

***HYPERICUM* L. (HYPERICACEAE) CİNSİNE AİT *DROSANTHE*
(SPACH) ENDL. SEKSİYONUNUN KLOROPLAST GENOMUNUN
KODLANMAYAN “*trn*” BÖLGELERİNE GÖRE
KARŞILAŞTIRMALI FİLOGENETİK ANALİZİ**

Gülden DOĞAN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Eyüp BAĞCI

ŞUBAT-2013

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HYPERICUM* L. (HYPERICACEAE) CİNSİNE AİT *DROSANTHE* (SPACH) ENDL.
SEKSİYONUNUN KLOROPLAST GENOMUNUN KODLANMAYAN “*trn*”
BÖLGELERİNE GÖRE KARŞILAŞTIRMALI FİLOGENETİK ANALİZİ**

DOKTORA TEZİ

**Gülden DOĞAN
(091110202)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28/01/ 2013

Tezin Savunulduğu Tarih : 15/02/2013

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Eyüp BAĞCI (F.Ü)



Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Harun EVREN (F.Ü)



Doç. Dr. Sertaç ÖNDE (ODTÜ)



Doç. Dr. Mustafa KARATEPE (F.Ü)



Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU (F.Ü)



ŞUBAT-2013

ÖNSÖZ

Tez konusunun seçimi ve çalışmalarımın yönlendirilmesi konusunda desteklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Eyüp Bağcı'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın her aşamasında büyük destek sağlayan Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Zeki Kaya hocama ve onun çalışma ekibinde yer alan Arş. Gör. arkadaşlarım Aslı Özdilek, M. Alev Ateş ve Aysun Gürsoy'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmaların büyük kısmının Ankara'da yürütülmesi sırasında göstermiş olduğu anlayıştan ötürü sayın bölüm başkanımız Prof. Dr. Harun Evren'e saygılarımı sunarım.

Tez yazım aşamasında desteğini ve yardımını esirgemeyen arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Ebru Yüce'ye, Arş. Gör. arkadaşlarım Emel Aydın ve Hasan Gençoğlu'na, doktora öğrencisi Azize Demirpolat'a, ayrıca çalışmalarına maddi destek sağlayan FÜBAP birimine de teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olup, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anne ve babama, eşime şükranlarımı sunarken, tez bitene kadar gösterdikleri sabır ve anlayıştan ötürü canım çocuklarımı da sevgiyle kucaklarım...

Gülden DOĞAN

ELAZIĞ-2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ.....	IX
1.GİRİŞ	1
1.1. Genetik Bilimi ve Tarihçesi	1
1.2. DNA ve Kromozomlar.....	3
1.3. DNA Dizilemesi ve Genomik	4
1.4. Bitki Sistematğinde Moleküler Gelişmeler.....	4
1.5. Sistematikte Kullanılan Belirteçler (Markörler).....	6
1.5.1. Morfolojik Belirteçler	6
1.5.2. Biyokimyasal Belirteçler.....	7
1.5.3. DNA Belirteçleri.....	7
1.6. Moleküler Markör Yöntemleri	8
1.6.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA=Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)	9
1.6.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism=Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)	11
1.6.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism=Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)	12
1.6.4. Mikrosatellit veya SSR (Simple Sequence Repeats=Basit Dizi Tekrarları)	13
1.6.5. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism=Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm)	14
1.6.6. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats=Ara Basit Dizi Tekrarları).....	14
1.6.7. Mikroarray.....	15

1.6.8. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms=Tek Nükleotid Polimorfizimleri)	16
1.7. Bitki Genom Kaynakları ve Özellikleri	16
1.7.1. Nüklear DNA (nr DNA).....	16
1.7.2. Mitokondrial DNA (mt DNA).....	17
1.7.3. Kloroplast DNA (cp DNA)	17
1.7.3.1. Kloroplast DNA'nın Transfer Ribonükleik Asit Bölgesi.....	19
1.7.4. Bitki Genomları İle İlgili Bazı Çalışmalar	21
1.8. Hypericaceae Juss. Familyası İle İlgili Genel Bilgiler	23
1.8.1. Hypericaceae Familyasının Filogenisi.....	25
1.9. <i>Hypericum</i> L. Cinsi İle İlgili Genel Bilgiler	28
1.10. <i>Hypericum</i> L. Cinsi <i>Drosanthe</i> (Spach) Endl. Seksiyonunun Özellikleri	34
1.11. Çalışmanın Amacı	41
2. MATERİYAL ve METOT.....	42
2.1. Bitki Materyallerinin Elde Edilmesi	42
2.2. Yapraklardan DNA İzolasyonu	48
2.3. DNA Ölçümü	50
2.4. Ön Denemeler ve Kloroplast DNA'nın t-RNA Bölgesinin Çoğaltılması.....	50
2.5. PCR'da Çoğaltma	51
2.6. PCR Ürünlerinin Gözlenmesi.....	53
2.7. Kloroplast DNA'nın t-RNA Bölgesinin Sekanslanması.....	53
2.8. Veri Analizleri	55
3. BULGULAR	56
3.1. DNA İzolasyonu	56
3.2. Kloroplast DNA'nın <i>trnL-trnF</i> Bölgesinin Çoğaltılması	58
3.3. Kloroplast DNA'nın <i>trnL-trnF</i> Bölgesinin Sekans Analiz Sonuçları	59
3.4. Veri Analizleri	59
3.4.1. Kloroplast DNA'nın <i>trnL-trnF</i> Bölgesinin Nükleotid Kompozisyonu	60
3.4.2. Bireyler Arasındaki Moleküler Çeşitlilik Parametreleri	62
3.4.3. Bireylerin Gruplandırılması ve Gruplar Arası Uzaklık (Distance) Analizi.....	66

3.4.4. Bireyler Arasındaki Filogenetik İlişkilerin Belirlenmesi.....	67
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	71
KAYNAKLAR.....	83
EKLER.....	94
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Angiosperm'lerden Malpighiales ordosuna ait Hypericaceae familyasının 9 cinsinden biri de *Hypericum*'dur. İçerdiği hyperisin ve pseudohyperisin gibi maddelerden dolayı antibakteriyel, antimikrobiyal, antidepresan ve antioksidan aktivitesine sahip olan *Hypericum* cinsi tıbbi bir bitki olarak kabul görmüştür. Ayrıca cins, içerdiği uçucu yağlar nedeniyle de potansiyel tat ve koku endüstrisinde önemli bir hammadde kaynağı olmuştur. Son zamanlarda cins içindeki akrabalık ilişkilerini daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koymak, morfolojik benzerlik ve farklılıklardan kaynaklanan taksonomik sorunlara yeni bir bakış açısı getirmek ve birbirine yakın olduğu belirtilen taksonlar arasındaki taksonomik sınırları belirlemek ve mevcut problemleri gidermek amacıyla, cins üzerinde yapılan moleküler ve filogenetik tabanlı çalışmalar hız kazanmıştır.

