	0	0,000
Guanin hariç (H)	0	0,000
Timin hariç (V)	0	0,000
Herhangi bir nükleotid (N)	1	0,000
C + G	58.758	0,376
A + T	97.664	0,624

Tablo 4.3: *C. lingulatum* subsp. *rigescens*'in cpDNA analizinde di-nükleotid sayımı ve frekansı.

1. pos\2. Pos	A		C		G		T	
A	16913	0,108	7025	0,045	8435	0,054	16095	0,103
C	8424	0,054	7489	0,048	5083	0,032	8865	0,057
G	10225	0,065	4655	0,030	6944	0,044	7072	0,045
T	12907	0,083	10692	0,068	8435	0,054	17161	0,110

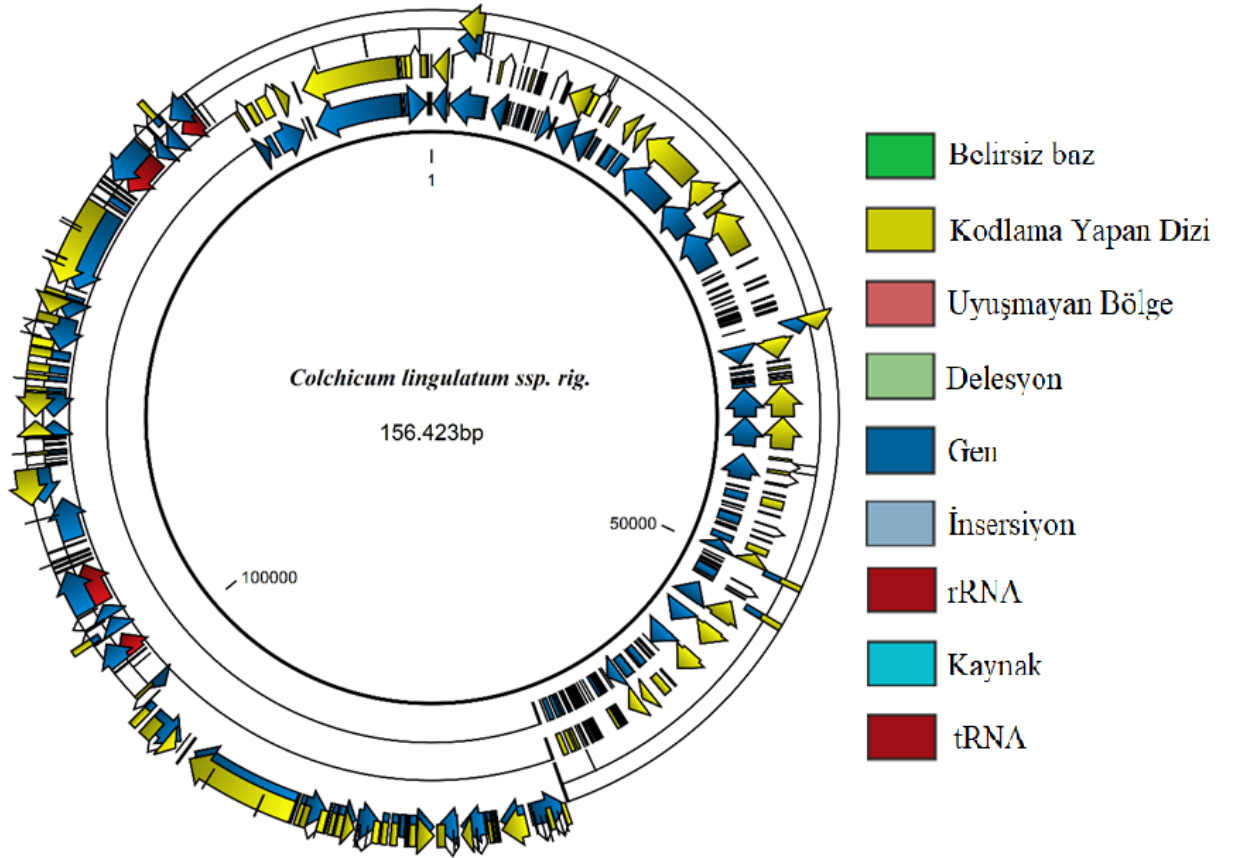
Tablo 4.4: *C. lingulatum* subsp. *rigescens*'in cpDNA analizinde kodon bölgelerinin kodon istatistikleri, sayımı ve frekansı.

Kodon	Sayım	Frekans	CCC	203	0,01	GGT	521	0,02
AAA	759	0,03	CCG	120	0,01	GTA	498	0,02
AAC	240	0,01	CCT	345	0,02	GTC	162	0,01
AAG	266	0,01	CGA	292	0,01	GTG	172	0,01
AAT	754	0,03	CGC	90	0,00	GTT	460	0,02
ACA	324	0,01	CGG	98	0,00	TAA	0	0,00
ACC	238	0,01	CGT	318	0,01	TAC	163	0,01
ACG	157	0,01	CTA	298	0,01	TAG	0	0,00
ACT	443	0,02	CTC	164	0,01	TAT	657	0,03
AGA	415	0,02	CTG	151	0,01	TCA	314	0,01
AGC	98	0,00	CTT	464	0,02	TCC	298	0,01
AGG	137	0,01	GAA	828	0,04	TCG	150	0,01
AGT	341	0,02	GAC	178	0,01	TCT	482	0,02
ATA	572	0,03	GAG	293	0,01	TGA	0	0,00
ATC	373	0,02	GAT	682	0,03	TGC	60	0,00
ATG	525	0,02	GCA	358	0,02	TGG	382	0,02
ATT	929	0,04	GCC	237	0,01	TGT	181	0,01
CAA	581	0,03	GCG	159	0,01	TTA	744	0,03
CAC	128	0,01	GCT	534	0,02	TTC	448	0,02
CAG	189	0,01	GGA	605	0,03	TTG	475	0,02
CAT	395	0,02	GGC	192	0,01	TTT	774	0,04
CCA	247	0,01	GGG	315	0,01			

Tablo 4.5: *C. lingulatum* subsp. *rigescens*'in cpDNA analizinde kodon pozisyonlarındaki nükleotid sayımı ve frekansı.

