

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***DORONICUM ORIENTALE* HOFFM. TÜRÜNÜN POPÜLASYON DÜZEYİNDE  
BAZI MOLEKÜLER ÖZELLİKLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Elif KADIOĞLU**

**MART 2013**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***DORONICUM ORIENTALE* HOFFM. TÜRÜNÜN POPÜLASYON DÜZEYİNDE  
BAZI MOLEKÜLER ÖZELLİKLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Biyolog Elif KADIOĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.02.2013**  
**Tezin Savunma Tarihi : 01.03.2013**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ**

**Trabzon 2013**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Elif KADIOĞLU tarafından hazırlanan**

***DORONICUM ORIENTALE* HOFFM. TÜRÜNÜN POPÜLASYON DÜZEYİNDE  
BAZI MOLEKÜLER ÖZELLİKLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 12/02/2013 gün ve 1493 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ .....**

**Üye : Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ .....**

**Üye : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

*Doronicum orientale* Hoffm. türünün popülasyon düzeyinde bazı moleküler özellikler açısından değerlendirilmesi adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımın yürütülmesinde ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ'ye teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Moleküler biyoloji laboratuvarının olanaklarını kullanma imkanı veren sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, bitki materyallerinin elde edilmesinde bu çalışmaya büyük katkılar sağlayan Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU, Doç. Dr. Serdar MAKBUL ve Arş. Gör. Mustafa KARAKÖSE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde ve tezimin yazılmasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Mutlu GÜLTEPE'ye, lisansüstü eğitimim boyunca her türlü yardım ve desteğini gördüğüm arkadaşım Zeynep ÇOLAK'a, haritaların hazırlanmasında yardımcı olan Zeynep TÜRKER'e, fotoğrafların hazırlanmasında yardımcı olan Abdurrahman ATALAY ve Mücahit ÇAKMAK'a ve yardımlarını esirgemeyen tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm yaşamımda olduğu gibi, çalışmalarım süresince karşılaştığım güçlükleri aşmamda her zaman moral ve motivasyon sağlayan çok sevgili aileme ve değerli dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Elif KADIOĞLU  
Trabzon 2013

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Doronicum orientale* Hoffm. türünün Popülasyon Düzeyinde Bazı Özellikler Açısından Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ’ nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Elif KADIOĞLU

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                          | <u>Sayfa No</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| ÖNSÖZ .....                                                                                              | III             |
| TEZ BEYANNAMESİ.....                                                                                     | IV              |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                         | V               |
| ÖZET .....                                                                                               | VII             |
| SUMMARY .....                                                                                            | VIII            |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                     | IX              |
| TABLolar (ÇİZELGELER) DİZİNİ.....                                                                        | X               |
| SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                    | XI              |
| 1. GENEL BİLGİLER .....                                                                                  | 1               |
| 1.1. Giriş.....                                                                                          | 1               |
| 1.2. Literatür Özeti .....                                                                               | 3               |
| 1.3. Moleküler SistematiK .....                                                                          | 8               |
| 1.4. <i>Doronicum</i> Cinsinin ve <i>D. orientale</i> Türünün Taksonomik ve<br>Fitocoğrafik Durumu ..... | 12              |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....                                                                              | 13              |
| 2.1. Materyalin Temini ve Saklanması.....                                                                | 13              |
| 2.2. Teşhis Çalışmaları .....                                                                            | 14              |
| 2.3. Moleküler Çalışmalar .....                                                                          | 15              |
| 2.3.1. DNA İzolasyonu.....                                                                               | 15              |
| 2.3.1.1. AgaroZ Jel Elektforezinde Genomik DNA Tespiti .....                                             | 16              |
| 2.3.2. Çalışılan Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması.....                                                    | 17              |
| 2.3.3. AgaroZ Jel Elektforezinde PCR Ürünü Kontrolü.....                                                 | 17              |
| 2.3.4. Baz Dizin Analizlerinin Gerçekleştirilmesi .....                                                  | 17              |
| 2.3.5. Veri Analizlerinin Gerçekleştirilmesi .....                                                       | 18              |
| 2.3.6. RAPD .....                                                                                        | 18              |
| 3. BULGULAR .....                                                                                        | 20              |
| 4. TARTIŞMA.....                                                                                         | 26              |
| 5. SONUÇLAR .....                                                                                        | 31              |
| 6. ÖNERİLER .....                                                                                        | 32              |

|          |                |    |
|----------|----------------|----|
| 7.       | KAYNAKLAR..... | 33 |
| 8.       | EKLER .....    | 39 |
| ÖZGEÇMİŞ |                |    |

Yüksek Lisans

ÖZET

*DORONICUM ORIENTALE* HOFFM. TÜRÜNÜN POPÜLASYON DÜZEYİNDE BAZI MOLEKÜLER ÖZELLİKLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elif KADIOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ  
2013, 38 Sayfa, 8 Sayfa Ekler

Bu çalışmada *Doronicum orientale* Hoffm. (Asteraceae) türüne ait 19 popülasyon, nrDNA ITS bölgeleri ve RAPD profilleri açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri 2004-2012 yılları arasında vejetasyon döneminde toplanmıştır. Toplanan örnekler silika jel içinde kurutulmuş ve yapraklardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Popülasyonlara ait ITS bölgeleri, evrensel ITS primerleri kullanılarak çoğaltılmış ve baz dizin analizleri gerçekleştirilmiştir. ITS bölge uzunluğunun 703-711 bp arasında, ITS1 uzunluğu 209-211 bp arasında, ITS2 uzunluğu 257-258 bp arasındadır. Bütün ITS dizinindeki % GC içeriğinin 53,2-53,6 arasında değiştiği bulunmuştur. ITS1 bölgesinin % GC içeriği 53,1-53,6 arasında değişirken, ITS2 bölgesinin % GC içeriğinin ise 51,8-52,7 arasında bulunmuştur. Üç RAPD primeri kullanılarak elde edilen DNA bantlarının büyüklüğü 350-2000 bp arasında değişmektedir. Oluşan toplam 23 banttan 21'inin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bantların dağılımları esas alınarak incelenen örneklerin benzerlik düzeyleri tespit edilmiştir. Ayrıca analizler sonucu elde edilen veriler kullanılarak popülasyonlar arasındaki moleküler varyasyonlar da tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Doronicum orientale*, nrDNA ITS, RAPD, popülasyon

Master Thesis

SUMMARY

THE ASSESSMENT OF *DORONICUM ORIENTALE* HOFFM. BASED ON  
MOLECULAR FEATURES AT THE POPULATION LEVEL

Elif KADIOĞLU

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Kamil COŞKUNÇELEBİ  
2013, 38 Pages, 8 Pages Appendix

In this study, 19 populations belonging to *D. orientale* Hoffm. (Asteraceae) were compared based on nrDNA-ITS and RAPD profiles. Plant materials used in this study were collected in suitable vegetation period during the field study in 2004-2010. DNA isolation was carried out from healthy silica-dried leaves. Primarily, ITS regions of the examined populations were amplified by using ITS universal primers and then sequenced. It was determined that length of ITS region varies between 703-711bp. While length ITS1 varies between 209-211 bp, length of ITS2 varies between 257-258 bp. In addition, it was found that % GC contents of whole ITS varies between 53,2-53,6. While, % GC content is 53,1-53,6 in ITS1 it is 51,8-52,7 in ITS 2. The size of DNA bands obtained using three RAPD primers varies from 350 to 2000 bp. It was found that 21 of total 23 bands were polymorphic. Examined samples base on the bands profile were grouped according to similarity level. Additionally molecular variations among the examined populations were identified by phylogenetic analysis.

**Key Words:** *Doronicum orientale*, nrDNA ITS, RAPD, population, Turkey.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|           |                                                                                              |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.  | ITS bölgelerinin genomik DNA üzerindeki yerleşimi.....                                       | 9  |
| Şekil 2.  | ITS primerlerinin rDNA bölgesi üzerindeki bağlanma yerleri .....                             | 9  |
| Şekil 3.  | <i>D. orientale</i> 'nin Türkiye'deki yayılışı .....                                         | 12 |
| Şekil 4.  | Örneklerin toplandığı noktalar .....                                                         | 14 |
| Şekil 5.  | <i>Doronicum orientale</i> Hoffm. ....                                                       | 15 |
| Şekil 6.  | ITS verilerinin (5,8 S hariç) MEGA programı ile analizinden elde edilen<br>UPGMA ağacı ..... | 21 |
| Şekil 7.  | OPA 7 RAPD primeri ile elde edilen bant profili .....                                        | 23 |
| Şekil 8.  | OPA 8 RAPD primeri ile elde edilen bant profili .....                                        | 23 |
| Şekil 9.  | OPA19 RAPD primeri ile elde edilen bant profili .....                                        | 24 |
| Şekil 10. | RAPD verilerine göre elde edilen dendogram .....                                             | 24 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                          | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Tablo 1. Çalışmada kullanılan <i>D. orientale</i> örneklerine ait toplama bilgileri..... | 13                     |
| Tablo 2. Çalışmada kullanılan RAPD primerleri .....                                      | 19                     |
| Tablo 3. ITS nükleotit dizisindeki (5,8S hariç) varyasyon bölgeleri .....                | 22                     |
| Tablo 4. Çalışmada kullanılan RAPD primerlerine ait bilgiler.....                        | 22                     |

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------|
| AFLP              | : Artırılan Parça Uzunluğu Polimorfizmi       |
| bp                | : Baz çifti                                   |
| cpDNA             | : Kloroplast DNA                              |
| dH <sub>2</sub> O | : Distile su                                  |
| DNA               | : Deoksiribonükleik Asit                      |
| dNTP              | : Deoksinükleozit trifosfat                   |
| EDTA              | : Etilen Diamino Tetra Asetik Asit            |
| ETS               | : External Transcribed Spacer                 |
| g                 | : Gram                                        |
| IGS               | : Intergenic Spacer                           |
| ITS               | : Internal Transcribed Spacer                 |
| KTUB              | : KTU Biyoloji Bölümü Herbaryumu              |
| m                 | : Metre                                       |
| <i>matK</i>       | : Maturaze K geni                             |
| MgCl <sub>2</sub> | : Magnezyum klorür                            |
| mRNA              | : Elçi RNA                                    |
| mtDNA             | : Mitokondriyal DNA                           |
| nrDNA             | : Nüklear ribozomal DNA                       |
| NTS               | : Non Transcribed Spacer                      |
| PCR               | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                 |
| PVPP              | : Poli Vinil Poli Piroolidan                  |
| RAPD              | : Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA         |
| rDNA              | : Ribozomal DNA                               |
| RFLP              | : Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi |
| RNA               | : Ribonükleik Asit                            |
| rRNA              | : Ribozomal RNA                               |
| TAE               | : Tris-Asetik asit-EDTA                       |
| <i>Taq</i>        | : <i>Thermus aquaticus</i>                    |
| TE                | : Tris-EDTA                                   |
| tRNA              | : Taşıyıcı RNA                                |
| µl                | : Mikrolitre                                  |

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

*Doronicum* L. (Asteraceae) çok yıllık otsu bitkilere sahip bir cinstir. Büyük sarı çiçekleriyle dikkat çeken bu cinsin türleri kaplanotu, öküzgözü papatyası gibi farklı isimlerle anılmaktadır (Tekin, 2007; Tuzlacı, 2006). Asya'dan, Avrupa ve Afrika'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermesine rağmen tür sayısının az olması, farklı ekolojik koşullara uyum yeteneklerinin yüksek olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bugünkü verilere göre bu cins dünyada yaklaşık olarak 26 tür ile temsil edilmekte ve bunların önemli bir kısmı ülkemizde de yayılış göstermektedir. Bu durum cinsin önemli yayılış alanlarından birinin ülkemiz olduğunu göstermektedir. Ülkemiz türlerini kaleme alan Edmondson (1975)'e göre ülkemizde yayılış gösteren takson sayısı 14'tür. Bunların 6'sı önemli gen kaynaklarımız arasında yer alan endemik taksonlardır.

*Doronicum* cinsine ait taksonlar daha çok ormanlık bölgelerden, nemli veya kayalık alanlara ve su kaynaklarına yakın yerlerden yüksek alpin alanlara kadar çok farklı ekolojik koşullarda yayılış gösterebilmektedirler.

Ülkemizde yayılış gösteren *Doronicum* cinsine bağlı türlerden endemik olanlar yaşam alanı bakımından oldukça sınırlı bir yaşam alanına sahipken, diğer türleri nispeten daha geniş alanlarda yayılış göstermektedirler. Yaşam alanı bakımından hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde en dikkat çeken türlerden biri *D. orientale* Hoffm.'dır. *D. orientale* Doğu Akdeniz bölgesi başta olmak üzere Sicilya'dan Suriye'ye oradan Kafkaslar'a kadar uzanan çok geniş bir coğrafyada yayılış gösteren bir türdür. Ülkemizde ise başta Orta ve Kuzey Anadolu olmak üzere, hemen hemen tüm ülkemizde yayılış göstermektedir. Yaşam alanları 50-2000 m yüksekliğe kadar olan daha çok dere kenarları, orman altı ve nemli alanlardır (Alvarez, 2003).