Bu çalışmada, dünyanın değişik bölgelerinde ve Türkiye'de doğal yayılış gösteren *Hypericum* L. cinsi *Drosanthe* (Spach) Endl. seksiyonu üyelerinin kloroplast genomundaki kodlanmayan transfer ribonükleik asit bölgesinin (*trnL-F*) dizi analiz bilgileri kullanılarak, seksiyon içindeki taksonların birbirine olan genetik yakınlığı ve uzaklığının belirlenmesi, taksonlar arası akrabalık, sistematik ve filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu seksiyona ait 9 takson endemik olup, 20 taksona ait 58 bireyin yapraklarından DNA izolasyonu, *trnL-F* bölgesinin e-f primerleri kullanılarak PCR'da çoğaltılması ve sekans diziliminin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Mega 5.1 programı kullanılarak yapılmış ve Maksimum Likelihood yönteminden yararlanılarak da filogenetik ağaç hazırlanmıştır.

Çalışılan bireylerin T, C, A ve G bazlarının oranları bakımından birbirinden çok farklı olmadığı, baz kompozisyonlarının hemen hemen benzer olduğu, bireylerdeki A-T oranının % 69,3 ve G-C oranının % 30,7 olduğu, yani bireylerin A-T'ce daha zengin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, korunmuş bölge (C) sayısının 162, varyasyonlu bölge (V) sayısının 6, bilgi verici bölge (Pi) sayısının 6, homolog baz çifti (ii) sayısının 144, transitiyonel (si) ve transversiyonel (sv) çiftlerin sayısının 1 olduğu, birden çok grup arasında uzaklık değerinin bulunmadığı (0.00) ve en yüksek uzaklık değerinin ise Grup 11 (*H. helianthemoides*) ile Grup 21 (*H. kamtschaticum*) arasında olduğu (0.05) tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki nükleotid çeşitliliği ve standart hata da (SE) 0.01 olarak bulunmuştur.

trnL-F bölgesinin sekans diziliminden yararlanarak hazırladığımız filogenetik ağaca göre *Drosanthe* seksiyonu üyelerinin polifiletik bir grup oluşturduğunu söylemek mümkündür. Morfolojik olarak birbirinden oldukça farklı bir profil çizen seksiyon üyelerinin çalışılan moleküler bölge bakımından da farklı kladlarda yer alması taksonlar arasındaki yüksek farklılık oranlarını doğrulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum*, *Drosanthe*, Kloroplast DNA, *trnL-F* Bölgesi, Polifiletik.

SUMMARY

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *DROSANTHE* (SPACH) ENDL. SECTION BELONGS TO *HYPERICUM* L. (HYPERICACEAE) GENUS BY COMPARING THE NON-CODING “trn” REGIONS OF THE CHLOROPLAST GENOME

Hypericum L. is one of the nine genus of Hypericaceae family belongs to Malpighiales ordo in Angiospermae. It has been accepted as a medicinal plant since it has antibacterial, antimicrobial, antidepressant and antioxidant activities due to the presence of hypericin and pseudohypericin. In addition, it has been an important raw material in the flavour and fragrance industry as it contains essential oils. Recently, molecular and phylogenetic study of the genus has been accumulated to find out detailed intrageneric relationships, to have a new vision to the taxonomic problems arise from the morphologic similarity and differences, to identify the taxonomic delimitation between the taxons defined to be close to each other and to eliminate the present problems, as well. In this study, it is aimed that to determine the genetic distances of *Drosanthe* (Spach) Endl. Section in *Hypericum* genus naturally distributed in different places in the World and also in Turkey, the infrageneric relationships and systematic and phylogenetic relationships by using non-coding transfer ribonucleic acid region (*trnL-F*) of chloroplast DNA sequence informations. DNA isolation from the leaves of 58 individuals of 20 taxa, 9 taxa are endemic in the section, amplification of *trnL-F* region using e-f primers by PCR, and the identification of the sequence arrangement was carried out. The DATA was statistically evaluated by using Mega 5.1. software and phylogenetic tree was made by Maximum Likelihood method.

The studied individuals are found not to have very different ratios of T,C,A and G bases, and they are identified to have similar base composition. A-T ratio of the individuals is 69.3%, and G-C ratio is 30.7% that is meaning that individuals are A-T rich. Furthermore, conserved region (C), variable region (V), informative region (Pi), identical pairs (ii), transitional (si) and transversional (sv) numbers are found as 162, 6, 6, 144, 1 respectively. There is no distance value (0.00) between more than one group and the highest distance value (0.05) is identified to be between Group 11 (*H. helianthemoides*) and Group 21 (*H. kamtschaticum*). The nucleotide variety between groups and standart error (SE) are also found as 0.01. According to the phylogenetic tree prepared by using the sequence of *trnL-F* region, *Drosanthe* section members are likely to form a polyphletic group. The section members that are considerably different from each other morphologically are present at different clades with regard to studied molecular region conforming the high diversity ratios between taxa.

Keywords: *Hypericum*, *Drosanthe*, Chloroplast DNA, *trnL-F* Region, Polyphyletic.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. PCR’ın çalışma prensibi	8
Şekil 1.2. Kloroplast DNA’nın “trn” Bölgesi	20
Şekil 1.3. Malpighiales ordusuna ait filogenetik ağaç	26
Şekil 1.4. Hypericaceae familyasının cinslerine ait filogenetik ağaç	27
Şekil 1.5. <i>Hypericum</i> cinsinin Türkiye’deki yayılışı	34
Şekil 1.6. <i>Drosanthe</i> seksiyonu üyelerinin Türkiye’deki yayılışı	35
Şekil 2.1. Çalışma kapsamında kullanılan taksonların toplandığı lokaliteler.....	45
Şekil 2.2. Çalışma kapsamında kullanılan bazı bitkilerin habitusları	47
Şekil 2.3. Laboratuvar çalışmasından görüntüler	49
Şekil 3.1. PCR ürünlerinin %2 ‘lik agaroz jeldeki görüntüsü	58
Şekil 3.2. Çift ve kırık DNA bantları.....	58
Şekil 3.3. Varyasyon açısından bilgi verici bazların pozisyonu	65
Şekil 3.4. Bireyler arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Maximum Likelihood ağacı.....	68
Şekil 3.5. Gruplar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Maximum Likelihood ağacı	69
Şekil 4.1. <i>Hirtella</i> seksiyonunun da yer aldığı filogenetik ağaç.....	80