Kodon pozisyonu	A		C		G		T	
1. pozisyon	6571	0,30	4083	0,19	6194	0,28	5128	0,23
2. pozisyon	6113	0,28	4609	0,21	4045	0,18	7209	0,33
3. pozisyon	6835	0,31	3272	0,15	3589	0,16	8280	0,38

*Frekanslar kırmızı renk ile gösterilmiştir.



Şekil 4.1: *C. lingulatum* subsp. *rigescens* halkasal cpDNA'sı.

4.2 *C. davisii* BULGULARI

Colchicum davisii için için DNA dizileme analizi sonucunda cpDNA'nın 156.604bp uzunluğunda, tek zincirinin 48,35MDa çift zincirinin 96,745MDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 181 tam belli olmayan bazlar, 86 kodlama yapan dizi (CDS), 39 delesyon, 135 gen, 122 insersiyon, 8 rRNA, 38 tRNA tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak elde edilen diğer bilgiler Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8, Tablo 4.9, Tablo 4.10 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.6: *C. davisii*'nin cpDNA analizinde atomik kompozisyonu [(a): Tek zincir DNA'dan elde edilen bilgiler, (b): Çift zincir DNA'dan elde edilen bilgiler].

Atom	Sayım (a)	Sayım (b)	Frekans (a)	Frekans (b)
Hidrojen (H)	1.925.537	3.850.311	0,375	0,375
Karbon (C)	1.533.764	3.068.501	0,299	0,299
Azot (N)	574.519	1.153.273	0,112	0,112
Oksijen (O)	938.935	1.876.344	0,183	0,183
Fosfor (P)	156.362	312.724	0,030	0,030

Tablo 4.7: *C. davisii*'nin cpDNA analizinde nükleotid dağılımı.

Nükleotid	Sayım	Frekans
Adenin (A)	48.430	0,309
Sitozin (C)	29.856	0,191
Guanin (G)	28.883	0,184
Timin (T)	49.193	0,314
Pürin (R)	34	0,000
Pirimidin (Y)	34	0,000
Adenin veya Sitozin (M)	39	0,000
Guanin veya Timin (K)	30	0,000
Sitozin veya Guanin (S)	10	0,000
Adenin veya Timin (W)	87	0,001
Adenin hariç (B)	1	0,000
Sitozin hariç (D)	2	0,000
Guanin hariç (H)	4	0,000
Timin hariç (V)	1	0,000
Herhangi bir nükleotid (N)	0	0,000
C + G	58.739	0,375
A + T	97.623	0,623

Tablo 4.8: *C. davisii*'nin cpDNA analizinde di-nükleotid sayımı ve frekansı.

1. pos\2. pos	A		C		G		T	
A	16865	0,108	7017	0,045	8430	0,054	16048	0,103
C	8434	0,054	7493	0,048	5074	0,032	8846	0,057
G	10210	0,065	4644	0,030	6939	0,044	7075	0,045
T	12862	0,082	10683	0,068	8422	0,054	17153	0,110

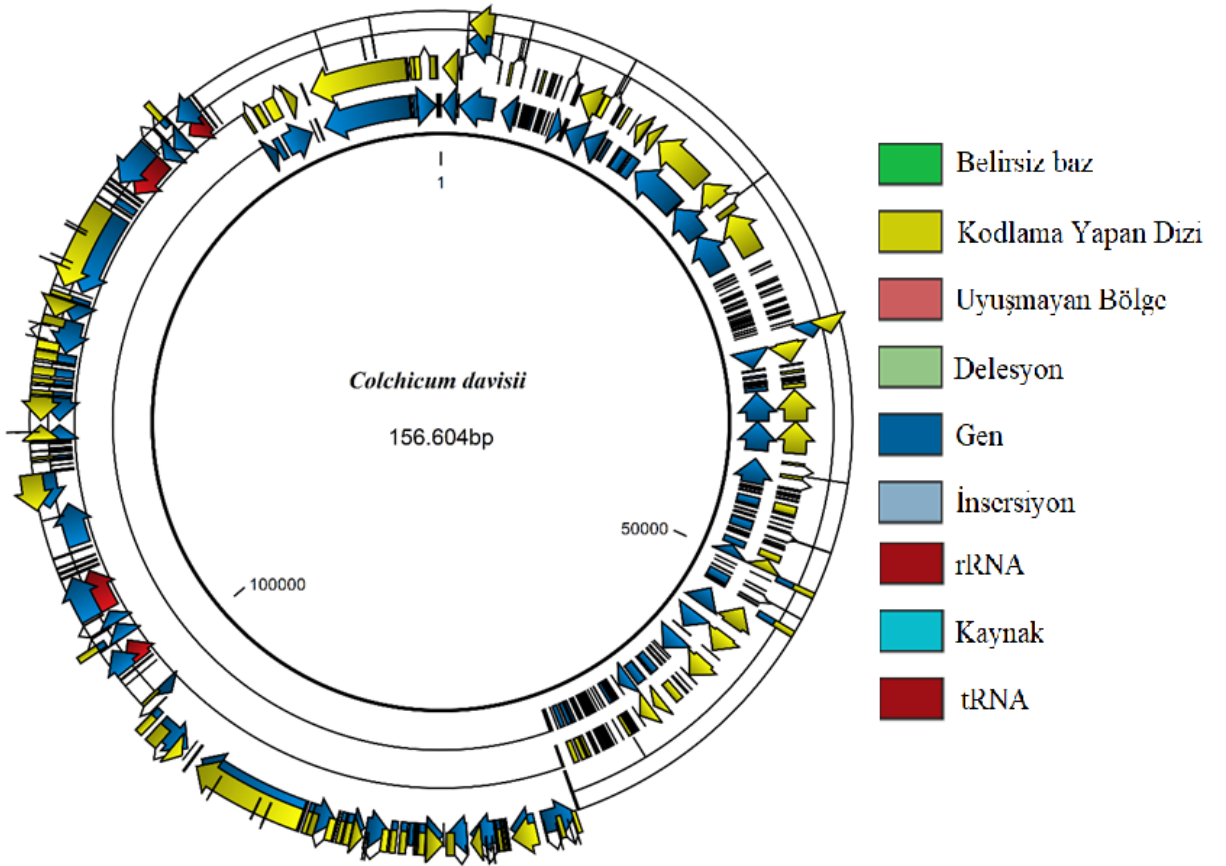
*Frekanslar kırmızı renk ile gösterilmiştir.