Çok farklı habitatlarda yayılış gösterebilen *D. orientale* sistematik açıdan da oldukça değişken özelliklere sahiptir. Tür üzerinde gerçekleştirilen/gerçekleştirilecek sistematik çalışmalardan elde edilen/edilecek bilgiler hem cinsin hem de türün sistematik durumunu daha da somut hale getirecektir. *Doronicum* cinsi üzerinde şu ana kadar gerçekleştirilmiş önemli çalışmalardan biri de Cavillier (1907,1911) tarafından yapılan taksonomik revizyon çalışmalarıdır. Kullanılan karakterlerin yetersizliği çalışmanın cinsin taksonomik

problemini çözmede sınırlı kalmasına sebep olmuştur. Bu nedenle daha sonraki yıllarda *Doronicum* cinsi üzerinde çok sayıda kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Bunlar arasında son yıllarda taksonomik problemlerin çözümünde önemli verilerin elde edildiği bazı moleküler çalışmalar da mevcuttur (Alvarez, 2001). Alvarez (2001) yaptığı çalışmada, ülkemizde de yayılış gösteren bazı *Doronicum* taksonlarını da kullanmıştır. Bu çalışma dışında Doğu Karadeniz Bölgesinde yayılış gösteren *Doronicum* türleri biyosistemik yönden araştırılmış ve taksonomik çözüme kavuşturulmaya çalışılmıştır (Umdü, 2005). Ancak ülkemiz türleri bir bütün olarak ele alınmadığı için cinsin ülkemizdeki sistematik durumu henüz tam olarak çözüme kavuşturulmuş değildir.

Günümüzde bitki türlerinin tanımlanması, tür içi ve türler arası varyasyonların ortaya konulabilmesi için moleküler tekniklerden ve verilerden sıkça yararlanılmaktadır. *D. orientale* türü ile ülkemizde yayılış gösteren diğer türler üzerinde bugüne kadar söz konusu teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiş bir çalışma mevcut değildir. Bununla birlikte tür içi varyasyonun ortaya çıkartılması için son yıllarda farklı popülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiş birçok moleküler çalışmalar mevcuttur. Bu tür çalışmalarda, genomik DNA üzerinde yer alan nrITS (Internal Transcribed Spacers) bölgesi ve yine genomik DNA üzerinde yer alan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aracılığı ile çoğaltılan belli uzunluktaki bölgeler kullanılmaktadır. ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarında son yıllarda sıklıkla kullanılan bir bölge haline gelmiştir (Baldwin vd., 1995). Bu bölgelerin çoğaltılıp baz çeşitliliğinin ortaya çıkartılması taksonlar arasındaki farklılıkların ve akrabalık derecelerinin belirlenmesinde oldukça önem arz etmektedir. Tek kısa ve rastgele primerler kullanılarak, bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılması prensibine dayalı bir teknik olan RAPD, tek bir baz değişikliği dahil olmak üzere farklı seviyelerdeki DNA çeşitliliklerini tespit ederek tür içinde ve türler arasında varyasyonların belirlenmesinde son yıllarda kullanılan ekonomik ve hızlı bir teknik olmuştur (Carlson vd., 1991; Roy vd., 1992; Bardakçı, 2001).

Çalışma konusunu oluşturan *D. orientale* türü Doğu Akdeniz'den Kafkaslar'a kadar uzanan çok geniş bir alanda yayılış göstermektedir. Bu durum türün farklı coğrafik ve ekolojik koşullarda adapte olabilen bir çok popülasyon ile temsil edilmesiyle sonuçlanır. *D. orientale*'nin ülkemizdeki yayılışı ise daha çok Kuzey Anadolu'da yoğunlaşmakla beraber, hemen hemen tüm Anadolu'yu kapsamaktadır. Bu çalışmada ülkemizin üç farklı bitki coğrafyasının kapsadığı alanlarda yayılış gösterebilen ve ülkemizin *Doronicum* cinsine ait en geniş yayılışlı türü olan *D. orientale*'nin çok sayıda popülasyonu çeşitli

moleküler teknikler (nrDNA ITS ve RAPD) kullanılarak incelenmesi ve böylece tür içi moleküler varyasyonun ortaya çıkartılması amaçlanmaktadır.

## 1.2. Literatür Özeti

*Doronicum*, Asteraceae familyasına ait çok yıllık otsu bitkilere sahip bir cinstir. Bu cins Kuzey Afrika, Avrupa, Güney ve Orta Asya'da yayılış gösteren 26 tür ve 4 alttür ile temsil edilmektedir (Alvarez, 2003). Türkiye'de ise 6'sı endemik olan 14 tür, Orta ve Kuzey Anadolu'da geniş yayılışa sahiptir. Ülkemizde bulunan *Doronicum* türleri genel olarak alpin ve subalpin bölgelerde, dere kenarlarında, kayalık yerlerde ve orman altlarında bulunmaktadır (Edmondson, 1975).

*Doronicum*, Asteraceae familyasının Senecioneae tribusuna ait bir cinstir (Cronquist, 1968). *Doronicum* cinsinin taksonomik problemleri tarih boyunca değişik şekillerde ele alınmış ve birçok çalışma ile çözülmeye çalışılmıştır.

Linnaeus'den daha önceki bazı araştırmacılar *Senecio*, *Aster* ve *Arnica* cinslerinin türlerini de *Doronicum* cinsine ait olarak kabul etmişlerdir. Fakat Linnaeus (1753), *Doronicum*'u müstakil bir cins olarak tanımlamış ve 4 türden oluştuğunu belirtilmiştir. Ancak Linnaeus (1753)'nin belirttiği bu 4 türden yalnızca *D. pardlianches* L. ve *D. plantagineum* L. hala *Doronicum* cinsi içinde yer almaktadır. Linnaeus tarafından *Arnica* cinsine dahil edilen *Arnica scorpioides* L. türü, Lamarck (1786), tarafından *Doronicum* cinsine dahil edilmiştir. *Arnica* ve *Doronicum* cinslerinin morfolojik olarak birbirlerine yakın oluşları bu iki cinsin karıştırılmasına neden olmuştur. Fakat Nordenstam (1977), tarafından aken, anter ve polenlerin mikromorfolojik olarak incelenmesiyle *Arnica* cinsi Senecioneae tribusundan ayrılmıştır (Alvarez, 2003).

*Doronicum* cinsinin bazı türlerinde aken morfolojisinin farklı olduğu bilinmektedir. Bu durum cinsin taksonomik tarihinde önemli bir özelliktir. Lamarck (1786), cinsin bu özelliğinden yararlanarak heterokarpelli ve homokarpelli türleri sırasıyla arniques ve doronics olarak ayırmıştır. Necker (1790), ise *Aronicum* cinsini homokarpelli türlere dahil etmiş ve bu sınıflandırma 19. yüzyılda birçok araştırmacı tarafından kabul görmüştür (Alvarez, 2003). Bazı araştırmacılar ise *Aronicum*'u *Doronicum*'un bir alt seksiyonu olarak kabul etmişlerdir (Alvarez, 2003). Sınıflandırmanın bu kadar karmaşık olması Bentham ve Hooker (1873) tarafından *Aronicum*'un *Doronicum* cinsinin sinonimi olarak kabul edilmesiyle son bulmuştur. Cassini (1817), *Grammarthron* cinsini *G. biligulatum* ve *G.*

*scorpioides* adlı iki türden oluştuğunu belirtmiş fakat günümüzde bu türler *Doronicum* cinsine dahil edilmiştir (Alvarez, 2003). De Candolle (1836), tarafından tanımlanan *Fullartonia*’ ya ait *F. kamaonensis* türü günümüzde *D. kamaonense* (DC.) Alv. Fern olarak kabul edilmiştir. Ayrıca de Candolle (1838), *Doronicum* cinsini *Eudoronicum* ve *Chromochaeta* olmak üzere 2 farklı seksiyona ayırmıştır. Fakat Maguire (1943), *Chromochaeta* seksiyonuna ait *D. linifolium* (Wall.) DC. türünü yaptığı çalışmalarla *Senecio* cinsine aktarmıştır (Alvarez, 2003).

Cavillier (1907, 1911), tarafından *Doronicum* cinsine ait revizyonel iki çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarında başta tüy karakterleri olmak üzere değişik morfolojik karakterleri kullanmıştır. Alvarez (2003)’e göre Cavillier’in kullandığı karakterlerin cinsin sınıflandırılmasında ayırt edici nitelik taşıması bu çalışmanın sınırlı kalmasına neden olmuştur.

Cavillier (1907, 1911), *Doronicum* ile yaptığı çalışmalarını iki kısımda gerçekleştirmiştir. Birinci kısım homokarpelli türleri içerirken, ikinci kısım ise heterokarpelli türleri içermektedir. Fakat Cavillier’in yaptığı bu çalışmalarda, kullandığı karakterlerin doğal gruplar oluşturmadığı kanaatine vararak yeni bir sınıflandırma önermiştir. Böylece *Doronicum* cinsini 3 seksiyon, 7 altseksiyon ve 34 türe ayırmıştır (Cavillier, 1911). *Doronicum* cinsi üzerine yapılan farklı çalışmalar Cavillier’in kullandığı karakterlerin farklı türlerin ortak özelliği olduğunu ve bu sınıflandırmanın geçerli olamayacağını belirtmektedir (Alvarez vd., 2001). Cavillier’in bu çalışmalarından sonra cinsin içinde bazı taksonomik değişiklikler olmuş ve yeni türler tanımlanmıştır. Ayrıca yeni bir altseksiyon oluşturulmuş (Edmondson, 1978) ve bazı yeni düzenlemeler yapılmıştır. Bütün bu çalışmalara rağmen cinsin taksonomik problemlerinin tam olarak çözüldüğü söylenememektedir (Alvarez, 2003).

Her ne kadar Cavillier (1907, 1911)’in yaptığı sınıflandırmaların eksik yanları olsa da bazı araştırmacılar tarafından kısmen desteklenerek tekrar kullanılmıştır. Willkomm ve Lange (1870), Rus Florasında yaptıkları sınıflandırmada Cavillier’in çalışmasından yararlanarak *Doronicum* cinsini *Aronicum* ve *Pardalianches* olmak üzere 2 seksiyona ayırmışlardır. Edmondson (1978) ise, Cavillier’in çalışmasını temel almış fakat monotipik bir altseksiyon olan *Isaurica*’yı tanımlamıştır (Alvarez, 2003).

*Doronicum*’un taksonomisindeki karmaşıklığını açıklığa kavuşturmak için morfolojik ve moleküler bazı çalışmalar da yapılmıştır. Cinsine ait bazı türlerin lektotipleri belirlenmiş ve cinsine ait bazı türler yeniden düzenlenerek cinsin sorunları çözülmeye

çalışılmıştır (Alvarez ve Nieto, 1997, 1999). Ayrıca cinsin morfometrik karakterleri göz önünde bulundurularak 5 ana grup altında incelenmiş ve analizi yapılan karakterler ile cinsin taksonomisine katkıda bulunulmuştur (Alvarez ve Nieto, 2001).

*Doronicum* üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle morfolojik karakterler ile sorun çözülmeye çalışılmıştır. Alvarez (2003), yaptığı bir çalışma ile *Doronicum* cinsinin morfolojik, nrITS, cpDNA *trn*-L karşılaştırmaları baz alınarak yapılan filogenetik analiz ile cinsin taksonomik problemine farklı bir bakış açısı kazandırmıştır. Bu çalışmanın sonuçları ile *Doronicum*'un Senecioneae tribusunda olmasının doğruluğu moleküler verilerle kesinlik kazanmış ve cinsin filogenetik yapısına moleküler verilerle katkı sağlanmıştır.

Cins üzerinde yapılmış çalışmalarda cinsin taksonomik problemi üzerinde sıkça durulmuştur. Anatomik, sitolojik, palinolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar ile taksonomik problemler giderilmeye çalışılmıştır.

Asteraceae familyasına ait birçok cins anatomik olarak incelenmesine rağmen, henüz *Doronicum* için kapsamlı bir anatomik çalışma yapılmamıştır. Bununla birlikte Doğu Karadeniz'de yayılış gösteren *Doronicum* türlerinin anatomik olarak incelenmesiyle cinsin kök, gövde ve yaprak enine kesitleri ile yaprak yüzeysel kesitleri ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Yapılan bu çalışmayla cinsin anatomisinin familyanın genel özellikleri ile uygunluk gösterdiği ve belli seviyelerde türler arası bazı anatomik farkların var olduğu ortaya konulmuştur. Ancak bu veriler henüz yayınlanmamıştır (Umdü, 2005).

*Doronicum* üzerinde yapılan sitolojik çalışmalar da bulunmaktadır. Senecioneae grubu için karakteristik olan temel kromozom sayısı ( $x=30$ ) *Doronicum* cinsi için de kabul görmektedir (Bremer, 1994). Fakat bazı araştırmacılar temel kromozom sayısının  $x=10$  olduğunu ileri sürmektedirler (Ma'jovsky' ve Mury'n,1987). Fakat yapılan kromozom sayımlarında 30'un katları olduğu rapor edilmiştir ve bu durum temel kromozom sayısının  $x=30$  olduğunu fikrini desteklemektedir. Bununla beraber, yapılan birçok çalışmada cinsten poliploidinin yaygın olduğu tahmin edilmektedir (Alvarez, 2003). Ülkemizde ise Doğu Karadeniz'de yayılış gösteren 9 *Doronicum* türü üzerinde yapılan sitolojik bir çalışmada bu taksonlardan 5 tanesinin ilk kez kromozom sayımları yapılmıştır (Umdü, 2005). Yapılan bu çalışmada kromozom sayılarının 42-60 arasında değiştiği rapor edilmiş ve elde edilen bu sonucun önceki verilerle tutarlı olduğu belirtilmiştir.