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1. <i>Drosanthe</i> üyelerinin morfolojik özellikler bakımından Türkiye Florası'ndaki betiminden farklılıkları	38
Tablo 2.1. Çalışma kapsamında kullanılan taksonların listesi ve lokalite bilgileri	43
Tablo 2.2. PCR şartlarının optimizasyonu için denenen reaksiyon karışımları	51
Tablo 2.3. Optimize edilmiş PCR reaksiyon karışımı	52
Tablo 2.4. Kloroplast DNA'nın <i>trn</i> bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR döngü programı.....	52
Tablo 2.5. Sekanslama reaksiyonu için gereken koşullar.....	54
Tablo 2.6. Sekanslama reaksiyonu için gerekli PCR programı	54
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bireylerin minimum ve maksimum DNA konsantrasyonları	57
Tablo 3.2. Kloroplast DNA'nın <i>trnL-trnF</i> bölgesinin nükleotid kompozisyonu	61
Tablo 3.3. Dış grup eklenmeden önce bireyler arasındaki moleküler çeşitlilik parametreleri.....	62
Tablo 3.4. Dış grup eklendikten sonra bireyler arasındaki moleküler çeşitlilik parametreleri	63
Tablo 3.5. Gruplar arasındaki genetik uzaklık matrisi	66

KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Adenin
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
ark.	: Arkadaşları
ATP	: Adenozin Trifostat
BIC	: Bayesian Information Criterion
bp	: Baz Çifti
C	: Korunmuş Bölgeler
C (S)	: Sitozin
cDNA	: Komplementer DNA
cpDNA	: Kloroplast DNA'sı
CTAB	: Cetly Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
FASTA	: Nükleotid veya Peptid Sekansların Diziminde Kullanılan Biyoinformatik Format
G	: Guanin
GS	: Genetik Benzerlik
IGS	: Intergenik Kesici Bölge
ISSR	: Ara Basit Dizi Tekrarları
ITS Bölgesi	: İç Transkripsiyonu Aralayıcı Bölge
ii	: Homolog Baz Çifti Sayısı
JC	: Jukas Cantor
Kb	: Kilo Baz Çifti
Mb	: Milyon Baz Çifti
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar

mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
mtDNA	: Mitokondri DNA'sı
NADH	: Nikotinamid Adenindinükleotid Hidrogenaz
NCBI	: National Center of Biotechnology Information
nrDNA	: Nüklear DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pi	: Bilgi Verici Bölgeler
R	: Transitiyonal ve Transversiyonal Çiftlerin Birbirine Oranı
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RE	: Restriksiyon Enzimleri
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (devir/dakika)
r-RNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
S	: Tekli Kısımlar
si	: Transitiyonal Çiftler
SNPs	: Tek Nükleotit Polimorfizmleri
SRAP	: Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm
SSR	: Basit Dizi Tekrarları
sv	: Transversiyonal Çiftler
T	: Timin
t-RNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
T92	: Tamura-3-parameter
UPGMA	: Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu
V	: Varyasyonlu Bölgeler
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

1. GİRİŞ

Ülkemiz coğrafik konumu gereği zengin bir flora ve çok değişik vejetasyon tiplerine sahiptir. Türkiye’de tanımlanmış tohumlu bitki türü sayısı ve endemizm oranı oldukça yüksektir. Bu tür zenginliği Avrupa’nın başka hiçbir ülkesinde yoktur. Bu nedenle ülkemiz bitki çeşitliliği açısından bir kıta özelliği gösterir.

Dünyanın değişik bölgelerinde ve ülkemizde doğal yayılış gösteren Hypericaceae familyasına ait *Hypericum* cinsi içerdiği bazı maddelerden dolayı tıbbi bir bitki olarak kabul görmüş, ayrıca bünyesinde barındırdığı uçucu yağlar nedeniyle de tat ve koku endüstrisinde bir hammadde kaynağı olarak yerini almıştır. 9 cins ile temsil edilen Hypericaceae familyasının *Hypericum* cinsi toplam 591 taksona sahip oldukça büyük bir cins olup, bu cins ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur. Son yıllarda yapılan bu çalışmaların moleküler ve filogenetik tabanlı olduğu dikkat çekmektedir.

1.1. Genetik Bilimi ve Tarihçesi

Genetik eski Yunanca’da “Genesis” (oluşum-köken) kelimesinden türemiş olan bir kelimedir ve kalıtım bilimi olarak bilinir. Canlıların özelliklerinin kalıtsal olduğu bilinci ile tarih öncesi çağlardan beri bitki ve hayvanlar ıslah edilmiştir. Bununla birlikte, kalıtsal aktarım mekanizmalarını anlamaya çalışan modern genetik bilimi ancak 19. yüzyılın ortalarında, Gregor Mendel’in çalışmalarıyla başlamıştır. Genler DNA’da belli bölgelere karşılık gelen kalıtımın temel fonksiyonel birimleridir ve günümüzde modern genetiğin ilgi merkezidir (Weiling, 1991).

Mendel, bitkilerde kalıtım özellikleri üzerine ayrıntılı çalışmalar yapmış, 1856 yılından itibaren çeşitli bezelye (*Pisum sativum*) varyetelerine ait tohumları toplamaya ve onları manastır bahçesinde yetiştirerek aralarındaki farkları incelemeye başlamış ve 10 yıl süren gözlem ve deneylerinin ardından, bu çalışmasının önemli bulgularını “*Versuche Über Pflanzenhybriden*” (Bitki melezleri üzerinde denemeler) adlı ünlü inceleme yazısında yayınlamıştır (Mendel, 1866). O tarihlerde DNA, kromozom, mayoz bölünme gibi kavramların henüz ortaya konmamış olduğu ve bilinmediği göz önüne alındığında, Mendel’in sadece fenotipik (gözlenebilen) karakter ayrılıklarına göre yapmış olduğu değerlendirmelerin son derece başarılı olduğu söylenebilir.

Mendel'in çalışmasının yeniden keşfinin ve popüler hale gelişinin ardından, DNA moleküler temelini gün ışığına çıkarmaya yönelik birçok deney yapılmıştır. Beyaz gözlü *Drosophila* (meyve sineği) üzerindeki gözlemlerinden yola çıkan Thomas Hunt Morgan 1910'da genlerin kromozomlarda yer aldığını ileri sürmüş ve 1911'de mutasyonların varlığını ortaya koymuştur. Morgan'ın öğrencisi Alfred Sturtevant ise genetik bağlantı fenomenini kullanmış ve 1913'de genlerin kromozom boyunca birbirini izleyen dizilişi ve düzenini gösteren, ilk "genetik harita"yı yayınlamıştır (Moore, 1983).