Tablo 4.9: *C. davisii*'nin cpDNA analizinde kodon bölgelerinin kodon istatistikleri, sayımı ve frekansı.

Kodon	Sayım	Frekans	CCC	209	0,01	GGT	527	0,02
AAA	867	0,04	CCG	121	0,01	GTA	507	0,02
AAC	262	0,01	CCT	353	0,02	GTC	167	0,01
AAG	294	0,01	CGA	305	0,01	GTG	179	0,01
AAT	819	0,04	CGC	96	0,00	GTT	475	0,02
ACA	345	0,02	CGG	103	0,00	TAA	0	0,00
ACC	245	0,01	CGT	325	0,01	TAC	168	0,01
ACG	166	0,01	CTA	314	0,01	TAG	0	0,00
ACT	462	0,02	CTC	174	0,01	TAT	695	0,03
AGA	442	0,02	CTG	152	0,01	TCA	333	0,01
AGC	103	0,00	CTT	482	0,02	TCC	300	0,01
AGG	150	0,01	GAA	888	0,04	TCG	153	0,01
AGT	347	0,02	GAC	184	0,01	TCT	507	0,02
ATA	611	0,03	GAG	301	0,01	TGA	0	0,00
ATC	380	0,02	GAT	727	0,03	TGC	62	0,00
ATG	547	0,02	GCA	357	0,02	TGG	393	0,02
ATT	978	0,04	GCC	243	0,01	TGT	192	0,01
CAA	616	0,03	GCG	162	0,01	TTA	772	0,03
CAC	132	0,01	GCT	536	0,02	TTC	467	0,02
CAG	192	0,01	GGA	615	0,03	TTG	496	0,02
CAT	412	0,02	GGC	192	0,01	TTT	805	0,04
CCA	263	0,01	GGG	318	0,01			

Tablo 4.10: *C. davisii*'nin cpDNA analizinde kodon pozisyonlarındaki nükleotid sayımı ve frekansı.

Kodon pozisyonu	A		C		G		T	
1. pozisyon	7018	0,31	4249	0,18	6378	0,28	5343	0,23
2. pozisyon	6557	0,29	4755	0,21	4170	0,18	7506	0,33
3. pozisyon	7235	0,31	3384	0,15	3727	0,16	8642	0,38

**Şekil 4.2:** *C. davisii* halkasal cpDNA'sı.

4.3 *C. baytopiorum* BULGULARI

Colchicum baytopiorum için DNA dizileme analizi sonucunda cpDNA'nın 156.615bp uzunluğunda, tek zincirinin 48,354MDa çift zincirinin 96,752MDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 176 tam belli olmayan bazlar, 86 kodlama yapan dizi (CDS), 57 delesyon, 135 gen, 127 insersiyon, 8 rRNA, 38 tRNA tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak elde edilen diğer bilgiler Tablo 4.11, Tablo 4.12, Tablo 4.13, Tablo 4.14, Tablo 4.15 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.11: *C. baytopiorum*'un cpDNA analizinde atomik kompozisyonu [(a): Tek zincir DNA'dan elde edilen bilgiler, (b): Çift zincir DNA'dan elde edilen bilgiler].

Atom	Sayım (a)	Sayım (b)	Frekans (a)	Frekans (b)
Hidrojen (H)	1.923.553	3.846.286	0,375	0,375
Karbon (C)	1.532.175	3.065.281	0,299	0,299
Azot (N)	573.912	1.152.146	0,112	0,112
Oksijen (O)	923.026	1.874.412	0,183	0,183
Fosfor (P)	156.201	312.402	0,030	0,030

Tablo 4.12: *C. baytopiorum*'un cpDNA analizinde nükleotid dağılımı.

Nükleotid	Sayım	Frekans
Adenin (A)	48.321	0,309
Sitozin (C)	29.835	0,190
Guanin (G)	28.904	0,185
Timin (T)	49.141	0,314
Pürin (R)	37	0,000
Pirimidin (Y)	40	0,000
Adenin veya Sitozin (M)	21	0,000
Guanin veya Timin (K)	28	0,000
Sitozin veya Guanin (S)	12	0,000
Adenin veya Timin (W)	99	0,001
Adenin hariç (B)	1	0,000
Sitozin hariç (D)	4	0,000
Guanin hariç (H)	0	0,000
Timin hariç (V)	2	0,000
Herhangi bir nükleotid (N)	170	0,001
C + G	58.739	0,375
A + T	97.462	0,622

Tablo 4.13: *C. baytopiorum*'un cpDNA analizinde di-nükleotid sayımı ve frekansı.

1. pos\2. pos	A		C		G		T	
A	16821	0,108	7000	0,045	8431	0,054	16007	0,103
C	8426	0,054	7468	0,048	5068	0,032	8851	0,057
G	10225	0,066	4656	0,030	6938	0,044	7068	0,045
T	12798	0,082	10690	0,069	8446	0,054	17140	0,110

*Frekanslar kırmızı renk ile gösterilmiştir.