Cinsin taksonomik sorunlarını çözmeye yönelik başvurulmuş alanlardan biri de palinolojik çalışmalardır. Palinolojik özelliklerden polen yüzey süsleri, apertür sayısı ve şekli, ekzin tabakalanması gibi temel özellikler taksonomik amaçlarla cins içinde

kullanılmıştır (Takhtajan, 1980). Yapılan bir çalışma ile ülkemizde yayılış gösteren bazı *Doronicum* türlerinin belirtilen palinolojik özellikleri ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışmayla, Astereceae familyası için karakteristik olan polen özelliklerinin *Doronicum* için de geçerli olduğu belirtilmiş ve çalışılan *Doronicum* taksonlarının polenlerinin morfolojik olarak birbirine benzer olduğu belirtilmiştir (Umdü, 2005).

Son yıllarda biyokimyasal veriler taksonomik ve filogenetik ilişkilerin tespiti için sıkça kullanılmaya başlanmıştır. *Doronicum* türlerinin kimyasal içeriklerinin incelenmesi ile cinse ait türlerin pirolidzin alkaloidi içerdikleri ortaya konulmuştur (Dharmananda, 2001). *D. helveticum* Miller (*Senecio doronicum*) taksonu pirolidzin alkaloidi içeren tıbbi bitkiler olarak tanınmaktadır (Röder, 1995). *D. macrophyllum* Fisch. (Bolhmann ve Grenz, 1979), *D. pardalianches* (Bolhmann ve Abraham, 1979), *D. hungaricum* Rchb. (Bolhmann vd., 1980) ve *D. grandifolium* Lam. (Reynald ve Raynaud, 1984, 1986; Reynaud vd., 1985) taksonları ile yapılan çalışmalar ile taksonların kimyasal içerikleri ortaya konulmuştur. *Doronicum* taksonlarının kimyasal yapısındaki alkaloidin varlığı Senecioneae tribusunun karakteristik bir özelliği olduğu için cinsin bu tribusa ait olduğunu desteklemektedir (Robins, 1977). *D. oblongifolium* DC. ve *D. austriacum* Jacq. ile yapılan çalışmalarla taksonların taksonomik belirteç olarak kullanılabilecek içerikleri incelenmiştir (Alieva ve Omurkamzinova, 1979; Abyshev vd., 1982). Endemik bir tür olan *D. corsicum* (Loisel.) Poir. üzerinde yapılan çalışmayla türün bazı yağ asidi içerikleri belirlenmiştir (Paolini vd., 2007). Sırbistan'daki *D. austriacum* Jacq. subsp. *giganteum* (Griseb.) Stoj. et Stef. taksonunun temel yağ asidi içeriği tespit edilmiştir (Lazarevic vd., 2009). Ülkemizde ise *D. orientale*, *D. bithynicum* subsp. J.R. Edmondson *sparsipilosum* J.R. Edmondson ve *D. macrolepis* Freyn. & Sint. taksonlarının yaprak, çiçek ve gövdelerinden elde edilen temel yağ asitleri karşılaştırmalı olarak çalışılmış, taksonlar arasındaki farklılıklar ortaya konmuştur (Akpınar vd., 2009).

*Doronicum* cinsine ait bazı türler gösterişli çiçeklere sahip olmasından dolayı süs bitkisi olarak kültüre alınmıştır (Worsley, 1898). Özellikle Avrupa ve Asya'da subalpin kuşakta yayılış gösteren *D. austriacum* süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Novak, 1965).

*Doronicum* türlerinin tıbbi özelliklere sahip olduğu ve bitkilerin çiçek durumunun astım tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Röder, 1995). Ayrıca *D. pardalianches*'e ait rizomların epilepsi tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Pobedimova, 1995).

*Doronicum* türleri, süs bitkisi ve tıbbi özelliklerinin yanı sıra arılar ve böcekler için önemli bir polen ve nektar kaynağıdır. Bu sebeple arıcılık ile uğraşanlara *Doronicum* türlerinin korunması ve yetiştirilmesi tavsiye edilmektedir (Hooper ve Taylor, 2002).

Çalışma konusunu oluşturan *D. orientale*, Doğu Akdeniz bölgesi başta olmak üzere Sicilya'dan Suriye'ye kadar ve Kafkaslarda geniş bir yayılış alanına sahiptir (Alvarez, 2003). Tür, kayalık nemli bölgelerde ve dere kenarlarında 50-2000 m yüksekliğe kadar yayılış göstermektedir. Ülkemizde ise Dış ve Orta Anadolu'da yoğun bir yaşam alanına sahiptir (Edmondson, 1975).

*D. orientale* üzerinde yapılmış farklı birçok çalışma da mevcuttur. Tür ilk olarak 1808 yılında *D. orientale* Hoffm. ve *D. caucasicum* Bieb. olarak farklı iki bitki şeklinde tanımlanmış; fakat Wildenow (1809) tarafından bu durum düzeltilerek *D. orientale* olarak adlandırılmış; *D. caucasicum* ise sinonimi olarak kabul edilmiştir.

*D. orientale* ile yapılan sitolojik çalışmalar da mevcuttur. Türün kromozom sayısı Lindqvist (1950) tarafından kaydedilmiştir. Fakat tür *D. cordatum* Schultz olarak belirtilmiş ve Baksay (1956) tarafından aynı isimle kromozom sayımı yapılmıştır. Strid ve Anderson (1985) tarafından da *D. orientale*'nin kromozom sayıları  $2n=60$  olarak rapor edilmiştir. Umdu (2005) ise yaptığı çalışmada türün kromozom sayısının  $2n=42-60$  olduğunu bulmuş ve araştırma sonucunun elde edilen diğer sonuçlarla benzerlik gösterdiğini belirtmiştir.

Hırvatistan florasında nadir bir tür olarak tanımlanan *D. orientale* 1958 yılında çıkarılan bir kanunla koruma altına alınmıştır. Fakat Tomasevic vd. (1999)'un yaptığı bir çalışmayla *D. orientale*'nin ülke sınırları içerisinde 2 farklı yaşam alanı daha bulunduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışma ile *D. orientale*'nin palinolojik özellikleri de incelenmiştir. Türe ait polen şeklinin sferoidal olduğu belirlenmiş ve en belirgin özelliğinin trikolporat olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada *D. orientale*'nin kolpus sınırlarının profil ve polar düşüşte oldukça belirgin olduğu rapor edilmiştir (Umdu, 2005).

Ülkemizde yapılan bir çalışma ile *D. orientale*, *D. bithynicum* subsp. *sparsipilosum* ve *D. macrolepis* taksonlarının temel yağ asidi içerikleri karşılaştırılarak incelenmiştir. Yapılan bu çalışma ile taksonlara ait çiçek ve gövde-yaprak içerikleri belirlenmiştir. İncelenen kimyasal içerikte her 3 taksonda da ana bileşim maddesinin terpen çeşitleri olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilerde *D. orientale*'nin diğer iki taksona göre kimyasal içeriğinin farklı oranlarda olduğu rapor edilmiştir (Akpınar vd., 2009).

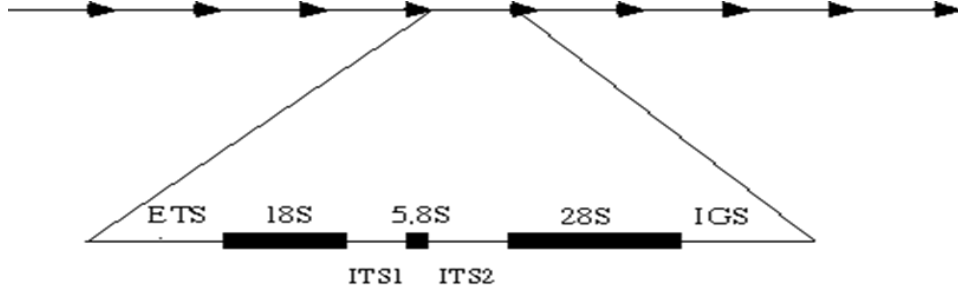
*Doronicum* cinsine ait türlerin doğada hibritlerine de rastlanmıştır. Cinsine ait 8 hibrit türün olduğu belirtilmektedir. Bu hibritlerin yarısının ebeveyn türünün *D. columnae* Ten. ya da *D. orientale* olduğu varsayılmaktadır. Bu iki yakın tür arasındaki hibritleşmenin gerçekleşme olasılığı düşük olsa da yapılan bir çalışmayla doğada bu hibridin varlığına rastlanılmıştır. Peruzzi vd. (2011)'in yaptığı bu çalışmada *D. orientale* ve *D. columnae*'nin hibriti olan *Doronicum*  $\times$  *minutilloii*'nin morfolojik, karyolojik ve moleküler özellikleri (*trnL-trnF* IGS) incelenmiştir. Çalışma sonucunda taksonun morfolojik ve karyolojik özelliklerinin *D. columnae*'ye, moleküler özelliklerinin *D. orientale*'ye ait olduğu belirlenmiştir.

Yukarıda özetlenen çalışmaların dışında *D. orientale* üzerinde gerçekleştirilen diğer çalışmalar bitkinin yerel kullanımları ile ilgilidir. Türün taze köklerinin İzmir ve çevre bölgelerde kısırlığa karşı kullanıldığı rapor edilmiştir (Baytop, 1999).

### 1.3. Moleküler Sistematik

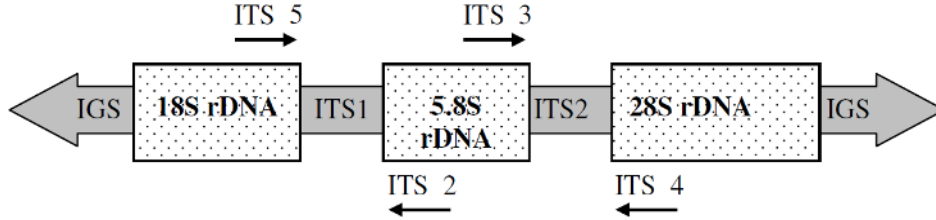
Günümüzde bitki türlerinin tanımlanması, tür içi ve türler arası varyasyonların ortaya konulabilmesi için moleküler tekniklerden ve verilerden sıkça yararlanılmaktadır. Moleküler biyolojideki son gelişmeler, türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesiyle bitki türlerinin tanımlanmasına imkân vermektedir. Buna yönelik olarak, nrDNA'nın ITS bölgeleri, moleküler bitki sistematigi çalışmalarında sıklıkla incelenen genomik veriler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu ITS bölgelerinin cins ve tür içi seviyelerde ileri derecede korunmuş olan nrDNA gen bölgeleri arasında yer aldığı ortaya konmuştur (Baldwin vd., 1995).

Genomik DNA üzerindeki nrDNA bölgeleri, çoklu kopyalar ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklinde bulunur. Şekil 1'de, bu bölgelerin genel yapısı ve genomik DNA üzerindeki yerleşimleri görülmektedir.



Şekil 1. ITS bölgelerinin genomik DNA üzerindeki yerleşimi

nrDNA tekrarları; genomik DNA'nın NOR (Nükleolar Organizer Region) bölgelerinde yerleşmiştir. 18S (küçük alt birim), 5,8S ve 28S (büyük alt birim) alt birimlerinden oluşur. Bu bölgeler, nrDNA'nın diğer alt birimleri ile birlikte transkribe edilmektedir (Baldwin vd., 1995). Bu ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak PCR çalışmalarıyla kolayca elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS (ITS2, ITS3, ITS4 ve ITS5) primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma yerleri Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. ITS primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma yerleri

Ökaryotik organizmalarda 5,8S gen bölgesi, çoğunlukla ITS bölgeleri ile birlikte değerlendirilir. Bütün bölgenin toplam uzunluğu yaklaşık 700 bp kadardır. Bu bölgelerin korunmuş nrDNA gen bölgelerine göre daha fazla değişkenlik gösterdiği kanıtlanmıştır.

ITS1 ve ITS2 bölgelerinin filogenetik açıdan sundukları veriler farklı düzeydedir. Bu bölgelere dayalı analizlerde ITS1 verileri, daha fazla filogenetik çözümler sunmaktadır ve nükleotid içeriği ITS2'ye göre % 29 daha değişkendir. Bu bölgeler, rDNA'nın olgun 18S, 5,8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görev almaktadır (Baldwin vd., 1995).

ITS1 ve ITS2 bölgelerinin, yakın akraba olan taksonların karşılaştırılmasındaki kullanışlılığı nedeniyle, 1990'lı yıllarda hızlı bir şekilde çalışılmaya başlanmıştır. Mevcut veriler, ITS baz dizilerinin, Angiosperm'lerde değişik seviyelerde filogenetik açıdan

kullanışlı olduğunu göstermektedir. Bu veriler, genetik sürüklenmelere yönelik etkili sinyaller ortaya koymaktadır (Baldwin vd.,1992).

Bazı bitki gruplarında ITS1 ve ITS2’de yüksek oranda varyasyonla karşılaşılırken, bazılarında ise, nükleotit varyasyonunun küçük bir dizisine rastlanılmaktadır. Toplam DNA değerlendirmelerinde; çoğu gruplarda ITS dizinlerinin, cpDNA baz dizinlerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu sonucuna varılmıştır (Baldwin vd., 1999).