Önceleri kromozomların genleri içerdikleri ve protein ile DNA'dan oluştukları bilinmekteyse de, kalıtmıdan hangisinin sorumlu olduğu henüz bilinmemekteydi. 1928'de Frederick Griffith'in transformasyon fenomenini açıklamasından 16 yıl sonra 1944'de, Oswald Theodore Avery, Colin McLeod ve Maclyn McCarty transformasyondan sorumlu molekülün DNA olduğunu ispatladılar. 1953'de James D. Watson ve Francis Crick DNA molekülünün sarmal bir yapısı olduğunu yani bir nükleotit dizisinin diğer iplikçikte tamamlayıcı eşleri olduğunu ileri sürdüler. Bu yapı, nükleotitlerin sıralanmalarıyla genetik bilginin saklanabileceğini göstermekle kalmadı, aynı zamanda iki iplikçik birbirinden ayrışınca, her iplikçğin kendine eş olacak yeni bir iplikçğin oluşumu için kendi dizisini bir kalıp olarak kullanabileceğini de göstermiş oldu (Watson ve Crick, 1953). Bu son durum kalıtım sürecini açıklamaktaysa da, DNA'nın hücre davranışlarını nasıl etkilediği henüz bilinmiyordu. Sonraki yıllarda, bazı bilim adamları, DNA'nın, ribozomlardaki protein üretim süreçlerini kontrol mekanizmasını anlamaya çalıştılar ve DNA'nın genetik kodunun mesajcı RNA (mRNA) ile okunduğunu ve çözüldüğünü buldular. RNA, DNA'ya benzer, nükleotitlerden oluşmuş bir molekül olup, mRNA'nın nükleotit dizisi proteinlerdeki amino asit dizisini oluşturmak için kullanılmaktaydı ve nükleotit dizisinin amino asit dizisine çevirisi genetik kod aracılığıyla gerçekleşmekteydi. 1977'de Frederick Sanger'in zincir sonlandırıcı DNA dizileme yöntemi bu alanda önemli bir gelişme olmuş, bu teknoloji ile DNA moleküllerinin okunması gerçekleştirilmiş ve 1983'de Kary Mullis tarafından geliştirilen polimeraz zincir tepkimesi ile de, DNA izolasyonu ve DNA parçalarının istenen bölgelerinin kolayca çoğaltılması sağlanmıştır (Sanger ve ark., 1977; Saiki ve ark., 1985).

1.2. DNA ve Kromozomlar

DNA normal olarak sarmal biçimde dolanmış iki iplikçikli bir moleküldür, ipliğin birindeki her nükleotit, karşıt iplikteki nükleotit partneriyle bir çift oluşturur, yani A, T ile G de C ile çift yapar. Dolayısıyla iki iplikçikten her biri, tüm gerekli enformasyona sahip bulunur, DNA'nın bu yapısı kalıtımın fiziksel temelidir. DNA ikileşmesinde, iplikçiklerin ayrışması ve her iplikçiğin yeni iplikçik eşinin bir kalıbı olarak kullanılmasıyla, genetik enformasyon kopyalanır.

Genler, kromozom denen DNA dizisi zincirleri boyunca doğrusal bir düzende sıralanmışlardır. Bakterilerde her hücrenin basit ve dairesel bir kromozoma sahip olmasına karşılık, bitki ve hayvanların da dahil bulunduğu ökaryot organizmalar, çoklu doğrusal kromozomlar halinde düzenlenmiş DNA'lara sahiptirler (Griffiths ve ark., 2000). Bir kromozomdaki DNA, onu düzenleyen, sıkıştıran ve ona erişimi kontrol eden yapısal proteinlerle beraber, kromatin denen bir yapı oluşturur. Ökaryotlarda kromatin genellikle nükleozomlardan oluşur, bunlar DNA üzerinde düzenli aralıklarla yer alan, DNA'nın etrafında sarılı olduğu, histon proteinlerinden oluşmuş yapılardır (Alberts ve ark., 2002).

Bir organizmadaki kalıtsal malzemenin bütününe (yani genelde, tüm kromozomlarındaki DNA dizilerinin tamamına) genom adı verilir. Haploit organizmalar her kromozomdan yalnızca bir kopyaya sahip olmalarına karşın, hayvanların çoğu ve birçok bitkinin dahil olduğu diploitlerde, her kromozomdan iki kopya ve dolayısıyla her genden iki kopya bulunur. Bir genin iki aleli, kardeş kromozomlarda aynı "lokus"larda (konumlarda) yer alır; bu alellerin her biri bir ebeveyninden (biri anneden, biri babadan) alınmıştır (Griffiths ve ark., 2000).

Genler, fonksiyonel etkilerini, genellikle hücredeki fonksiyonların çoğundan sorumlu, proteinlerin üretimiyle ifade ederler. Proteinler amino asit zincirleridir ve bir genin DNA dizisi (bir RNA aracılığıyla) bir proteinin kendine has dizisini üretmede kullanılır. Yazılım (transkripsiyon) denilen bu süreç, genin DNA dizisine karşılık gelen diziye sahip bir RNA molekülü üretmesiyle başlar. Ardından, bu mesajcı RNA molekülü translasyon denilen bir süreçle, RNA dizisindeki enformasyona karşılık gelen bir amino asit dizisi üretmede kullanılır. RNA dizisindeki her üç nükleotitlik grup bir kodon olarak adlandırılır, bu kodonların her biri proteinleri oluşturan 20 amino asitten birine karşılık gelir. RNA dizisi ile amino asitler arasındaki bu ilişkiye genetik kod adı verilir. Bu enformasyon akışı tek yönlü olur; yani enformasyon nükleotit dizilerinden proteinlerin amino asit dizisine

aktarılır, proteinden DNA dizisine aktarılmaz. Bu olgu Francis Crick tarafından “moleküler biyolojinin merkezi dogması” olarak adlandırılmıştır (Berg ve ark., 2002).