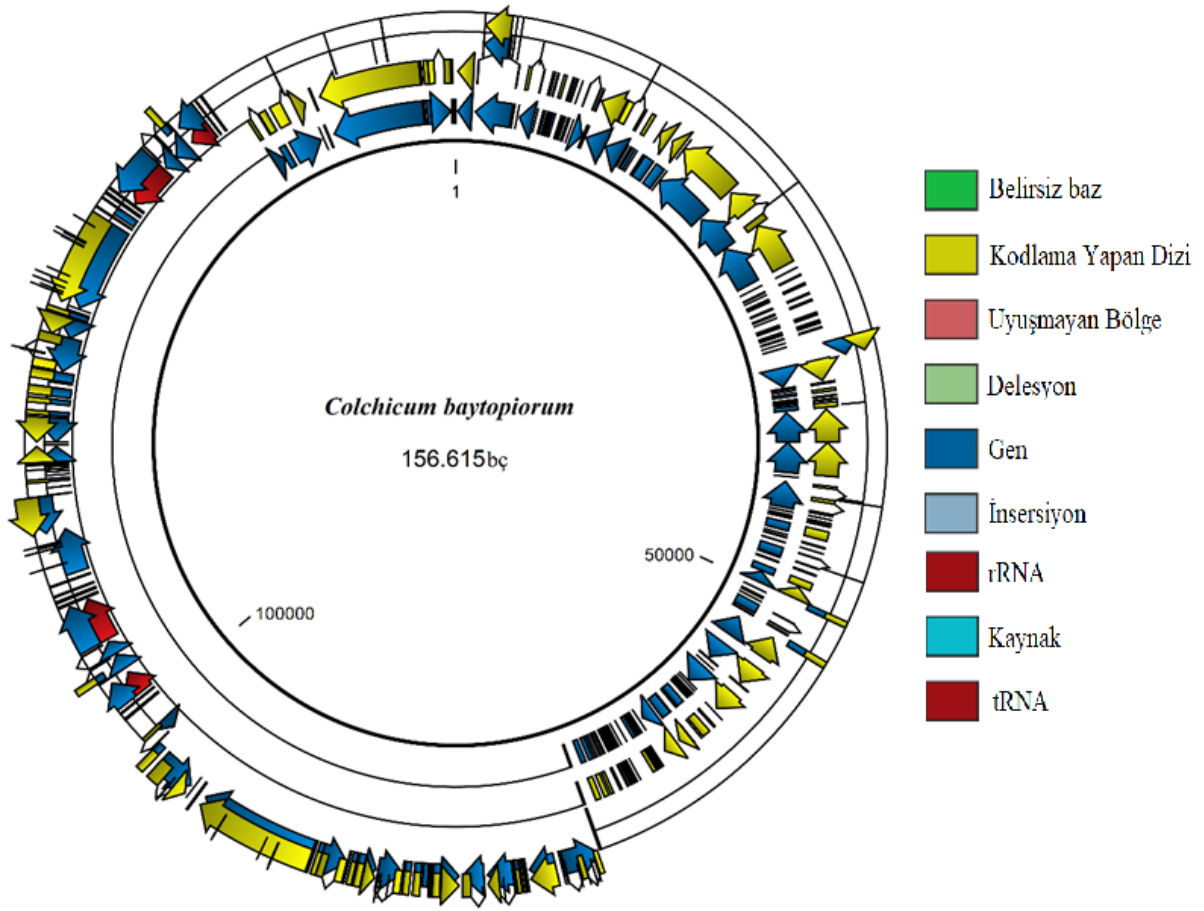
Tablo 4.14: *C. baytopiorum*'un cpDNA analizinde kodon bölgelerinin kodon istatistikleri, sayımı ve frekansı.

Kodon	Sayım	Frekans	GAA	790	0,04
AAA	730	0,03	GAC	171	0,01
AAC	236	0,01	GAG	283	0,01
AAG	259	0,01	GAT	650	0,03
AAT	716	0,03	GCA	354	0,02
ACA	320	0,01	GCC	230	0,01
ACC	236	0,01	GCG	157	0,01
ACG	150	0,01	GCT	536	0,02
ACT	427	0,02	GGA	602	0,03
AGA	412	0,02	GGC	193	0,01
AGC	97	0,00	GGG	316	0,01
AGG	133	0,01	GGT	518	0,02
AGT	335	0,02	GTA	490	0,02
ATA	564	0,03	GTC	163	0,01
ATC	364	0,02	GTG	172	0,01
ATG	527	0,02	GTT	457	0,02
ATT	919	0,04	TAA	0	0,00
CAA	561	0,03	TAC	157	0,01
CAC	126	0,01	TAG	0	0,00
CAG	183	0,01	TAT	639	0,03
CAT	390	0,02	TCA	304	0,01
CCA	247	0,01	TCC	294	0,01
CCC	202	0,01	TCG	148	0,01
CCG	118	0,01	TCT	477	0,02
CCT	341	0,02	TGA	0	0,00
CGA	290	0,01	TGC	60	0,00
CGC	86	0,00	TGG	377	0,02
CGG	93	0,00	TGT	176	0,01
CGT	319	0,01	TTA	739	0,03
CTA	288	0,01	TTC	446	0,02
CTC	163	0,01	TTG	466	0,02
CTG	144	0,01	TTT	767	0,04
CTT	462	0,02			

Tablo 4.15: *C. baytopiorum*'un cpDNA analizinde kodon pozisyonlarındaki nükleotid sayısı ve frekansı.

Kodon pozisyonu	A		C		G		T	
1. pozisyon	6425	0,30	4013	0,19	6082	0,28	5050	0,23
2. pozisyon	5891	0,27	4541	0,21	4007	0,19	7131	0,33
3. pozisyon	6691	0,31	3224	0,15	3526	0,16	8129	0,38

*Frekanslar kırmızı renk ile gösterilmiştir.

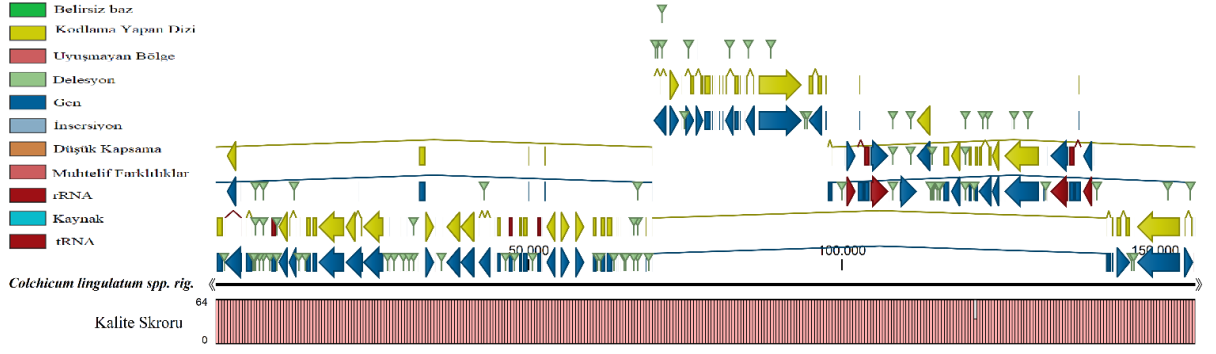


Şekil 4.3: *C. baytopiorum* halkasal cpDNA'sı.