Günümüzde bitki sistematğinde kullanılan bir diğer moleküler teknik ise RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemidir. Bu teknik 9-10 baz uzunluğunda bir primer yardımı ile başlatılan genomik bir kalıbın analizine dayalı bir Polimeraz Zincir Reaksiyonudur. RAPD tekniği sadeliği, kullanışlı olması ve getirdiği pek çok avantaj nedeniyle büyük ilgi görmüş ve çok sayıda araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Yöntem polimorfizm sayısının sınırsızlığı nedeni ile çok sayıda karakterin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Arif vd., 2010).

RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir (Williams vd., 1990). Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotit primer seti kullanılabilir ve bu oligonükleotit özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadır (Welsh vd.,1990). Bir primerle, farklı bitkilerin genomik DNA’ları farklı olacağından, oluşacak RAPD belirteçler farklı olacaktır. Bu farklılık organizmaların karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır (Williams vd., 1990). Bu açıdan yakın türleri ayırmada oldukça duyarlıdır. Genomlar arasında RAPD belirteçlerinin farklılığının nedenleri, primer bağlanma bölgesini değiştiren tek baz değişiklikleri ya da inversiyonlar/delesyonlar olabileceği gibi, amplifikasyona imkan vermeyecek şekilde primer bağlanma bölgelerini ayıran genomik dizilerde meydana gelen inversiyonlar da olabilmektedir (Parmaksız, 2004).

RAPD belirteçleri; genetik haritaların yapımında (Martin vd., 1991), popülasyon yapısının genetik analizi ve soyağaçlarının oluşturulmasında (Dweikat vd., 1993), filogenetiğin tahmininde (Halward vd., 1992) ve popülasyon dinamiğinin çalışılması (Fritsch ve Rieseberg, 1992) gibi farklı alanlarda sıkça kullanılmaktadır.

Popülasyon çalışmaları fertlerin benzerlik ve farklılıklarının kaynaklandığı durumları belirlemede oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra popülasyon içi ve popülasyonlar arası varyasyonların sebepleri araştırılarak adaptasyon ve türleşme gibi durumlar açıklığa

kavuşturulmaya çalışılır. Bireylere ait genotipler bulundukları yere ve şartlara göre zamanla belirginleşirler. Genetik yapı mutasyon, göçler ve genetik sürüklenme gibi mekanizmaların da bir sonucudur. Ekolojik faktörler üremeyi ve yayılmayı etkileyerek genom üzerindeki değişikliklerde farklı şekillerde rol oynamaktadır (Eriksson, 1993). Özellikle üreme genetik yapıyı düzenleyen ve gelecek kuşaklara aktaran en önemli unsurdur. Böylece popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik yapı bu şekilde belirginleşir (Barret ve Kohn, 1991; Loveless ve Hamrick, 1984).

Hindistan'da yapılan bir çalışmayla endemik bir tür olan *Commiphora wightii* (Arn.) Bhandari 'nin farklı popülasyonları arasındaki nrDNA ITS bölgeleri karşılaştırılarak farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen verilere göre türün farklı popülasyonları arasındaki ITS bölgelerinin farklılığı türün habitat kaybından ve apomiktik özellik kazanmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Haque vd., 2009).

Yapılan başka bir çalışmada ise, *Panax assamicus* Ban. türünün 3 farklı coğrafik bölgeden toplanan 20 popülasyonunun ITS bölgeleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. antropolojik etkilerden kaynaklanan coğrafik sınıflandırma nedeniyle türün popülasyonları arasındaki farklılığın meydana geldiği belirtilmiştir (Pandey ve Ali, 2012).

Genler arasındaki coğrafik varyasyon farklılıkları çoğu kez farklı yerlerde yaşayan popülasyonlar arasında oluşur. Coğrafik varyasyon, seçici baskıların farklılıkları ya da genetik sürüklenme nedeniyle olabilir. Birçok türde popülasyonlar arasındaki farklılığın sebebi gen akışı frekansı, döllenme sistemi, polinatör, ekolojik ve iklimsel faktörlerle açıklanmıştır (Dittbrenner vd., 2005).

Yapılan bir çalışmada *Lathyrus sativus* L.'un 5 farklı popülasyonu arasındaki RAPD varyasyonu araştırılmıştır. Her popülasyon için seçilen 10 birey üzerinden 5 farklı primer denenmiş ve 73 polimorfik bant elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler popülasyonlar arasındaki genetik farklılığın varlığını belirterek bu durumun coğrafik uzaklıktan kaynaklandığını ortaya koymuştur (Nosrati vd., 2012).

*Bellis perennis* L.'nin 4 farklı popülasyonu üzerinde polen ve RAPD analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 40 RAPD primerinden 12'si polimorfik bulunmuş ve polimorfizmin %45-79 arasında değiştiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda farklı ekolojik şartlara sahip 4 farklı popülasyon arasındaki varyasyonun önemli derecede olduğu belirtilmiştir (Kalaycıoğlu vd., 2010).

Şekil 3. *D. orientale*'nin Türkiye'deki yayılışı

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyalin Temini ve Saklanması

Çalışmada kullanılan bitki materyali, 2004-2012 yılları arasında Haziran-Temmuz ayları arasında yayılış gösterdikleri alanlardan toplanmıştır. Toplanan örnekler 13 farklı şehre ait 19 farklı alandan temin edilmiştir. Ayrıca araştırmada önceden toplanan ve herbaryum örneği haline getirilen örneklerde kullanılmıştır. Toplanan örneklerde, olgun bir bitkiye ait kısımlarının bulunmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca örnekler toplanırken, değişebilecek fakat teşhis için önemli olan özellikler ayrıca kaydedilmiştir. Numaralandırılmış örnekler laboratuvarında presler içerisinde sıkıştırılarak kurutulmuş ve herbaryum örneği haline getirilmiştir. Herbaryum örneği halindeki örnekler, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda (KTUB) saklanmaktadır. Arazi çalışması sırasında toplanan her örneğe numara verilmiş ve o örnek ile ilgili toplama bilgileri kaydedilmiştir. Araştırmada kullanılan tüm bitki materyallerinin toplama bilgileri Tablo 1'de, ve toplanan bölgeler Şekil 4'te verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *D. orientale* örneklerine ait toplama bilgileri

| Popülasyon No | Toplama Bilgileri                                             |
|---------------|---------------------------------------------------------------|
| Do1           | A7 Trabzon: Araklı, Yalıbozu , Anayol Kenarı, 5 m, 2011.      |
| Do2           | A7 Trabzon: Esiroğlu, Gayretli Köyü, 211 m, 2011.             |
| Do3           | A7 Gümüşhane: Artabel, Limni Gölü, Altınpınar, 1600 m, 2009.  |
| Do4           | A4 Kastamonu: Şenpazar, 959 m, 2004.                          |
| Do5           | A4 Kastamonu: Azdavay, 872 m, 2004.                           |
| Do6           | A2 Muğla: Yılanlı Dağına Çıkış, 1253 m, 2012.                 |
| Do7           | B1 Manisa: Spil Dağı, 703 m, 2011.                            |
| Do8           | B3 Eskişehir: Çatacık, Sarıçam Ormanı, 1350 m, 2011.          |
| Do9           | A4 Karabük: Safranbolu, Mencilis Mağarası, 720 m, 2012.       |
| Do10          | A2 (E) İstanbul: Belgrad Ormanı, 150 m, 2012.                 |
| Do11          | A7 Gümüşhane: Şiran, Kırıntı Yaylası, 2560 m, 2012.           |
| Do12          | A7 Gümüşhane: Şiran, Kırıntı Yaylası, 2670 m, 2012.           |
| Do14          | A7 Gümüşhane: Köse Dağı, 1785 m, 2008.                        |
| Do15          | C3 Denizli: Honaz Dağı, 1446 m, 2010.                         |
| Do16          | A5 Sinop: Gerze- Sinop arası, Lala Köyü Üstleri, 187 m, 2012. |
| Do17          | C5-Adana, Pozantı, 1538 m, 2012.                              |
| Do18          | B1 Balıkesir: Kazdağı, Zeytinlikten Çıkış, 539 m, 2012.       |
| Do19          | B1 Balıkesir: Kaz Dağları Milli Parkı, 1168 m, 2012.          |
| Do20          | A1 İzmir: Kemalpaşa, Nif Dağı Çıkışı, 909 m, 2012.            |





Şekil 5. *D. orientale* Hoffm. a-Genel görünüş, b-Herbaryum örneği, c-Kapitulum

### 2.3. Moleküler Çalışmalar

#### 2.3.1. DNA İzolasyonu

Arazi çalışmaları sırasında toplanarak numaralandırılmış her örnekten DNA izolasyonunda kullanılmak üzere sağlıklı taze yapraklar seçilmiş ve silika jel içerisinde saklanmıştır. Araştırmada kullanılan bitkilerin DNA'sı silika jelde kurutulmuş taze yapraklardan elde edilmiştir. DNA izolasyonunda Doyle ve Doyle (1987) ve Gültepe vd. (2010) metodundan faydalanılmıştır.

Bu yöntem doğrultusunda kurutulan yapraklardan her bir örnek için 0,025 g tartılarak tek kullanımlık jilet yardımıyla tek kullanımlık alüminyum folyo üzerinde doğranarak toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilmiş numuneler bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine önceden hazırlanmış CTAB tamponundan 500 µl [20 µl EDTA, 50 µl Tris, 140 µl NaCl, 100 µl CTAB, 190 µl H<sub>2</sub>O] eklenmiştir. Bu haldeki ekstrakta her bir örnek için 0,02 g PVPP (Poli Vinil Polipro Podilen) ve 2,5 µl β-merkapto etanol ilave edilmiştir. Karışım bir pipet yardımıyla homojen hale getirildikten sonra 65°C'de 4 saat bekletilmiştir. Bu süre içerisinde tüpler içindeki karışımın homojen olarak kalmasını sağlamak ve çözünmeyi

kolaylaştırmak için zaman zaman alt üst edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alınarak 1 dk soğumaya bırakılmıştır. Bütün örnekler oda sıcaklığında 10.000-14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilmiş örnekler üzerine 500 µl kloroform eklendikten sonra tüpler homojen olana kadar alt üst edilmiştir. Ardından aynı hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant kısım alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerine yeniden 500 µl kloroform eklendikten sonra tüpler 3-5 kez alt üst edilmiş ve aynı hızda 5 dk daha santrifüj edilmiştir. Santrifüj ardından süpernatant kısım alınarak bir önceki aşama aynen tekrarlanmış, daha sonra üst faz alınarak yeni bir ependorfa transfer edilmiştir. Tüplerden hacmi en fazla olanın kapasitesi belirlenmiş ve bu hacim baz alınarak diğer tüplere eşit oranda hacimlerinin % 8'i kadar her tüpe 7,5 M'lık amonyum asetat ilave edilmiştir. Tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra oluşan son hacmin % 54'ü kadar izopropanol ilave edilmiş ve süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra +4°C' de en az 4 saat bekletilmiştir (yapılan çalışmalarda en iyi sonuç bir gece (18-24 saat arası) bekletildiğinde elde edilmiştir). Örnekler +4°C' de bir gece bekletildikten sonra 3 dk önceki hızda (10.000-14.000 rpm) santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım atıldıktan sonra, şeffaf pellet üzerine 1ml %70'lik etanol ilave edilmiştir, şeffaf pellet hareket edene kadar tüpler alt üst edilmiş. Alkol ilave edilmiş tüpler 3 dk önceki hızda santrifüj edilip, süpernatant dökülür sonra tüm alkolün uzaklaştırılması için tüpler kapakları açık şekilde 15 dk 37°C'de (ya da oda sıcaklığında 30-45 dk) kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra tüplerde bulunan DNA pelleti, 50 µl TE [10 mM Tris HCL, pH: 8,3, EDTA 1 mM, pH:8,0] ile çözülmüştür. Pelletin tamamen çözülmesi için örnekler, 15 dk 65°C' de su banyosunda tutulmuştur.

### **2.3.1.1. Agaroz Jel Elektroforezinde Genomik DNA Tespiti**

Örneklerden DNA izole edilip edilmediğinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen DNA' nın kontrolü, 7 µl izole edildiği farz edilen DNA' ya 5 µl yükleme tamponu (%50 gliserol, %0,05 bromofenolblue, 0,2 M EDTA) eklenerek agaroz jel ortamında yapılmıştır. On beş hücreli jel tepsisi kullanılarak, %1'lik agarozda, 1X TAE (Trizma Base, Glasial Asetik Asid, EDTA) tamponunda 15 dk süre ile 80 voltta yürütülen örnekler, 0,25 µg/ml Etidyum Bromür ile boyanmış ve UV ışığı altında görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. DNA'lar agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra, + 4°C'de daha sonra kullanılmak üzere stoklanmıştır.