1.3. DNA Dizilemesi ve Genomik

Genetik çalışmalarında geliştirilmiş en temel teknolojilerden biri olan DNA dizilemesi, araştırmacılara DNA parçalarındaki nükleotit dizisini belirleme olanağı sağlamaktadır. DNA dizilemesi ucuzlaştıkça ve bilgisayarların da yardımıyla araştırmacılar, birçok organizmanın genomunu dizilemişlerdir. Bu teknolojiler, insan genomu için de kullanılmış, insan genomunun dizileme projesi 2003 yılında tamamlanmıştır. DNA dizileme yöntemleriyle belirlemeler sonucunda edinilen, işe yarar dizilemelerin miktarının gitgide artması, organizmaların genom bütünlerindeki araştırmalarda hesaplama aletleri ve analiz örnekleri kullanan, Genomik adlı araştırma alanını doğurmuştur (Brown, 2002). Organizmaların genomları, birçok kuşak boyunca, evrimsel süreç içerisinde değişikliğe uğrayabilirler. Mutasyonlar ve mutasyonların yararlı olanları için olan seçim sonucunda, bir canlı türünün çevresine daha uyumlu hale dönüşerek evrimine neden olabilir. Bu süreçte Adaptasyon denir. Türleşme denilen süreçle yeni türler oluşur. Türleşme genellikle, farklı popülasyonların coğrafi olarak ayrı düşmelerinin neden olduğu genetik farklılaşmadan ortaya çıkar (Gavrilets, 2003). Evrim esnasında DNA dizileri birbirinden uzaklaştığı ve değiştiği için, diziler arasındaki bu farklılıklar, aralarındaki evrimsel uzaklığı hesaplamada bir “moleküler saat” gibi kullanılabilir. Genetik kıyaslamalar genellikle, türler arasındaki evrimsel akrabalığı nitelemeye en doğru yöntem olarak kabul edilir. Bu yöntem, fenotipik kıyaslamalarla edinilmiş bazı yanıltıcı değerlendirmeleri de düzeltir. Türler arasındaki evrimsel uzaklıklar “evrim ağacı” ya da “filogenetik ağaç” denilen şemalarla temsil edilir, bu şemalar türlerin ortak bir atadan inişini ve zaman içinde türlerin birbirinden uzaklaşmalarını gösterir (Wolfe ve ark., 1987).

1.4. Bitki Sistematğinde Moleküler Gelişmeler

M.Ö.3. yüzyılda Aristo ile başlayan sistematik çalışmalar büyük ölçüde morfolojik karakter temeline dayanmaktaydı. Bu geleneksel yaklaşımlar bazı değişimlerle günümüzde de halen kullanılmaktadır. Ancak bir bitkinin tür sınırlarının tanımlanmasında sadece morfolojik verilerin yeterli olmadığı durumlar da mevcuttur (Hillis ve Moritz, 1990; Işık

ve ark., 2007). Bu durumdaki sorunları ve sistematik problemleri çözmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Sistematik problemlerin çözümündeki son gelişmeler, farklı DNA temelli belirteç sistemleriyle genotipin doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenmesi üzerinde olmuştur. Bu DNA temelli farklı analizler, pek çok sorunun çözümünde umut verici olarak görülmektedir (Crawford, 2000; Doyle ve Doyle, 1991).

Her bireyin DNA yapısı kendine özgüdür ve bu özgüllük canlının genetik yapısının moleküler genetik metotlarıyla tespit edilebilmesini sağlar. Canlıların genetik yapılarını tespit etmeye yarayan bu metotlara DNA Parmakizi (DNA Fingerprinting) yöntemleri adı verilmektedir. DNA Parmakizi analizleri sırasında canlının genetik yapısını tanımlamak amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik bileşenlere ise DNA markörü denilmektedir. Moleküler markör (genetik markör) ile; genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçası temsil edilmektedir. Son yıllarda moleküler genetik alanındaki gelişmelere paralel olarak moleküler markör (belirteç) çeşitlerinin de artması genom analizlerinde ve bitki genetiği çalışmalarında devrim niteliğinde gelişmelere yol açmıştır. DNA markörleri sayesinde farklı genotiplere ait nükleik asit diziliş farklılığı çeşitli şekillerde ortaya konulabilmektedir. Böylece tür içi ve türler arası genetik farklılıklar bireylerin DNA'larının karşılaştırılmasıyla moleküler düzeyde araştırılabilmektedir.

DNA temelli teknikler günümüzde bitkisel materyallere de uygulanmakta; bitki genetik çeşitliliği, akrabalığın tespiti, yabani formların belirlenmesi, taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, ebeveyn belirlenmesi, genetik varyasyonun belirlenmesi, genom haritalarının oluşturulması, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesi, bitki taksonlarının monofletik mi polifletik mi olduğunu belirleme, doğal taksonların ortaya çıkarılması, taksonlar arası filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, filogenetik ağaç ve kladogram hazırlama, revizyon çalışmaları, polimorfizmi belirleme, populasyon genetiği, bitki ıslahı gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır (Mullis ve ark., 1986; Williams ve ark., 1990; Welsh ve McClelland, 1990). Pek çok araştırmacı artık, familyaların sınıflandırılmasında Angiosperm filogeni grubunun moleküler verilere dayandırarak oluşturduğu sınıflandırma sistemini kullanmaya başlamıştır (Langström ve Chase, 2002).

Bitki sistematigi alanında nüklear genom, kloroplast genomu ve mitokondrial genom üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Kloroplast genomunun genel yapısal özellikleri bitki taksonomisi alanında kullanılmak üzere kapsamlı biçimde araştırılmış ve kloroplast DNA'sının taksonomik sorunların çözümünde tür, cins ve familya seviyelerinde

kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Sistematikçiler bu çalışmalar sırasında öncelikle çalıştıkları taksonomik kategorilerle ilgili temel grupların tespit edilmesini sağlamışlar daha sonra da gruplar arasındaki evrimsel ilişkileri tespit etmek amacıyla DNA sekans çalışmalarına yönelmişlerdir. (Doğan, 2007).

1.5. Sistematikte Kullanılan Belirteçler (Markörler)

Kalitatif dağılım gösteren karakterlerin kantitatif dağılım gösteren karakterlerle bağlantısı, yani gerçek anlamda belirteç anlayışı, Sax'ın (1923) fasülye tohum pigmentasyonu ile tohum iriliği arasındaki bağlantıyı gözlemlemesiyle şekillenmiştir (Sax, 1923). Bu çalışmada tohum pigmentasyonu fasülye tanesinin ağırlığını belirleyen bir belirteç olarak kullanılmıştır. Morfolojik, biyokimyasal ve DNA belirteçleri olmak üzere 3 tip belirteçten bahsedilebilir.