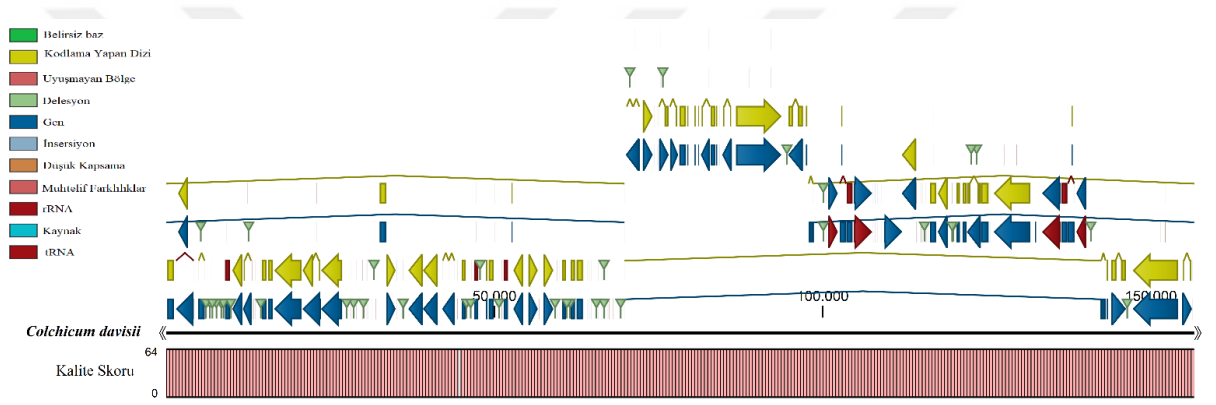
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında Türkiye’ye endemik olan bazı *Colchicum* taksonlarından *C. lingulatum* subsp. *rigescens*, *C. davisii*, *C. baytopiorum* materyal olarak seçilmiş olup bu örnek materyaller Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi’nden 2019 yılının Şubat ayında toplanmıştır. Henüz mevsimi olmamasından kaynaklı filizlenme az sayıda ve kısa boylu olduğu için toplanan örnekler, kloroplast DNA izolasyonunun yapılmasına olanak sağlayacak kadar yeterli çıkmamıştır. Bundan dolayı genomik DNA izolasyonuna karar verilmiş ve CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilecek olan DNA’ların dizilenmesi için ihtiyaç duyulan cihaz ve ekipmanların laboratuvar bünyesinde bulunmamasından dolayı hizmet alımına karar verilmiştir. Öncelikle isolatların kalitesi ölçülmüş ve dizilemeye uygun olanlar Kore’deki Macrogen firmasına gönderilmiş, Illumina HiSeq 2000 NGS cihazında dizileme yapılmıştır. Yaklaşık bir ay içinde gelen örneklerin genom sekans ham datası, NGS çalışma prensibinden dolayı hedef DNA’nın parçalara bölünüp okumalarının yer aldığı kontigler halinde gönderilmiştir ve CLC Genomics Workbench (v.12.0) programı kullanılarak, programın içinde kayıtlı olan farklı NGS platformlarının kullandığı hedef DNA’ya ilaveten eklenen adaptör dizilerinin okuma sonucunda hedef DNA okumasından çıkarılması için dizileme reaksiyonunun olduğu platform seçilerek adaptör dizi bilgileri ham datadan ayıklanmıştır. Daha sonra, ikincil datadan nükleer DNA’yı çıkarmak ve sadece kloroplast DNA’sını belirleyebilmek için NCBI BLAST programından *Colchicum autumnale*’nin tüm kloroplast DNA dizisi alınıp referans olarak kullanılmıştır. Referans ile her bir örnek DNA’sı haritalandırılmış ve eşleşen bölgeler ile bir istatistik çıkarılmıştır.

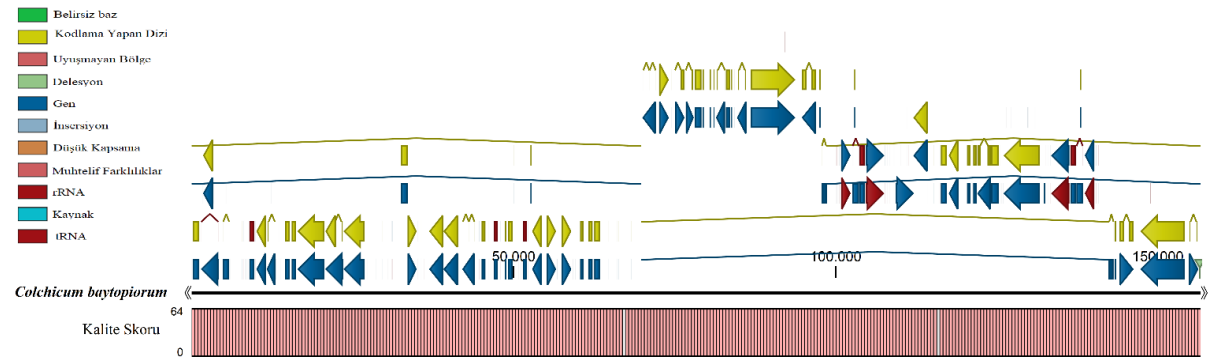
Üç örnekte de görülmektedir ki kloroplast DNA dizileri referans DNA dizisi ile çok benzerlik göstermektedir. Şekil 5.1, Şekil 5.2 ve Şekil 5.3’te “Kalite Skoru” olarak gösterilen kısımda kırmızı çizgiler örnek ile referansın eşleşen baz dizilimini ifade ederken aralardaki nadir gri boşluklar eşleşmeyen bazıları temsil etmektedir. Buradan, kloroplastların atası olduğu düşünülen Siyanobakterlerin bu uzun evrim süreci içinde DNA’larının yüksek oranda korunduğu çıkarımı çok da yanlış olmayacaktır. Şüphesiz ki bu hususta kesin olarak bir şey söyleyebilmek için daha fazla örnekten ve her bir örnekten de ayrı ayrı çok sayıda izolasyon yapıp dizi analizinin yapılması gerekmektedir.