### 2.3.2. Çalışılan Bölgelerin PCR ile Çoğaltılması

Stoklanmış DNA örneklerinden nrDNA ITS bölgeleri, evrensel ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Çoğaltmada kullanılan evrensel primerlerin baz dizinleri ITS4 için 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ve ITS5 için 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG G-3' şeklindedir. Çoğaltma işlemi aşağıdaki işlem sırası takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Çift zincirli DNA üzerinde bu bölgelerin çoğaltılma işlemi 200 µl' lik tüplerde; 10X'lik reaksiyon tamponundan 10 µl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>'den 3,5 µl, 0,25 mM dNTP'den 5'er µl (toplamda 20 µl), 50 ng/µl her bir primerden 1 µl, 0,25 µl Taq DNA polimeraz (Promega) ve yaklaşık olarak 50–100 ng kalıp DNA'dan 2 µl içeren karışım distile su ile 50 µl son hacme tamamlanarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan PCR denemeleri sonucunda belirlenen en uygun çoğaltılma şartları belirlenmiş ve 33 döngüde gerçekleştirilmiştir. Bu döngü sırasıyla; 95 °C'de 1 dk DNA çift zincirinin ayrılması (ön denatürasyon), 94 °C'de 1 dk DNA çift zincirinin ayrılması (DNA denatürasyonu), 56 °C'de 30 sn primerlerin bağlanması (annealing), 72 °C'de 40 sn DNA sentezi (extension) 33 döngü ve 72 °C'de 5 dk son uzatma (final extension) şeklinde düzenlenmiş ve PCR uygulamaları Biometra Personal Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir.

### 2.3.3. Agaroz Jel Elektrofrezinde PCR Ürünü Kontrolü

PCR ürünü varlığı agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir. PCR ürünlerinin kontrolü genomik DNA kontrolünden farklı olarak doğrudan agaroz jel ortamında gerçekleştirilmiştir. On beş hücreli jel tepsisi kullanılarak, % 1'lik agarozda, 1X TAE (Trizma Base, Glasial Asetik Asid, EDTA) tamponunda 30-45 dk süre ile 80 voltta yürütülen örnekler, 0,25 µg/ml Etidyum Bromür ile boyanmış ve UV ışığı altında jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

### 2.3.4. Baz Dizin Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

PCR ürünlerinin sekans analizleri Macrogen firmasına (Kore) yaptırılmıştır. Bu okumaların ilk aşamasını PCR ürünlerin saflaştırılması oluşturmaktadır. Saflaştırmadan

sonra PCR ürünleri ITS1 ve ITS2 bölgelerinin dizinleri ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 2.3.5. Veri Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

Macroinden elde edilen ITS1 ve ITS2 bölgeleri nükleotit dizileri önce Bioedit v.7.0 (Hall,1999) programı vasıtasıyla hizalanmıştır. Daha sonra filogenetik analizler Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 4.0.2) programı (Tamura vd., 2007) ile gerçekleştirildi.

### 2.3.6. RAPD

RAPD için daha önce izole edilen ve stoklanmış DNA'lar kullanılmıştır. Sıcaklık 95°C'a yükseltilerek DNA denatüre edildi. DNA çoğaltımında, genomik DNA'nın belli bölgelerine homolog olan primer dizileri (tek iplikli diziler) DNA sentezini başlatmak için kullanılır. Yüksek sıcaklıkta aktif olan *Taq* polimeraz enzimi DNA bölgesi çoğaltılır. PCR sonucu amplifikasyon ürünleri, etidium-bromür ilave edilmiş jelde yürütülerek, DNA fragmentlerinin UV altında fotoğrafları çekildi. Diğer PCR uygulamalarının aksine, RAPD yönteminde genomik bölgelerin amplifikasyonu için tek primer kullanıldı. RAPD özellikle akraba organizmalar arasındaki DNA dizi farklılığının ortaya çıkarılmasında yaygın şekilde kullanılmakta ve elde edilen nükleotit farklılıkları RAPD belirteçleri olarak isimlendirilmektedir (Salkın, 2005).

Çalışmalar sonucunda en iyi sonuç veren RAPD-PCR reaksiyon bileşenleri; genomik DNA (5 ng/μl) 3 μl, primer (10 μM) 4 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 5 μl, dNTP mix (10 mM ) 25 μl, Taq DNA Polimeraz (Promega) 0,25 μl, *Taq* Polimeraz tamponu: 10 μl, ddH<sub>2</sub>O: 2,75 μl şeklinde reaksiyonun toplam hacmi 50 μl olmak üzere karışım hazırlanır. Çalışmada kullanılan RAPD primerlerinin baz dizilimi ise Tablo 2'deki gibidir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan RAPD primerleri

| Primerin Adı | Primerin Baz Dizilimi (5' →3') |
|--------------|--------------------------------|
| OPA7         | GAAACGGGTG                     |
| OPA8         | GTGACGTAGG                     |
| OPA19        | CAAACGTCGG                     |

Yapılan PCR denemeleri sonucunda belirlenen en uygun çoğaltılma şartları 45 döngüde gerçekleştirilmiştir. Bu döngü kapsamında 95°C'de 2 dk DNA çift zincirinin ayrılması (ön denatürasyon), 94°C'de 1 dk DNA çift zincirinin ayrılması (DNA denatürasyonu), 29°C'de 1 dk primerlerin bağlanması (annealing), 72°C'de 2 dk DNA sentezi (extension) 45 döngü ve 72°C'de 5 dk son uzatma (final extension) şeklinde düzenlenmiş ve PCR uygulamaları Biometra Personal Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR uygulamasından sonra örnekler % 1,5'lik agoroz jelde yaklaşık 2,5 saat yürütülerek UV transuliminatör cihazında görüntülenmiş ve bant analizleri gerçekleştirilmiştir.

Oluşan tüm bantlar göz önüne alınarak RAPD-PCR ürünlerinin var (1) ya da yok (0) şeklinde veri matrisi oluşturulmuş, benzerlik matrisi UPGMA ile analiz edilerek dendogramlar oluşturulmuştur. UPGMA analizi Syn-Tax programı kullanılarak gerçekleştirildi (Podani, 1993). Çalışılan 3 primer bu şekilde değerlendirilip, dendogramları çizilmiştir.

### 3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 19 *D. orientale* popülasyonuna ait genomik DNA izolasyonu daha önceki bölümde bahsedildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk bölümünü nrDNA ITS bölgesinin elde edilmesi ve analizi oluşturmaktadır. Her örneğe ait genomik DNA üzerinden çoğaltılarak ITS bölgesinin tamamı (ITS1, 5,8S rRNA ve ITS2) elde edilmiştir. Elde edilen ITS bölgelerinin DNA baz sıraları BioEdit programı kullanılarak hizalanmış ITS1, ITS2 ve 5,8S bölgeleri belirlenmiş ve örnekler arasındaki baz farklılıkları tespit edilmiştir. Her bir örnek popülasyona ait ITS1 ve ITS2 bölgelerinin baz sırası Ek (1-19) kısmında verilmiştir. ITS bölgesinin tamamına ait baz dizileri elde edildikten sonra bu diziler bilgisayar yardımıyla analiz edilerek ITS1, 5,8S rRNA ve ITS2 bölgeleri birbirlerinden ayırt edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonrasında incelenen popülasyonların nrDNA ITS bölgesinin baz dizinlerinin uzunluğunun 703-711 bp arasında, ITS1 uzunluğu 209-211 bp arasında iken ITS2 uzunluğu 257-258 bp arasındadır. 5,8S bölgesinin ise, 164 bp olduğu tespit edilmiştir. Bütün ITS dizinindeki %GC içeriğinin 53,2-53,6 arasında değiştiği bulunmuştur. ITS1 bölgesinin % GC içeriği, 53,1-53,6 arasında değişirken, ITS2 bölgesinin %GC içeriğinin ise 51,8-52,7 arasında olduğu bulunmuştur. Pürin/Pirimidin oranı ITS1 bölgesi için 0,990-0,925 iken ITS2 bölgesi için ise bu oran 1,048-1,039 arasındadır. İncelenen tüm popülasyonlara ait baz dizin analizleri MEGA 4 programı kullanılarak UPGMA ile analiz edilmiştir. UPGMA analizinden elde edilen ağaç topolojileri, Şekil 6'da verilmiştir. UPGMA ile ağaç topolojileri oluşturulurken dış grup olarak *Doronicum* cinsine ait ülkemizde yayılış gösteren *D. cacaliifolium* Boiss. et Heldr., *D. haussknechtii* Cavill., *D. macrophyllum* J. R. Edmondson subsp. *sparsipilosum* J. R. Edmondson, *D. maximum* Boiss. et Huet., *D. reticulatum* Boiss. ve Yunanistan'da yayılış gösteren *D. orientale* örneği kullanılmıştır. Bu taksonlara ait bilgiler GenBank'tan temin edilmiştir (URL1). Çalışılan popülasyonlara ait hizalanmış sekans analizlerinde 8 varyasyon bölgesi belirlenmiş ve Tablo3'te verilmiştir.

5,8S bölgesi dışındaki ITS1 ve ITS2 dizin analizleri kullanılarak yapılan UPGMA analizi sonucu incelenen 19 popülasyon örneğinin oluşturduğu gruplar Şekil 6'daki gibidir.



Tablo 3. ITS nükleotit dizisindeki (5,8S hariç) varyasyon bölgeleri

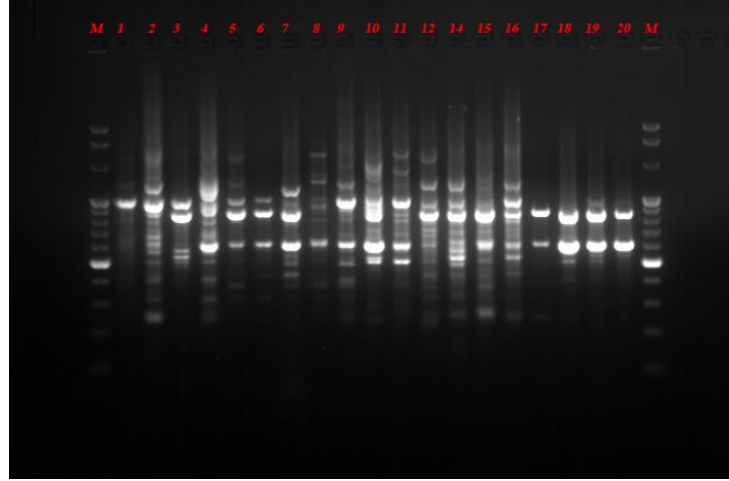
| ITS1, ITS2 (468 bp ) |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pop. No.             | 169 | 229 | 252 | 255 | 241 | 364 | 425 | 426 |
| Do1                  | C   | C   | A   | A   | C   | C   | -   | T   |
| Do2                  | .   | .   | G   | .   | .   | .   | T   | G   |
| Do3                  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | G   | .   |
| Do4                  | A   | .   | .   | G   | G   | .   | T   | G   |
| Do5                  | A   | .   | .   | G   | G   | T   | T   | G   |
| Do6                  | .   | .   | .   | .   | .   | .   | T   | G   |
| Do7                  | .   | .   | .   | .   | G   | .   | .   | .   |
| Do8                  | .   | .   | .   | G   | .   | .   | T   | G   |
| Do9                  | A   | .   | .   | G   | .   | .   | T   | G   |
| Do10                 | .   | .   | .   | .   | .   | .   | T   | G   |
| Do11                 | .   | .   | .   | .   | .   | .   | T   | G   |
| Do12                 | .   | .   | .   | .   | .   | .   | G   | .   |
| Do14                 | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   | .   |
| Do15                 | A   | A   | .   | G   | G   | T   | T   | G   |
| Do16                 | .   | .   | .   | G   | .   | .   | T   | G   |
| Do17                 | A   | .   | .   | G   | .   | .   | T   | G   |
| Do18                 | A   | .   | .   | G   | .   | .   | T   | G   |
| Do19                 | A   | .   | .   | .   | .   | .   | T   | G   |
| Do20                 | A   | A   | .   | G   | .   | .   | T   | G   |

Çalışmanın ikinci bölümünü, incelenen popülasyonlara ait DNA örneklerinin başarılı şekilde çalıştırabilen üç farklı RAPD primerinden elde edilen bant profillerinin değerlendirilmesi oluşturmaktadır. RAPD primerleri ve bunlara ait elde edilen bazı bilgiler Tablo 4’te verilmiştir.