1.5.1. Morfolojik Belirteçler

Morfolojik özellikler; tür, çeşit ve tip tanımlanmasında kullanılmakla beraber, mevsime, ekolojik faktörlere, bitkinin yaşına göre değiştiğinden her zaman kesin sonuç vermemekte, bazı yanılgılara neden olmaktadır. Bu nedenle, morfolojik karakterlerle yapılan tanımlamalar, başka özelliklerle de desteklenmediği sürece tam ve güvenilir olmayabilir (Draper ve Cooke, 1983). Morfolojik belirteçlerin kullanım potansiyelleri uzun bir süredir bilinmesine rağmen sınırlı sayıda olmaları nedeniyle de pratikte uygulanabilirlikleri kısıtlı kalmıştır. Ayrıca bu belirteçlerle sadece dominant fenotipler (AA ve Aa) ve resesif fenotipler (aa) ayırt edilebilirler. Heterozigotları (Aa) homozigot dominantlardan (AA) ayırt edemezler. Morfolojik belirteçlerin en belirgin avantajı analizlerinin kolay olmasıdır (Yıldırım ve ark., 2001). Sonuç olarak morfolojik belirteçlerin sayılarının az olması, çevre faktörlerinden etkilenmesi ve birçoğunun mutasyonlar sonucu oluşması gibi olumsuz özellikleriyle bu belirteçlerin kullanımları sınırlı olmaktadır (Bretting ve Widrlechner 1995).

1.5.2. Biyokimyasal Belirteçler

Biyokimya alanındaki gelişmeler son 20 yılda belirteçler konusunda da yeni bir çağ açmıştır. Öncelikle birbirinden ayrılabilir formları olan enzimlerin veya depo proteinlerinin belirteç olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Depo proteinleri bir matriks üzerinde hareket ettirilip boyandığında farklı genotiplerde ortaya çıkan bant farklılıkları genetik belirteç olarak kullanılabilir. En büyük avantajları analizlerinin çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasıdır. En büyük dezavantajı ise sayıca çok az olmalarıdır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Enzim belirteçleri ise kendi arasında izoenzimler ve alloenzimler olmak üzere iki ana grupta incelenir. İzoenzimler türler arası veya nispeten uzak bitkiler arasındaki varyasyonları çalışmada oldukça yararlı olmalarına rağmen, yakın akrabalar arasındaki ilişkileri tespit için uygun değildir (Satub ve ark., 1996). Enzim belirteçlerinin en önemli avantajı analizlerinin çabuk, ucuz ve güvenilir olmasıdır. En büyük dezavantajı ise çalışılacak izoenzimlerin veya proteinlerin sayısının az olmasıdır (Van der Berg ve ark., 1983).

1.5.3. DNA Belirteçleri

Son yıllarda DNA'nın kendisinin de doğrudan belirteç olarak kullanılabileceği fikri ortaya çıkmıştır. DNA belirteçleri, farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan belirteçlerdir. DNA melezleme belirteçleri ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı DNA çoğaltım belirteçleri olmak üzere iki grupturlar. Sistemik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bu belirteçler çeşitli avantajlara sahiptir;

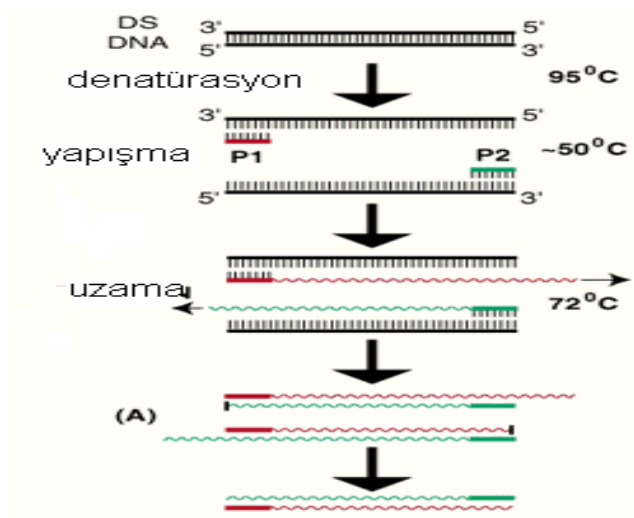
a) çevre faktörlerinden etkilenmezler, b) çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomları ayrı ayrı çalışılabilir, c) genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotrofikdir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi), d) her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini de tespit edilebilir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Bir DNA belirtecinde bulunması istenen özellikler;

1. Farklılık göstermeli (polimorfik olmalı),
2. Eşbaskın olmalı (ko-dominant olmalı),
3. Sonuçları tekrarlanabilir olmalı (güvenilir olmalı),
4. Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmemeli (nötr olmalı),
5. Otomasyona uygun ve ekonomik olmalı,
6. Genomdaki dağılımı düzenli olmalı.

1.6. Moleküler Markör Yöntemleri

Moleküler markör yöntemleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin çoğaltımındaki farklılığın saptanması amacıyla çeşitli tipteki primerlerin ve Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR) metodunun kullanımına dayanır. PCR (Polymerase Chain Reaction) ya da polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe; tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. PCR, bir çeşit "in vitro klonlama"dır. PCR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denaturation) daha sonra sentetik oligonükleotidlerin (primer) hedef DNA'ya bağlanması (annealing), sonra zincirin uzaması (extension) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR döngüsü oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. PCR'in çalışma prensibi

PCR tekniği, çok az miktarda DNA ile çalışmaya imkan sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış, birçok durumda radyoaktivite kullanımı gereksiz hale gelmiştir. PCR teknolojisi için; DNA örneği, genelde genomik DNA, çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, dNTP'ler (A,T,C,G), ısıya dayanıklı Taq DNA-Polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir.

Günümüzde genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan PCR temelli moleküler markör tekniklerinden bazıları şunlardır;

1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA = Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism = Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism = Kesilmiş Parçalar Uzunluk Polimorfizmi)
4. Mikrosatellit veya SSR (Simple Sequence Repeats = Basit Dizi Tekrarları)
5. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism = Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm)
6. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats = Ara Basit Dizi Tekrarları)
7. Mikroarray
8. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms = Tek Nükleotid Polimorfizimleri)

1.6.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA=Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD genetik polimorfizmi belirleyen PCR temelli bir tekniktir. Bu yöntemle büyük bir polimorfizm kısa zamanda ve kolayca saptanabilir (Williams ve ark., 1993). RAPD yönteminin temel prensibi; ilgili türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır (Williams ve ark., 1993; Welsh ve McClelland, 1990). Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütölür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilir (Jones ve ark., 1997).

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır (Williams ve ark., 1993; Welsh ve McClelland, 1990). En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır (Halldén, 1998). $MgCl_2$ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denaturasyon, primer karışımları (Halldén ve ark., 1996) RAPD tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR'da oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir (Weeden ve ark., 1992). RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı tekniğin özgünlüğünü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir (Halldén, 1998).

Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir. Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilir ve bu oligonükleotid özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadır (Williams ve ark., 1993; Welsh ve McClelland, 1990). Bir primerle, farklı bitkilerin genomik DNA'ları farklı olacağından oluşacak RAPD belirteçler farklı olacaktır (Glick ve Pasternak, 1998). Bu farklılık organizmaların karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. RAPD karakterlerinin sayısı ihtimal olarak sınırsızdır. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu açıdan yakın türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır (Mathieu-Daudé ve ark., 1997). Farklı araştırmacılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik problemlerin çözümünde RAPD belirteçlerin kullanımı güçlü bir şekilde savunulmaktadır (Rafalski ve ark., 1994; Halldén ve ark., 1994). Bu avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesi, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, adli tıp, klinikal teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber metodun sınırlılıkları da vardır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterozigotları teşhis etmek zordur (Mathieu-Daudé ve ark., 1997). Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren

tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden evvel yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Halldén, 1998; Tingey ve Del Tufa, 1993).

1.6.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism=Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Bu yöntemde DNA kesme endonükleazları ve PCR tekniği bir arada kullanılır. DNA EcoRI gibi 6 bp'lik tanıma sırasına sahip nadir kesim yapan ve 4 bp'lik MseI gibi tanıma sırasına sahip daha sık kesim yapan iki enzimle kesilir. Bu şekilde meydana gelen kesme parçacıklarının kesim yerlerine, adaptör olarak adlandırılan kesme enzimi için özgün sıralar takılır. Daha sonra iki şamalı PCR uygulanır. Adaptör sırasına ve bu kesim yerine komplementer ayrıca 3' ucundaki seçiciliği artırmak için ekstra bir nükleotid taşıyan +1 primer eklenir. Bu nedenle DNA şablonunda çoğaltım sadece primerin ekstra seçici bazının kesme fragmentinin buna karşılık gelen bazına komplementer olması halinde mümkündür. +1 primerin kullanılmasıyla çoğaltılan fragmentlerin sayısı teorik olarak, orijinal fragmentlerin 1/16'sı kadar azalır. Bu aşama preamplifikasyon olarak adlandırılır. Daha sonra seçici çoğaltım olarak tanımlanan 2. PCR uygulanarak primerin seçiciliği artırılır. Bu amaçla, kesim yerine adaptöre komplementer olacak ekstra iki baz içeren bir primer eklenir (+2 primer). Sayısı primerin seçici bazıyla ve nadir kesim yapan enzimin katıldığı fragmentlerin gösterilmesiyle önemli ölçüde azalan fragmentler, jel elektroforezinde ayrılırlar, röntgen filmi ya da florans boya kullanılmasıyla görünür hale getirilirler (Karslı ve ark., 2006).

AFLP tekniği ile aynı anda 30-40 allel incelenebildiği için oldukça kullanışlı bir tekniktir. AFLP tekniğinin bir diğer avantajı da DNA baz dizilim bilgisine ihtiyaç duyulmamasıdır. Ancak AFLP ve RAPD bir dominant markör olduğundan dolayı heterozigotların, homozigotlardan DNA seviyesinde tanımlanmasını sağlayamazlar. Bu durum AFLP ve RAPD yöntemlerini ko-dominant markörlerden (RFLP ve SSR markörleri gibi) daha az bilgilendirici yapar (Cömertpay, 2008).

1.6.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism=Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

DNA belirteçleri içerisinde ilk keşfedilenidir. Bu yöntemde genomik DNA, 4-6 nükleotid tanıyan restriksiyon endonükleaz enzimlerle kesilir, böylece bir tek enzimin keşbedildiği ancak farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur. Restriksiyon enzimleri (RE) DNA ekseninde belli bir nükleotid sırasını tanıyıp kesim yapar ve ikiye ayırır. Sonuçta rekombinant DNA teknolojisinde önemli yapışık uçlar veya kesik uçlar oluşur. Restriksiyon enzimlerinin kesim sonucunda oluşturduğu parçalara restriksiyon parçaları denir. DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabilir. Kesim bölgelerindeki tek bir nükleotidin bile sebep olduğu mutasyonlardan dolayı restriksiyon fragmentlerinin uzunluğundaki varyasyon saptanır.

Değişik enzimlerle muamele sonucunda farklı uzunluklarda restriksiyon parçaları oluşur ve bu parçalar jel elektroforezi yoluyla birbirlerinden ayrılabilirler. Elektroforez sonucu büyüklüklerine göre ayrılan bantlar, RFLP analizinin diğer aşamalarında kullanılmak üzere southern emdirimi metodu kullanılarak taşıyıcı bir yüzeye aktarılır ve orada sabitlenebilir. Alkali solüsyon uygulamasıyla tek eksenli hale getirilen fragmentlerden bazıları etiketli sondalarla eşleşerek görülebilir hale getirilir, eşleşmemiş sondalar yıkanarak uzaklaştırılır. Böylece bitki tür ve çeşidine özgü restriksiyon bantları belirlenir. Karşılaştırmada her DNA'ların uzunluklarında bir farklılık varsa polimorfizm elde edilir (Karlı ve ark., 2006). Aynı RE farklı sayıda bireye uygulandığında, bireylerin genetik yapıları birbirinden farklı olacağından değişik miktar ve uzunlukta parçalar oluşur. DNA parçalarında görülen bu polimorfizmin nedeni nokta mutasyonu olabileceği gibi, inversiyon, delesyon veya translokasyondan kaynaklanan büyük mutasyonlar da olabilir. Kısaca; RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA'daki kesim noktalarındaki değişimlerden faydalanılır (Güzeldag, 2007).