Şekil 5.1: *C. lingulatum* subsp. *rigescens* ile *C. autumnale* cpDNA haritalandırması.

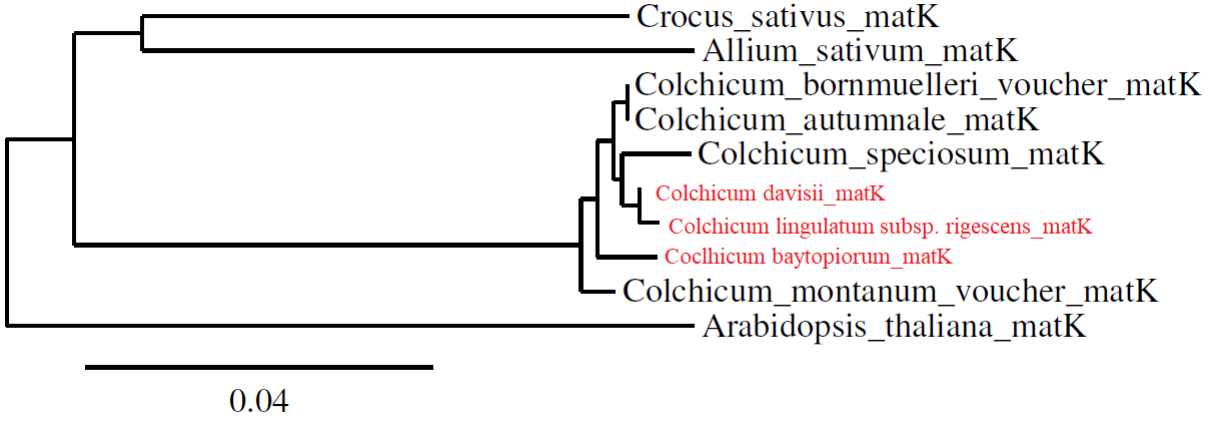


Şekil 5.2: *C. davisii* ile *C. autumnale* cpDNA haritalandırması.



Şekil 5.3: *C. baytopiorum* ile *C. autumnale* cpDNA haritalandırması.

Eldeki dizi bilgilerinden bitki barkotlamada da kullanılan matK geni üzerinden başka bitkiler ile T-Coffee programında Neighbour-joining temelli genetik ağaç oluşturulmuştur ve buradan çıkan datayı çizime dönüştürmek için de TreeDyn programı kullanılmıştır Oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4: Tez çalışmasında kullanılan *Colchicum* taksonlarının başka *Colchicum* taksonlarından bazıları ve farklı bitkiler ile matK geni üzerinden filogenetik ağacı.

Filogenetik açıdan yakınlığına bakmak için örnekler ile birlikte kıyaslama yapılan *Crocus sativus*, *Colchicum montanum*, *Colchicum speciosum*, *Colchicum autumnale*, *Colchicum bornmuelleri*, *Allium sativum* ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin matK gen dizisi NCBI BLAST programından alınmıştır.

Filogenetik yorumlama için tek bir gen üzerinden kanıya varılamaz, akrabalık ilişkilerini, yakınlık derecelerini gösterebilmek için diğer kloroplast genlerinin ve de nükleer genlerinin de kıyaslanması gerekmektedir. Ancak, tür içi ve birbirine yakın türler arasında plastom benzerliği oldukça dikkat çekicidir.

Bitki barkotlama, cp ve nrDNA'sı henüz çalışılmamış çok sayıda bitki bulunmasından dolayı, üzerinde çalışılan bitkilerden kalıtım materyallerinin analize uygun saflıkta ve konsantrasyonda elde edilmesinin zorluğundan dolayı, hâlâ gelişmekte olan dizileme metotlarının güncel koşullarının maliyetinin yüksek olması, zaman alıyor olması ve hataya müsait fazla teknik detay içermenin zorluğundan dolayı meşakkatli bir iştir. Bitkilerin bölgesel ya da tüm genom sekans bilgileri çoğaldıkça aynı alanda bakir çalışma konularına dair kıyaslama gücü, referans sayılarının çokluğu ve sağlamlığı sayesinde tuttuğu ışık artacaktır. Bu çalışmalar bitki

barkotlarının sayısını artırabilir ve güncel barkotların hassasiyetini yükseltebilir. Bununla beraber filogenetik çalışmalar bir adım daha netliğe kavuşabilir. Dünyada hem *Colchicum* hem de başka bitkiler üzerinden markör çalışmaları yapılmış olsa bile çok sınırlıyken Türkiye'ye endemik olan *Colchicum* türleri üzerinde yapılan markör çalışmaları ne yazık ki daha kısıtlıdır. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nden Mehmet AYDEMİR'in, Prof. Dr. Ahu Altınkut UNCUOĞLU'NUN danışmanlığında yayımlanan "Kloroplast Genomu Spesifik Markörleri İle *Colchicum* L. Türlerinin Filogenetik Analizi" adlı yüksek lisans tez çalışmasında 32'si endemik olan 49 tür ve 16 aday türü kapsayan 168 *Colchicum* örneklerinden kloroplast genomuna ait trnT-trnL-trnF genler arası bölgelerin DNA sekans bilgilerine filogenetik analizler yapılmıştır. Çalışmada, kodlama yapmayan kloroplast genomundan trnT-trnL-trnF bölgeleri PZR ile çoğaltılıp ABI 310 Genetik analizöründe Sanger Dizileme ile dizilenmiştir. Elde edilen dizi bilgileri CustalW programıyla kıyaslanmıştır. Çalışılan *Colchicum* genotiplerinin olası alt gruplarını da içeren genel populasyon yapısını tespit amacıyla STRUCTURE (v.2.3) yazılımı kullanılmıştır. Bu gen havuzunda yer alan *Colchicum* genotiplerinin populasyonlar içindeki genetik varyasyonlarını ortaya çıkarmak adına GenAlEx (v.6.41) programı kullanılarak Temel Bileşen Analizi (PCA- Principal Component Analysis) gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analiz için ise MEGA 6.06 programı kullanılarak Neighbour-joining temelli genetik ağaç oluşturulmuştur (Aydemir, 2015).