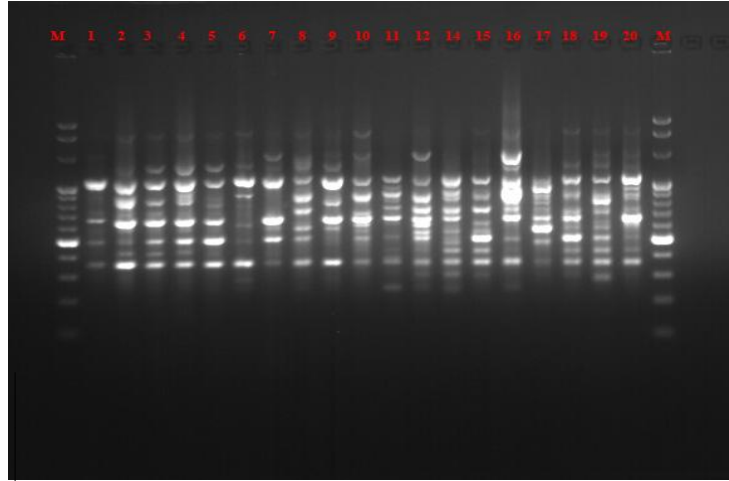
Tablo 4. Çalışmada kullanılan RAPD primerlerine ait bilgiler

| Primer | Primer Sekansı  | Tm (°C) | GC (%) | Sayılabilen Bant Sayısı | Polimorfik Bant Sayısı | Polimorfik bant oranı (%) |
|--------|-----------------|---------|--------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| OPA 7  | 5’GAAACGGGTG 3’ | 28.9    | 60     | 7                       | 7                      | 100                       |
| OPA 8  | 5’GTGACGTAGG 3’ | 28.9    | 60     | 8                       | 8                      | 100                       |
| OPA 19 | 5’CAAACGTCGG 3’ | 34.2    | 60     | 8                       | 6                      | 75                        |

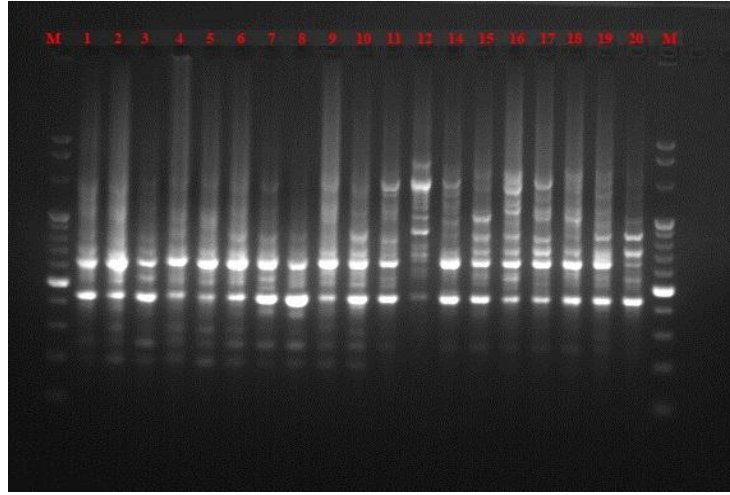
Çalıştırılabilen üç farklı primer büyüklükleri 350-2000 bp arasında değişen toplam 23 bant üretmiştir. Bu bantların 21 polimorftir. OPA8 ve OPA19 primerleri 8 bant oluştururken (Şekil 8-9), OPA7 primeri ise 7 (Şekil 7) bant oluşturmıştır.



Şekil 7. OPA 7 RAPD primeri ile elde edilen bant profili

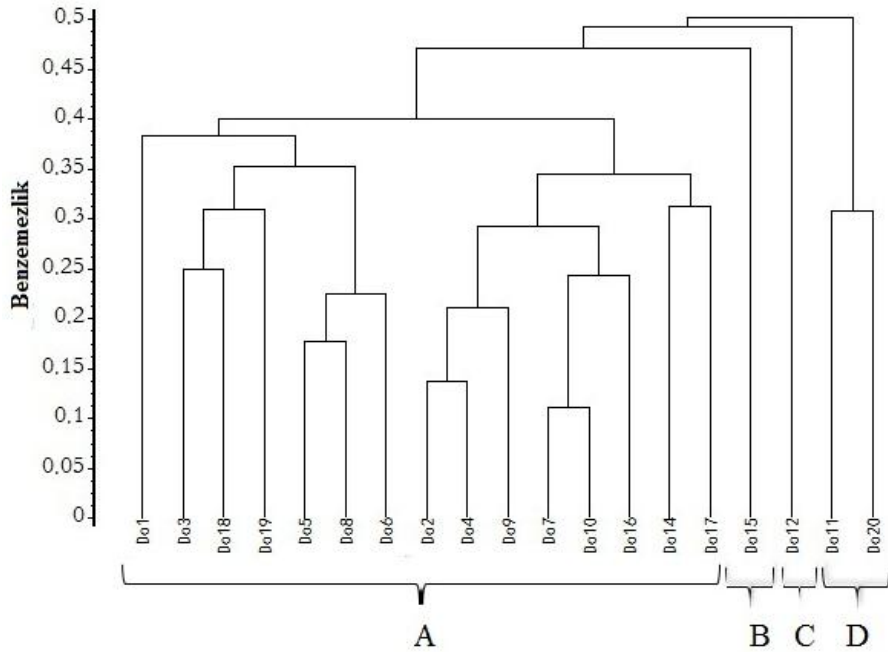


Şekil 8. OPA8 RAPD primeri ile elde edilen bant profili



Şekil 9. OPA19 RAPD primeri ile elde edilen bant profili

RAPD primerleri kullanılarak elde edilen bantların dağılımları esas alınarak incelenen 19 popülasyona ait örnekler kümeleme analizlerinden Syn-Tax programı kullanılmıştır ve UPGMA analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen dendrogram Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Çalışılan 19 popülasyonun RAPD verilerine göre elde edilen dendrogram

Dendograma göre 19 popölasyona ait RAPD verileri %80 benzemezlik oranıyla 4 grup altında toplanmıştır. Do1, Do2 (Trabzon), Do3, Do14 (Gümüşhane), Do18, Do19 (Balıkesir), Do4, Do5 (Kastamonu), Do8 (Eskişehir) ve Do6 (Muğla), Do9 (Karabük), Do7 (Manisa), Do10 (İstanbul), Do16 (Sinop), Do17(Adana) A grubunu oluşturmuştur. Do15 (Denizli) B grubunu ve Do12 (Gümüşhane) C grubunu oluştururken Do11 (Gümüşhane) ve Do20 (İzmir) D grubunda yer almıştır. A grubundaki örnekler kendi içinde 2 dala ayrılarak küçük gruplar oluşturmuşlardır. Do1, Do3, Do18, Do19 ve Do6 bir grup oluştururken, Do2, Do4, Do9, Do7, Do10, Do16, Do14 ve Do17 diğeri bir grubu oluşturmuştur. Oluşan tüm gruplar arasında Do12 (Gümüşhane) örneği %98 ve Do15 (Denizli) örneği %94 benzemezlik oranıyla diğeri gruplardan ayrılmıştır.

#### 4. TARTIŞMA

*Doronicum* (Asteraceae) cinsi Asya'dan, Avrupa ve Afrika'ya kadar geniş bir alanda yayılış göstermektedir. Cinse ait tür sayısı az olmasına rağmen geniş yayılış göstermesi, farklı ekolojik koşullara uyum yeteneklerinin yüksek olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bugünkü verilere göre *Doronicum* cinsi dünyada yaklaşık olarak 26 tür ile temsil edilmekte ve bunların önemli bir kısmı ülkemizde de yayılış göstermektedir (Alvarez, 2000). Ülkemizde yayılış gösteren takson sayısı 14'tür. Bu durum cinsin önemli yayılış alanlarından birinin ülkemiz olduğunu göstermektedir. *Doronicum* cinsine ait en geniş yayılış alanına sahip ve çalışmamıza konu olan türlerden birisi de *D. orientale*'dir. Bu tür Doğu Anadolu haricinde çok geniş bir yayılış alanına sahiptir ve birçok popülasyon ile ülkemizde temsil edilmektedir (Edmondson, 1975).

Bu çalışma ile ülkemizde geniş yayılış alanına sahip olan *D. orientale*'nin 19 farklı popülasyona ait bireyler moleküler yönden incelenmiştir. Seçilen popülasyonlar ülkemizin farklı fitocoğrafik bölgelerini temsil edecek özelliklere sahip alanlardan toplanmıştır. Çalışma iki ana kısımda planlanmıştır. Çalışmanın birinci kısmında popülasyonlar arasındaki varyasyonun ortaya konulabilmesi için toplanan tüm popülasyonlara ait bireylerin nrDNA ITS bölgeleri çoğaltılmış ve değerlendirilmiştir. Bu kapsamda öncelikli olarak incelenen tüm popülasyonların ITS1 ve ITS2 bölgelerinin toplam nükleotit uzunlukları, % GC içeriği ve Pürin/Pirimidin oranları ortaya konulmuştur. ITS1 ve ITS2 bölgelerinin değerlendirilmesi ile elde edilen veri matrisine göre popülasyonlar arasındaki varyasyon bölgesinin 8 olduğu tespit edilmiştir. Yunanistan orijinli *D. orientale* popülasyonuna ait birey incelemeye dahil edildiğinde tüm popülasyonlar arası toplam varyasyon bölgesinin 9'a çıktığı tespit edilmiştir.

ITS bölgelerinin baz dizinlerine dayanılarak oluşturulan UPGMA ağaç topolojileri incelenen tüm popülasyonların %99,6-%100 arasında bir benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Şekil 6'daki bu ağaç incelendiğinde, nrDNA ITS bölgeleri bakımından incelenen ülkemiz popülasyonlarının %99 bootstrap değeri ile Yunanistan popülasyonundan ayrılarak tek bir grup oluşturduğu görülmüştür. Bununla birlikte ülkemiz popülasyonları da kendi içerisinde iki alt gruba ayrılmışlardır.

Grup (A)'da yer alan popülasyonlar da kendi içinde daha küçük gruplara ayrılmaktadırlar. Ancak oluşan bu alt gruplarda ülkemiz fitocoğrafik bölgelerine uyumlu

bir ayırım tespit edilememiştir. Bununla birlikte Trabzon (Do1) ve Gümüşhane (Do3,Do12, Do14) örneklerinin bir arada yer alması incelenen popülasyonlardan Avrupa-Sibirya bölgesi örneklerinin birbirine en fazla benzeyen popülasyonlar olduğunu göstermektedir.

Grup (B), grup (A) gibi daha alt gruplara ayrılmakla beraber burada da ne fitocoğrafik bölgeler ne de coğrafik uzaklık açısından popülasyonlar arasında bir ilişki kurulamamıştır. Bu durumun incelenen örneklerin yayılış gösterdiği yaşam alanlarının (habitatların) birbirine oldukça benzer olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde hem grup (A) hem de grup (B)'de yer alan tüm popülasyonlar arasında ne fitocoğrafik ne de coğrafik yakınlık açısından net bir ilişki ortaya konulamamıştır. Bu durum incelenen *D. orientale* türünün genetik olarak oldukça kararlı olması veya popülasyonlar arası varyasyonu ortaya koyabilecek yeterli sayıda örneğin olmamasından kaynaklanabilir. Popülasyonlara ait genotiplerin bulundukları yere ve şartlara göre zamanla değişebildiği bilinmektedir (Loveless ve Hamrick, 1984). Bu durum, genetik yapının mutasyon, göçler ve genetik sürüklenme gibi mekanizmalardan herhangi biri veya tümünün etkisiyle oluşabilir. Özellikle ekolojik faktörler üreme periyodunu etkileyerek popülasyonlar arası gen akışını değiştirir ve zaman içinde popülasyonlarda izolasyonlara sebep olabilir. Bu izolasyonlarda özellikle üreme işlevi genetik yapıyı düzenleyen ve gelecek kuşaklara aktaran en önemli unsurdur. Böylece popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik yapı zaman içinde değişebilir (Loveless ve Hamrick, 1984). Görüldüğü gibi *D. orientale*'ye ait 19 farklı popülasyon çeşitli benzerlik ve farklılıklar barındırmaktadır. Ancak bu farklılıklar oldukça sınırlı düzeyde kalmıştır. Coğrafik uzaklık ve genetik yapı arasında olumlu bir ilişkinin olmaması, gen akışının bir sonucudur (Dittbrenner vd., 2005). Bu durum taksonun eşeyli üreme mekanizmasına bağlanabileceği gibi benzer habitatlarda yaşayan popülasyonlarda ekolojik koşullar sebebiyle değişimin az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak çalışmamızda dış grup olarak kullanılan Yunanistan örneğinin farklı bir gruba ayrılıp, ülkemiz popülasyonlarına göre daha fazla varyasyon içermesi, coğrafik uzaklık ve ekolojik koşullara bağlı olarak açıklanabilir.

Farklı bölgelerden toplanan 20 *Panax assamicus* Ban. popülasyonları üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, ITS profilinin bölge içinde oldukça yüksek gösterdiği bölgeler arasında ise önemli oranda, varyasyon gösterdiği bulunmuştur (Pandey ve Ali, 2012). Bu durum, *P. assamicus*'un aşırı tüketiminin doğal habitatına zarar vermesine ve bu yüzden popülasyonlar arası varyasyon oranının yükselmesine bağlanmıştır (Pandey ve

Ali, 2012). Ancak bu çalışmada incelenen farklı popülasyonlar arasında önemli sayılabilecek varyasyon tespit edilememiştir. Bu durumun *D. orientale*'nin antropolojik etkiden uzak olan kararlı habitatlarda yayılış göstermesinden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir. İncelenen popülasyonlar arasında genetik varyasyonun yalnızca tek bir moleküler belirteçle ortaya konulması her zaman sağlıklı ve yeterli bir veri sağlamayacağı bilinmektedir (Arif vd., 2010). Ne kadar çok farklı bölge veya gen incelenirse, incelenen örneğin genomdaki farklılıkları temsil edilebilecek o kadar iyi veriler elde edilebilir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise, incelenen 19 *D. orientale* popülasyonundan elde edilen genomik DNA'lar, aynı zamanda RAPD primerleri analiz edilmiştir. Mevcut çalışma kapsamında çok sayıda primer denenmiş fakat sadece üç farklı primer çalıştırılabilmiştir. Bu primeler kullanılarak elde edilen bantların büyüklüğünün 350-2000 bp arasında değiştiği ortaya konmuştur. İncelenen 19 popülasyon örneğinden elde edilen toplam 23 banttan 21'inin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Bu durum çalıştırılan primer sayısının azlığından ve/veya tür içi varyasyonun çok düşük seviyede olmasından kaynaklanabilir. Popülasyonlar arası yüksek varyasyon görülmesi farklı genotiplerin rastgele seçilmesinden kaynaklanabilir (Barret ve Kohn, 1991). RAPD tekniği kullanılarak elde edilen sonuçlara dayalı olarak elde edilen UPGMA ağacı incelendiğinde, tüm popülasyonların %20 benzerlik oranına sahip olduğu görülmektedir. Mevcut RAPD verilerine dayalı çizilen dendogramda (Şekil 10) oluşan 4 grubun kendi içinde de farklı küçük dallara ayrılmış olduğu görülmektedir.