Bu çalışmalar arasında kullanılan materyal ve odaklandığı noktalar temelde benzerlik gösterse de birinde belli başlı kloroplast genlerinin PZR ile çoğaltılıp Sanger metoduna göre hedef DNA parçacıklarının dizi bilgisine ulaşılırken diğerinde ise kloroplast tüm genomunun NGS metoduna göre dizi bilgisine ulaşılmıştır.

Dizileme yöntemleri ilerledikçe yakın gelecekte bir canlının tüm genom dizisini elde etmek daha az maliyetle daha kısa sürelerde gerçekleşecektir. Günümüzde kısıtlı bütçeler ve biraz daha uzun sürelerde araştırmacılar çok az sayıda canlı genomunu dizileyip GenBank'a eklemekte olsalar bile gelecekte hızlı ve ucuz dizilemeler yaygınlaşana kadar maliyet ve zamandan tasarruf ancak bu araştırmacıların tecrübelerinin birikimlerinden yararlanarak olacaktır.

KAYNAKLAR

- Atik, A., Öztekin, M., & Erkoç, F. (2010). Biyoçeşitlilik ve Türkiye'deki Endemik Bitkilere Örnekler. *Gazi University Journal of Gazi Educational Faculty (GUJGEF)*, 30(1).
- Aydemir, M. (2015). *Phylogenetic Analysis of Colchicum L. Species With Chloroplast Genome-Specific Markers*. İstanbul: Marmara Üniversitesi.
- Bedbrook, J. R., & Bogorad, L. (1976). Endonuclease Recognition Sites Mapped on Zea Mays Chloroplast DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4309-4313.
- Brink, M. v. (2010). *Colchicum Lingulatum* ssp. *Rigescens* or *C. Balansae*? - Some Plants Slightly Tessellated (About 10 km Past Junction to Bozburun on the Marmaris - Datça Road, About 150m Altitude on Serpentine). <https://photos.v-d-brink.eu/Flora-and-Fauna/Asia/Turkey-Western-part/i-HxfBnc9> [Ziyaret tarihi: 23 Mayıs 2019].
- ChemIDplus. (2019). <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0000064868> [Ziyaret Tarihi: 23.05.2019].
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., & Zhou, S. (2016). Barcoding the Kingdom Plantae: New PCR Primers for ITS Regions of Plants with Improved Universality and Specificity. *Molecular Ecology Resources*, 138-149.
- Clarke, J., Wu, H. C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H. (2009). Continuous Base Identification for Single-Molecule Nanopore DNA Sequencing. *Nature nanotechnology*, 265.
- Coyle, H. M., Lee, C., Lin, W., Lee, H. C., & Palmbach, T. M. (2005). Forensic Botany: Using Plant Evidence to Aid in Forensic Death Investigation. *Croatian Medical Journal*, 606.
- Doolittle, W. (1999). Phylogenetic Classification and the Universal Tree. *Science*, 2124-2128.
- Durmaz, R. (2001). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevi.
- Edwards, A., & Cavalli-Sforza, L. (1964). Phylogenetics is That Branch of Life Science, Which Deals with the Study of Evolutionary Relation Among Various Groups of Organisms, Through Molecular Sequencing Data. *Systematics Association Publications*, 67-76.

- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., & Bibillo, A. (2009). Real-time DNA Sequencing From Single Polymerase Molecules. *Science*, 133-138.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., & Adıgüzel, N. (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Red Data Book of Turkish Plants)*. Ankara: Türkiye Tabiatını Koruma Derneği.
- Engel, T., & Küçüker, O. (1994). Micromorphological Examination of Leaf, Fruit, Tunica and Seed Surfaces of Anatolian *Colchicum* Species. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 123-133.
- Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., & Labra, M. (2013). DNA Barcoding as a New Tool for Food Traceability. *Food Research International*, 55-63.
- Gelvin, S., Heizmann, P., & Howell, S. H. (1977). Identification and Cloning of the Chloroplast Gene Coding for the Large Subunit of Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase from *Chlamydomonas Reinhardi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3193-3197.
- Göpfrieh, K., & Judge, K. . (2018). Decoding DNA with a Pocket-sized Sequencer. *Science in School*, 43.
- Gunter, C., & Dhand, R. (2005). The Chimpanzee Genome. *Nature*, 47.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., & Başer, K. (2000). *Flora of Turkey and the east Aegean Islands*. Supplement, 2, 28.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., & Dewaard, J. (2003). Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 313-321.
- Hilu, K., & Liang, G. (1997). The matK Gene: Sequence Variation and Application in Plant Systematics. *American Journal of Botany*, 830-839.