RAPD analizi sonucu oluşturulan bu ağaç profili incelendiğinde, bazı popülasyonların birbirlerinden çok farklı olduğu görülmektedir. Örneğin özellikle B grubunu oluşturan Denizli (Do15), C grubunu oluşturan Gümüşhane (Do12) örnekleri ve D grubunu oluşturan Gümüşhane (Do11) ve Do20 (İzmir) örnekleri, diğer gruplardan daha yüksek bir farklılık göstermektedirler. Aynı zamanda aynı bölge içinde yer alan popülasyonlardan yalnızca Balıkesir popülasyonları (Do18, Do19) ve Trabzon (Do1), Gümüşhane (Do3) popülasyonları birbirine çok yakın bir bağlantı oluşturmuştur. Gümüşhane (Do12) ve Denizli (Do15) örneklerinin diğer popülasyonlardan çok daha fazla farklılık göstermesi, bu popülasyonların genotip farklılığını da ortaya koymaktadır. Birçok türde popülasyonlar arasındaki farklılığın sebebi gen akışı frekansı, döllenme, polinator, ekolojik ve iklimsel faktörlerle açıklanmıştır (Dittbrenner vd., 2005). Bu ihtimaller, yüksek derecede varyasyon gösteren *D. orientale* popülasyonları için de geçerli olabilir.

*Lathyrus sativus* L. türü üzerinde farklı RAPD primerleri kullanılarak yapılan bir çalışmada popülasyonlar arasında tespit edilen polimorfizm coğrafik uzaklığa bağlı olarak açıklanmıştır (Nosrati vd., 2012). Ancak mevcut çalışmaya konu olan üç farklı fitocoğrafik ve ekolojik koşulları temsil eden *D. orientale* türünün popülasyonları üzerinde yapılan çalışmada az sayıda polimorfik bant elde edilmiştir. Bunun nedeni olarak kullanılan primer sayısının veya seçilen örnek popülasyon sayısının azlığı görülmektedir. RAPD primerleri kullanılarak *Bellis perennis* L. üzerinde yapılan bir başka çalışmada benzer ekolojik koşullarda ve alanlarda yetişen popülasyonların bu çalışmada da elde edilen ağaç topolojisine benzer şekilde farklı kollarda yer aldıkları rapor edilmiştir (Kalaycıoğlu vd., 2010). Bu durum ya seçilen örneklerin popülasyonu yeterince temsil edememesinden ve/veya eşeyli üremeye bağlı olarak meydana gelen rekombinasyonlardan ileri gelebilir. Popülasyonlar arası farklılaşma seviyesi özellikle belirli bölge popülasyonlarında eşeyli üreme durumundan ya da diğer biyolojik etmenler sebebiyle oluşabilir (Eriksson, 1989).

Sonuç olarak bu çalışma ile, Türkiye orijinli *D. orientale* ait 19 farklı popülasyon hem nrDNA-ITS bölgeleri hem de RAPD profilleri açısından ilk kez incelenmiştir. Çalışılan popülasyonların ITS dizinleri ve RAPD profillerinin analizi sonucu elde edilen ağaç topolojilerinin popülasyon düzeyinde önemli oranda birbiriyle örtüşmeyen farklılıklar içerdiği tespit edilmiştir. Bunun en önemli nedenlerinden biri başarılı şekilde çalıştırılabilen RAPD primer sayısının azlığı ve/veya incelenen popülasyonların yeterli düzeyde temsil eden örnek üzerinden analiz edilememesinden kaynaklanabilir. Bununla beraber bu farklılıklara rağmen her iki ağaçta da birbirine örtüşen/uyumlu gruplaşmalar da söz konusudur. ITS ağacında aynı grup içinde yer alan Trabzon (Do1) ve Gümüşhane (Do3), RAPD analizi sonucu oluşturulan ağaçta da aynı grupta yer alarak moleküler düzeyde birbirine en benzer popülasyonlar olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde Balıkesir ilinden çalışmaya dahil edilen (Do18, Do19) örnekler, nrITS ve RAPD profilleri bakımından birbirine yüksek oranda benzemektedir. Bu durum bu iki popülasyon arasında gen akışının devam etmesinden kaynaklandığını göstermektedir. Yapılan her iki analiz sonucu incelenen tüm popülasyonlar arasında, özellikle fitocoğrafik bölgeler bazında, genetik benzerlik ve uyumun elde edilememesi örnek sayısının azlığından veya seçilen bölgenin popülasyonlar arası farklılık ve benzerlikleri yeterince temsil edememesinden kaynaklanabilir. Bu durumun daha net olarak ortaya konulması için daha farklı bölgelerin daha çok popülasyon kullanılarak analiz edilmesi gerekmektedir. İncelenen popülasyonlarda ITS1 ve ITS2 bölgelerinin benzerlik oranının yüksek bulunmasına karşın,

RAPD analizinde benzerlik oranı çok düşük bulunmuştur. Bu nedenle ITS bölgelerinin karşılaştırılması ile oluşturulan ağaç ile RAPD analizinin ağacı birbirinden farklı durumdadır. RAPD ve ITS verileri arasında uygunluk sağlamanın en iyi yolu kullanılan spesifik primer sayısının arttırılmasıdır. Ayrıca popülasyon içerisinde ve popülasyonlar arasındaki varyasyonu açıklayabilmek için popülasyonları daha iyi temsil edecek örnek sayısının arttırılması gerekmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma ile ülkemizde yayılış gösteren *D. orientale* Hoffm. türünün 19 popülasyonu moleküler özellikleri yönünden ilk kez incelenmiştir. Araştırmanın gerçekleştirildiği popülasyonlara ait örnekler nrDNA ITS bölgeleri açısından karşılaştırılmış ve RAPD profilleri ilk kez değerlendirilmiştir.

Çalışılan taksonlara ait ITS bölgelerinin uzunluklarının 703-711 bp arasında değişim gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen ITS bölgelerinin DNA baz sıraları BioEdit programı kullanılarak hizalanmış ITS1, 5,8S ve ITS2 bölgelerinin uzunlukları ayrı ayrı belirlenmiştir. ITS1 bölgesinin uzunluğunun 209-211 bp, ve ITS2 bölgesinin uzunluğunun 257-258 bp arasında olduğu tespit edilmiştir. 5,8S bölgesinin uzunluğu ise değişmeyip 164 bp kadardır. Örneklerin benzerlik oranlarının % 99,6-%100 arasında değiştiği ortaya konulmuştur. Bütün nrDNA-ITS bölgesinin G+C içeriğinin %53,2-53,6 arasında Pürin/Pirimidin oranının ITS1 bölgesi için 0,990-0,925 iken ITS2 bölgesi için ise bu oran 1,048-1,039 arasında olduğu ortaya konmuştur. İncelenen tüm popülasyonların nrDNA-ITS profillerine göre iki ana grup altında toplandıkları tespit edilmiştir.

İncelenen 19 *D. orientale* popülasyonu OPA7, OPA8 ve OPA19 RAPD primerleri kullanılarak polimorfik özellikleri ortaya konulmuştur. Kullanılan primerler ile büyüklüğü 350-2000 bp arasında değişen 23 bant elde edilmiş ve bu bantların 21'inin polimorfik olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca incelenen popülasyonların RAPD profillerine göre 4 grup altında toplandığı bulunmuştur. *D. orientale*'ye ait incelenen 19 popülasyon nrDNA ITS ve RAPD profillerine göre elde edilen ağaç topolojileri arasında sınırlı düzeyde uyum tespit edilmiştir.

## 6. ÖNERİLER

*D.orientale* türü Doğu Akdeniz'den Kafkaslara kadar uzanan çok geniş bir alanda yayılış göstermektedir. Bu durum türün farklı coğrafik ve ekolojik koşullarda adapte olabilen bir çok popülasyon ile temsil edilmesiyle sonuçlanır. Yapılan bu çalışmada ülkemizde geniş yayılış gösteren *D. orientale*'ye ait 19 farklı popülasyon nrDNA ITS bölgeleri açısından ve RAPD analizi ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmayı desteleyecek şekilde popülasyon sayısı arttırılarak ve popülasyon içi değerlendirmeler yapılacak şekilde örneklendirmeler arttırılmalıdır. Örneklemler hem ülkemizdeki *D. orientale*'ye ait yaşam alanlarını hem de yayılış gösterdiği ülkemiz dışındaki tüm alanları kapsamalıdır. Böylece hem ITS bölgelerini karşılaştırmada hem de RAPD analizinin daha kapsamlı yapılmasını sağlayacaktır. Ayrıca kullanılan RAPD primeri sayısının arttırılması ile popülasyonlar arası ve popülasyon içi varyasyonlar daha net ortaya koyulabilir.

Nükleer DNA ve cpDNA üzerinde bulunan diğer transkripte edilen (matK gibi) veya edilmeyen bölgeler sekans analizi yapılarak değerlendirilebilir. *D. orientale* popülasyonları üzerinde AFLP ya da RFLP gibi analizler yapılabilir. Ayrıca popülasyonların allozim profillerine bakılarak varyasyonlar daha net ortaya konulabilir. Popülasyonların genomik DNA miktarları flow sitometri yöntemi ile ölçülebilir.

*D. orientale*'ye ait popülasyonların değerlendirilmesi için moleküler çalışmalardan yararlanıldığı gibi popülasyonlar arası varyasyonları ortaya koyabilecek fenotipik karakterler ile bu çalışmalar desteklenebilir. Ayrıca popülasyonların ekolojik, sitolojik ve anatomik özellikleri incelenerek farklılıklar ortaya konulabilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abyshev, A., Z., Alieva, S., A., Damirov, I., A., Denisenko, P., P. ve D'yachuk, G., I., 1982. Coumarins of Roots of *Doronicum macnophyllum* Fisch, ex Horten and Their Antiarrhythmic Activity, Rastitel'Nye Resursy, 18, 249-252.
- Akpınar, K., Yıldırım, N., Üçüncü, O., Yaylı, N., Terzioğlu, S. ve Yaylı, N., 2009. Volatile Constituents of the Flowers and Leaves-Stems of Three *Doronicum* Taxa from Turkey, Asian Journal of Chemistry, 21, 2 , 1225-1229.
- Alieva, S., A., Omurkamzinova, V., B. ve Glyzin, V., I., 1979. Flavonoids *Doronicum macnophyllum* Fisch, ex Horten and *Doronicum oblongifolium* DC, Chemical Natural Compounds, 1, 96.
- Alvarez, F., I., 2003. Systematic of Eurasian and North African *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae), Annals of the Missouri Botanical Garden, 90, 319- 389.
- Alvarez, F., I., Fuertes, A., J., Panero, J., L. ve Nieto F., G., 2001. A Phylogenetic Analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) Based on Morphological, Nuclear Ribosomal (ITS) and Chloroplast (trn-F) Evidence, Molecular Phylogenetics and Evolution, 20, 41-64.
- Alvarez, F., I. ve Nieto, F., G., 1997. On the Lectotypification of *Doronicum carpetanum* (Compositae), Taxon, 46, 763-768.
- Alvarez, F., I. ve Nieto, F., G., 1999. Lectotypification of 16 Species Names in *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae), Taxon, 48, 801-806.
- Alvarez, F., I. ve Nieto, F., G., 2001. A Multivariate Approach to Assess the Taxonomic Utility of Morphometric Characters in *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae), Folia Geobotanica, 36, 423-444.
- Arif, I., A., Bakir, M., A., Khan, H., A., Al Farhan, A., H., Al Homaidan, A., A., Bahkali, A., H., Al Sadoon, M. ve Shobrak, M., 2010. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity, International Journal of Molecular Sciences, 11, 2079-2096.
- Baksay, L., 1956. Cytotaxonomical Studies on the Flora of Hungary, Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici, 7, 321-324.
- Baldwin, B., G., 1992. Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: An Example from the Compositae. Molecular Phylogeny Evolution, 1, 3-16.