- Hollingsworth, P. M., Forrest, L., Spouge, J., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., & Fazekas, A. (2009). A DNA Barcode for Land Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 12794-12797.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S., & Little, D. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *Plos One*, e19254.
- Huxley-Jones, E. L., Shaw, J. L., Fletcher, C., Parnell, J., & Watts, P. C. (2012). Use of DNA Barcoding to Reveal Species Composition of Convenience Seafood. *Conservation Biology*, 367-371.
- Kamps, R., Brandão, R., Bosch, B., Paulussen, A., Xanthouleas, S., Blok, M., & Romano, A. (2017). Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *International Journal of Molecular Sciences*, 308.
- Kasapligil, B. (1961). Foliar Xeromorphy of Certain Geophytic Monocotyledons. *Madrono*, 43-70.
- Kaya, Y., & Aksakal, Ö. (2005). Distribution of Endemic Plants in the World and Turkey. *Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 85-99.
- Knox, E. B. (2014). The Dynamic History of Plastid Genomes in the Campanulaceae Sensus Lato is Unique Among Angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11097-11102.
- Küçüker, O. (1985). The Morphological, Anatomical and Cytological Studies on Some *Colchicum* Species of İstanbul Area. *Journal of Science of Istanbul University*, 87-111.
- Küçüker, O. (1992). *Colchicum Bivonae* Guss.'de "Lateral Kontraktıl Öncü Kök" Gelişimi. *Doga, Turkish Journal of Botany*, 117-123.
- Küçüker, O., & Çelebioğlu, T. (1986). *Liliaceae (Colchicum)* in IOPB Chromosome Number Reports. *Taxon*, 901.
- Küçüker, O., & Çelebioğlu, T. (1988). Micromorphological and Anatomical Structure of the Seed - Testa of Some *Colchicum (Liliaceae)* Species. *Candollea*, 129 - 138.

- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A New Method for Sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 560-564.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing Technologies — The Next Generation. *Nature reviews genetics*, 31.
- Mildenhall, D. (2006). Hypericum Pollen Determines the Presence of Burglars at the Scene of a Crime: an Example of Forensic Palynology. *Forensic Science International*, 231-235.
- Mower, J., Touzet, P., Gummow, J., Delph, L., & Palmer, J. (2007). Extensive Variation in Synonymous Substitution Rates in Mitochondrial Genes of Seed Plants. *BMC Evolutionary Biology*, 135.
- Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi web sitesi. (2019). *Tehdit Altında Bitki Türleri Listesi*. <http://www.tehditalindabitkiler.org.tr/v2/index.php?sayfa=istatistik>, [Ziyaret tarihi: 23 Mayıs 2019].
- Nyrén, P., Nore, B., & Baltscheffsky, M. (1986). Studies on Photosynthetic Inorganic Pyrophosphate Formation in Rhodospirillum Rubrum Chromatophores. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 276-282.
- Oxford University Press. (2019). *A Dictionary of Biology*, 8. ed. Oxford: Oxford University Press.
- Özhatay, N., & Kültür, Ş. (2006). Check-list of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey III. *Turkish Journal of Botany*, 281-316.
- Özyurt, S. (1978). *Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinin Liliaceae Familyası Geofitleri Üzerinde Taksonomik Araştırmalar*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Özyurt, S. (1978). *Palandöken Dağları Çevresinin Familyasına Ait Bazı Geofitler Üzerinde Morfolojik ve Ekolojik İncelemeler*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Pacific Bulb Society. (2019). *Colchicum A-H*. Arnold Trachtenberg, [Ziyaret tarihi: 23 Mayıs 2019].
- PubChem. (2019). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [Ziyaret Tarihi: 23.05.2019].

- Rodriguez-Garcia, A., Hosseini, S., Martinez-Chapa, S., & Cordell, G. (2017). Multi-target Activities of Selected Alkaloids and Terpenoids. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 272-279.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 441-448.
- Sanger, F., Air, G., Barrell, B., Brown, N., Coulson, A., Fiddes, J., & Smith, M. (1977). Nucleotide Sequence of Bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 687.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5463-5467.
- Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A Window into Third-generation Sequencing. *Human Molecular Genetics*, R227-R240.
- Sevgi, E., & Küçüker, O. (2011). Morpho-Anatomical Observations on *Colchicum boissieri* Orph. Turkey. *IUFS Journal of Biology*, 53-61.
- Siqueira, J., Fouad, A., & Roças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a Tool for Better Understanding of Human Microbiomes. *Journal of Oral Microbiology*, 10743.
- Sivaperuman, C., Jaisankar, I., Velmurugan, A., Venkata, T., & Sharma, R. (2008). Tropical Islands: Ecosystem and Endemism. *Biodiversity and Climate Change Adaptation in Tropical Islands*, 31-52.
- Sugiura, M., Shinozaki, K., Zaita, N., Kusuda, M., & Kumano, M. (1986). Clone Bank of the Tobacco (*Nicotiana Tabacum*) Chloroplast Genome as a Set of Overlapping Restriction Endonuclease Fragments: Mapping of Eleven Ribosomal Protein Genes. *Plant Science*, 211-217.
- Svensson, G. (2015). *Colchicum davisii* at Gothenburg Botanical Garden. Plant id: 1985-0364 p W -- Edinburgh PD 26938. [Ziyaret tarihi: 23 Mayıs 2019].
- TÜBİVES. (2019). *Türkiye Bitkileri Veri Servisi - Turkish Plants Data Service*. [Ziyaret tarihi: 23 Mayıs 2019].

- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., & Çakiris, A. (2014). New Generation DNA Sequencing (Yeni Nesil DNA Dizileme). *Dergipark*, 11-18.
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA Barcoding for Ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 110-117.
- Vijayan, K., & Tsou, C. H. (2010). DNA Barcoding in Plants: Taxonomy in a New Perspective. *Current Science*, 1530-1541.
- Wen, X., & Zhong, S. (2018). *3D Genome from Technology to Visualization*. <https://zhonglab.gitbook.io/3dgenome/chap0-preparation/0.2-sequencing-technologies> [Ziyaret Tarihi: 23.05.2019].
- Wu, R. (1970). Nucleotide Sequence Analysis of DNA: I. Partial Sequence of the Cohesive Ends of Bacteriophage λ and 186 DNA. *Journal of Molecular Biology*, 501-521.
- Wu, R., Chen-pei, D. T., & Padmanabhan, R. (1973). Nucleotide Sequence Analysis of DNA XII. The Chemical Synthesis and Sequence Analysis of a Dodecadeoxynucleotide which Binds to the Endolysin Gene of Bacteriophage Lambda. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (s. 1092-1099).
- Yoon, C. (1993). Botanical Witness for the Prosecution. *Science*, 894-896.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Okan ÜNLÜ
Doğum Yeri	Şişli
Doğum Tarihi	12.06.1987
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	+905399251844
E-Posta Adresi	ms.okanunlu@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	30.07.2009

Yüksek Lisans	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	

Makale ve Bildiriler