- Baldwin, B., G., Sanderson, M., J., Porter, J., M., Wojciechowoski, M., F., Campell, C., S. ve Donoghue, M., J., 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny, Annals of the Missouri Botanical Garden, 250-272.
- Baldwin, B., G. ve Markos, S., 1999. Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S–26S rDNA Congruence of ETS and ITS Trees of *Calycadenia* (Compositae), Molecular Phylogeny Evolution, 10, 449-463.
- Bardakçı, F., 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers, Turkish Journal of Biology, 25, 185-196.
- Barrett, S., C., H. ve Kohn, J., R., 1991. Genetic and Evolutionary Consequences of Small Population Size in Plants: Implications for Conservation, Oxford University Press, New York, 30 s.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapları, İstanbul, 372 s.
- Bentham, G. ve Hooker, J., D., 1873. Genera Plantarum, 2, London, 280 s.
- Bremer, K., 1994. Asteraceae: Cladistic & Classification, Timber Press, Portland.
- Bohlmann, F., Dhar, A. ve Ahmed, M., 1980. Thymol Derivatives from *Doronicum hungaricum*, Phytochemistry, 19, 1850-1851.
- Bohlmann, F. ve Grenz, M., 1979. Neue Tremeton Derivate aus *Doronicum macrophyllum*, Phytochemistry, 18, 179-181.
- Bohlmann, F. ve Abraham, W., R., 1979. Ein Neuer Sesquiterpen Alkohol und Andere Inhaltsstoffe aus *Doronicum pardalianches*, Phytochemistry, 18, 668-671.
- Candolle, A., P., de., 1836. Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis, 5, Paris, 237 s.
- Candolle, A., P., de., 1838. Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis, 6, Paris, 224 s.
- Cavillier, F., 1907. E’tude Sur Les *Doronicum* a’fruits Homomorphes, Annuaire du Conservatoire & du Jardin Botaniques de Geneve, 10, 177-251.
- Cavillier, F., 1911. Nouvelles E’tudes Sur Le Genre *Doronicum*, Annuaire du Conservatoire & du Jardin Botaniques de Geneve, 13-14, 195-368.
- Cassini, H., 1819. Suite Du Sixie’mes Me’moire Sur La Famille Des Synanthe’res, Journal de Physique, de Chimie, d’Histoire Naturelle et des Arts, 88, 189-204.

- Carlson, J., E., Tusieran, L., K., Glaubitz, J., C., Luk, V., W., K., Kauffeldt, C., ve Rutledge, R., 1991. Segregation of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in F1 Progeny of Conifers, Theoretical and Applied Genetics, Vol. 83, 194-200.
- Cronquist, A., 1968. The Evolution and Classification of Flowering Plants, Thomas Nelson Ltd., London and Edinburg, 308 s.
- Dittbrenner, A., Hensen, I. ve Wesche, K., 2005. Genetic Structure and Random Amplified Polymorphic DNA Diversity of the Rapidly Declining *Angelica palustris* (Apiaceae) in Eastern Germany in Relation to Population Size and Seed Production, Plant Species Biology, 20, 191-200.
- Dharmananda, S., Safety Issues Affecting Herbs: Pyrrolizidine Alkaloids, Ph. D., Institute for Tradational Medicine, Potland, Oregon, 2001.
- Doyle, J., J. ve Doyle, J., L., 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue, Phytochemical Bulletin, 19, 11-15.
- Dweikat, I., Mackenzie, S., Levy, M. ve Herbert, O., 1993. Pedigree Assesment Using RAPD-DGGE in Cereal Crop Species, Theoretical and Applied Genetics, 85, 497-505.
- Edmondson, J., R., 1975. In: Davis, P. H., Ed. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg Press, Edinburg, 5, 137-145.
- Edmondson, J., R., 1978. The Genus *Doronicum* L. in Iran Notes, Edinburgh, 320 s.
- Eriksson, O., 1989. Seedling Dynamics and Life Histories in Clonal Plants, Oikos, 55, 231-238.
- Ferguson, I., K., 1976. *Doronicum* L., In: Tutin, T., G., Heywood, V., H., Burges, N., A., Moore, D., M., Valentine, D., H., Walters, S., M. ve Webb, D., A., Eds., Flora Europaea, Cambridge University Press, Cambridge, 3, 190-191.
- Fritsch, P. ve Rieseberg, L., H., 1992. Outcrossing Rates are High in Androdioecious Populations of the Flowering Plant *Datisca glomerata*, Nature, 359, 633-636.
- Gültepe, M., Uzuner, U., Coşkunçelebi, K., Beldüz, A., O. ve Terzioğlu, S., 2010. ITS (Internal Transcribed Spacer) Polymorphism in the Wild *Primula* L. (Primulaceae) Taxa of Turkey, Turkish Journal of Botany, 34, 147-157.
- Hall, T., A., 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.
- Halward, T., Stalker, T., Larue, E. ve Kochert, G., 1992. Use of Single Primer DNA Amplification in Genetic Studies of Peanut (*Arahcis hypogaea* L.), Plant Molecular Biology, 18, 315-325.

- Haque, I., Bandopadhyay, R. ve Mukhopadhyay, K., 2009. Intraspecific Variation in *Commiphora wightii* Populations Based on Internal Transcribed Spacer (ITS1-5.8S-ITS2) Sequences of rDNA, Diversity, 1, 89-101.
- Hooper, T. ve Taylor, M., 2002. The Beekeeper's Garden, Alpha Books, Norfolk, U.K., 203 s.
- Kavalcıoğlu, N., Açık, L. ve Pınar, M., 2010. Comparative RAPD Analysis and Pollen Structure Studies of *Bellis perennis* L., Turkish Journal of Botany, 34, 479-484.
- Lamarck, J., B., A., P., 1786. Encyclopedie methodique, Botanique, 2, Paris, 230 s.
- Lazarevic, J., Radulovic, N., Radosav, P. ve Zlatkovic, B., 2009. Chemical Composition of the Essential Oil of *Doronicum austriacum* Jacq. subsp. *giganteum* (Griseb.) Stoj. et Stef. (Compositae) From Serbia, Journal of Essential Oil Research, 21, 507-510.
- Lindqvist, K., 1950. Some Results of a Cytological Investigation of *Doronicum*, Hereditas, 36, 94-102.
- Linnaeus, C., 1753. Species Plantarum, Stockholm, 540 s.
- Maguire, B., 1943. A Monograph of the Genus *Arnica*, Brittonia, 4, 386-510.
- Ma'jovsky', J. ve Mury'n, A., 1987. Karyotaxonomicky Prehl'ad Flory Slovenska, Veda Vydavatel' Stvo Slovenskej Akade'mie Vied, Bratislava, 650 s.
- Martin, G., B., Williams, J., G., K. ve Tanksley S., D., 1991. Rapid Identification of Markers Linked to a *Pseudomonas* Resistance Gene in Tomato Using Random Primers and Near-Isogenic Lines, Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 88, 2336-2340.
- Necker, N., J., 1790. Elementa Botanica, Neuwied, 350 s.
- Nordenstam, B., 1977. Senecioneae and Liabeae Systematic Review, The Biology and Chemistry of the Compositae, Academic Press, London, 850 s.
- Nosrati, H., Feizi, M., A., H., Nikniazi, M. ve Razban-Haghighi, A., 2012. Genetic Variation Among Different Accession of *Lathyrus sativus* (Fabaceae) Revealed by RAPDs, Botanica Serbica, 36 ,1, 41-47.
- Novak, F., A., 1965. Das grosse Bilderlexikon der Pflanzen, Phonoklub Stuttgart, 598 s.
- Paolini, J., Muselli, A., Bernardini, A., F., Bighelli, A., Casanova, J. ve Costa, J., 2007. Thymol Derivatives from Essential Oil of *Doronicum corsicum* L., Flavour and Fragrance Journal, 22, 479-487.
- Pandey, A., K., ve Ali, M., A., 2012. Intraspecific Variation in *Panax assamicus* Ban. Population Based on Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences of nrDNA, Indian Journal of Biotechnology, 11, 30-38.

- Parmaksız, İ., 2004. *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonunun Türkiyede Yetişen Türlerinde Genetik Çeşitliliğin RAPD Markörleri ile Analizi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Peruzzi, L., Bedini, G. ve Andreucci, A., 2011. Homoploid Hybrid Speciation in *Doronicum* L. (Asteraceae) Morphological, karyological and molecular evidences, Plant Biosystems, 1-11.
- Pobedimova, E., G., 1995. *Doronicum* L., Gorshkova, S., G., Eds. Flora U.S.R.R., Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz Scientific Books, Germany, 782.
- Podani, J., 1993. Syn-Tax-Pc Computer Programs for Multivare Data Analysis in Ecology and Systematics Version 5.0, Scientia Publishing, Budapest.
- Reynaud, J. ve Raynaud, J., 1984. Sur la pre'sence d' Onopordine Chez *Doronicum grandiflorum* Lam. (Compose'es), Pharmazie, 39, 126-131.
- Reynaud, J. ve Raynaud, J., 1986. Les Flavony'des de *Doronicum grandiflorum*, Biochemical Systematic and Ecology, 14, 191-193.
- Robins, D., J., 1977. The Biology and Chemistry of the Compositae, London Senecioneae Chemical Review, 831-850.
- Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. ve Bousquet, J., 1992. Segregating Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) in *Betula alleghaniensis*, Theoretical and Applied Genetics, 85, 173-180.
- Röder, E., 1995. Medicinal Plants in Europae Containing Pyrrolizidine Alkoloids, Pharmazie, 50, 83-98.
- Salkın, S., 2005. RAPD Markörleri ile Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Bazı Mısır Genotiplerinin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Strid, A. ve Anderson, I., A., 1985. Chromosome Numbers of Greek Mountains Plants, Botanische Jahrbuecher fuer Systematik, 107, 206-211.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. ve Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Molecular Biology and Evolution, 24, 1596-1599.
- Takhtajan, A., L., 1980. Outline of the Classification of Flowering Plants (Magnoliophyta), The Botanical Review, 46, 3, 225-359.
- Tekin, E., 2007. Türkiye'nin En Güzel Yabani Çiçekleri, Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, İstanbul.
- Tomasevic, M., Samardzic, I. ve Ilijanic, L., 1999. New Localities of the Species *Doronicum orientale* Hoffm. ( Asteraceae) in Croatia, Natura Croatica, 8, 2, 87-93.

Tuzlacı, E., 2006. Türkiye Bitkileri Sözlüğü, Alfa Yayınları, İstanbul.

Umdü, Ü., 2005. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Yayılış Gösteren *Doronicum* L. (Compositae) Türlerinin Morfolojik, Palinolojik ve Sitolojik Yönden İncelenmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

URL-1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=doronicum%20orientale>, 24.12.2012.

Welsh, J. ve McClelland M., 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers, Nucleic Acids Research, 18, 7213-7218.

Williams, J., G., K., Kubelik, A., R., Livak, R., J., Rafalski, J., A. ve Tingey, S., V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, Nucleic Acids Research, 18, 6531-6535.

Willkomm, H., M. ve Lange, J., M., C., 1870. Prodrömus Florae Hispanicae, 2, Stuttgart.

Worsley, J., 1898. The Botanical Dermatology Database, Cardiff, U.K., 565 s.

## 8. EKLER

### Ek 1. *D. orientale* Do1 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası

#### ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

#### ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

### Ek 2. *D. orientale* Do2 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası

#### ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

#### ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAGACAGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

### Ek 3. *D. orientale* Do3 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası

#### ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

“Ek 3’ün devamı”

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGGTG  
GTTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

### Ek 4. *D. orientale* Do4 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası

## ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTGCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGGTGG  
GTTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

### Ek 5. *D. orientale* Do5 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası

## ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTGCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 6. *D. orientale* Do6 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

**ITS2**

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCGGAACCTCACGGCGGGTGG  
GTTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 7. *D. orientale* Do7 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

**ITS2**

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTGCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCGGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 8. *D. orientale* Do8 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

“Ek 8’in devamı”

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

### Ek 9. *D. orientale* Do9 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası

## ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

### Ek 10. *D. orientale* Do10 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası

## ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 11. *D. orientale* Do11 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

**ITS2**

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCGGAACCTCACGGCGGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 12. *D. orientale* Do12 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

**ITS2**

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCGGAACCTCACGGCGGGGTG  
GTTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 13. *D. orientale* Do14 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

“Ek 13’ün devamı”

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 14. *D. orientale* Do15 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

## ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

## ITS2

TAATTACAAAGAAGATGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTGCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 15. *D. orientale* Do16 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

## ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTCTCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 16. *D. orientale* Do17 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

**ITS2**

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCGGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 17. *D. orientale* Do18 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

**ITS2**

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCGGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 18. *D. orientale* Do19 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

**ITS1**

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

“Ek 18’in devamı”

## ITS2

TAATTACAAAGAAGCTGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACAGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

**Ek 19. *D. orientale* Do20 Örneğine Ait rDNA ITS1 ve ITS2 Bölgelerinin Baz Sırası**

## ITS1

AATCGAAGCGTCATCACAAGACAACACGTTAGGGTCTATGTAGGTCTTCCTTA  
CGAATCACAACACACGGCTCGATACGAGGGTTTTGTCAACCACCACTAGCCGT  
GCGTCCGCCGAAGGGGATTCTAATTTTGGCCAGCCGCACCATGGGAACGGGAG  
ACCATTATCCGCCCCCATTTACGTGTGATTTCGTGATGGGGGTGAACGTGAC

## ITS2

TAATTACAAAGAAGATGCGTGCCATGAGCGCACCGCAAACGGGGGCATGCATG  
GCACGAGTCCTTTTCAAGTTTTGTTTTTCCTTGGCACATTCCGTGCCGGGGTTTGT  
TGTTGTGCCGATGTGAAGTCCATGACGCCCTTAACGGGTGTCCTTGAGCACAC  
ATCGACGAAACGCCATGAGTCTCAAACAAGTGTCCGAACCTCACGGCGGGTGG  
TTGTTAGTACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTTGCAGGCTTCGA

## **ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında Iğdır’da doğdu. Lise öğrenimini Niğde Bor Akın Gönen Anadolu Lisesi’nde 2004 yılında tamamladı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yükseköğrenimine başladı. Bu bölümden 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmekte ve İngilizce bilmektedir.