RFLP'nin çok önemli iki avantajı vardır. Bunlardan ilki; türler, cinsler ve hatta familyalar arasında transferleri mümkündür, böylece bir türde bir RFLP belirteci bir kez haritalandığında akraba pek çok tür için o haritalama bölgesinde potansiyel bir belirteç belirlenmiş olur. Diğer önemli avantajı ise güvenilir olmalarıdır, farklı laboratuvarlarda farklı araştırmacılar tamamen aynı sonuçları elde edebilmektedir. Ayrıca RFLP belirteçleri, heterozigot bireylerin de karakterize edilmesine olanak sağlayan eko baskon (kodominant) özelliktedir. Polimorfizmin belirlenmesi için radyoizotopların kullanılması

ve sonuçların alınmasının uzun süre alması RFLP analizlerinin en önemli dezavantajlarıdır. Ayrıca RFLP tekniği için büyük miktarlarda saf DNA gerekmektedir. Laboratuvar ve materyal masrafları da RFLP'nin kullanımı sınırlanmaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

1.6.4. Mikrosatellit veya SSR (Simple Sequence Repeats=Basit Dizi Tekrarları)

SSR'lar mikrosatellit markörleridir. Basit tekrarlı diziler veya SSR (Simple Sequence Repeats) olarak bilinen mikrosatellit DNA, moleküler markör olarak kullanılır ve bunların yüksek derecede polimorfizm gösterdiği ilk kez soya bitkisinde gösterilmiştir. SSR'lar çoğunlukla ökaryotik türlerin genomlarında ard arda tekrarlanan ikili, üçlü, dördü ve beşli nükleotid küme dizileri halindeki DNA uzantılarıdır. Örneğin (AT)_n, (GC)_n, (CA)_n, (ATT)_n ve (AGC)_n gibi. Bu tekrarlar bireyden bireye farklılıklar gösterir ve tekrar sayısı “n”deki değişimler, aynı lokusta, genotipler arasında farklı uzunlukta PCR ürünlerine yol açar (Cömertpay, 2008). Mikrosatellit polimorfizmi ya da tekrarlanma sayısındaki farklılıklar, lokusların iki tarafındaki korunmuş sıralara komplementer olan özgün primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılması ve daha sonra fragmentlerin elektroforetik ayrımı temelinde saptanabilir. Daha sonra bu fragmentler poliakrilamid jelde görünür hale getirilir (Karslı ve ark., 2006).

Mikrosatellit DNA markörleri, populasyon düzeyindeki araştırmalarda son derece kullanışlıdır. Şimdiye kadar değinilen yöntemlerden farklı olarak, bir mikrosatellit lokusun çoğaltılabilmesi için bu sıranın etrafındaki sıraların bilinmesi gerekmektedir. Mikrosatellitlerin genetik markör olarak kullanılmasındaki en zor aşama bu sıraların belirlenmesi aşamasıdır. Mikrosatellitlerde polimorfizm oranı ile sonuçların tekrarlanabilirliği çok yüksektir. Bir diğer avantajı ise kodominant markör olduğundan heterozigotlarla homozigotların ayırt edilebilmesidir. Mikrosatellitler kodominant kalıtım özelliği göstermeleri, lokusa özgü olmaları, genom içinde düzgün yayılış göstermeleri ve genom hakkında diğer moleküler markörlere göre daha fazla bilgi vermeleri yanında PCR'a dayalı bir teknik olmasından dolayı çok arzu edilen ve birçok bitki türünde kullanılan bir DNA markörüdür (Cömertpay, 2008).

1.6.5. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism=Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm)

SRAP tekniği genetik çeşitlilik analizlerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Ferriol ve ark., 2003; Budak ve ark., 2004a; Budak ve ark., 2004b; Ferriol ve ark., 2004; Ahmad ve ark., 2008). Öncül primerler genelde Guanin (G)-Sitozin (C) bakımından zengin olan ekzon bölgelerini hedef alır. Ters primerler ise Adenin (A)-Timin (T) bakımından zengin olan intronları hedef alırlar (Ferriol ve ark., 2003). Öncül primerleri (forward) 17 nükleotidlik, ters primerleri (reverse) 18 nükleotidden oluşmuştur.

Öncül primerlerin 14 nükleotidlik kısmı çekirdek dizidir ve bütün primerler için aynıdır. İlk on nükleotid dolgu diziler (filler sequences) denilen ve spesifik bir bileşimi olmayan dizilerdir. Kalan 4 nükleotid **CCGG** dizisine sahiptir. Primerin 3' ucunda ise üç nükleotidlik seçici dizi bulunur. Genbank'tan indirilen tesadüfî 20 bakteriyel suni kromozomunda yapılan inceleme sonucunda; ekzon bölgelerinde yaklaşık olarak % 66 oranında CCGG dizisine rastlanırken, intron ve promotor bölgelerinin ise genelde AT bakımından zengin bölgeler olduğu dikkati çekmiştir (Lin ve ark., 1999). Ters primerlerde aynı yapıya sahiptir. Bölge olarak intronlar hedeflenmektedir. CCGG dizisi yerine **AATT** dizisi vardır. PCR ile çoğaltılan gen bölgelerinin ürünlerinin jelde yürütülmesiyle genetik polimorfizm etkili bir biçimde ortaya konulmaktadır (Li ve Quiros, 2001).

1.6.6. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats=Ara Basit Dizi Tekrarları)

Mikrosatellitler genomda bol miktarda ve dengeli bir dağılım gösterir. ISSR teknolojisi, birbirine ters yönlü ve yakın olan mikrosatellit arası bölgelerin (100-3000 bp) PCR ile çoğaltılması esasına dayanır. Primer sekansları genelde SSR sekanslarıdır (Örn: (GACA)₄, (CAG)₆, (CAA)₆). Primerler 15-24 nükleotid uzunluğundadır (Elektroforez Teknikleri ve Uygulamaları Çalıştayı, 2009). Güvenilir bir yöntemdir ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Tür içi varyasyonu belirlemede etkili bir metottur (Zietkiewicz ve ark., 1994).

1.6.7. Mikroarray

Mikroarray tekniği sayesinde DNA baz dizileri belli olan genlerin hücredeki fonksiyonları araştırılmaktadır. Bir array, nükleik asit örneklerinin düzgün bir şekilde sıralanması ile oluşmaktadır. Bilinen ve bilinmeyen DNA örneklerinin baz eşleşmesi özelliğine göre hibridizasyonu için uygun bir ortam sağlayarak, bilinmeyen DNA'ların tanımlanabilmesi için kullanılır. Bu teknolojiye ilk olarak iki farklı koşulda tutulan iki ayrı örnekten izole edilen mRNA'lerden cDNA'lar sentezlenir. Sonra bu örneklerin biri cyanine-Cy3 ve diğeri cyanine-Cy5 boyasıyla işaretleterek iki farklı probu oluşturur. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya (dyes) olup farklı emme ve uyarılma (excitation) özelliğine sahip olmalarından dolayı iki farklı renk, kırmızı ve yeşili üretirler. Bu iki farklı boyayla etiketlenip işaretlenen ve iki farklı örnekten elde edilen cDNA'lar karıştırılır ve oligonükleotidleri veya cDNA baz dizilerini içeren ve binlerce geni ifade eden DNA mikroarrayleri hibridizasyon için kullanılır.

Daha sonra boyaların ışıkla uyarılmasıyla oluşan kırmızı ve yeşil renkteki Cy3 ve Cy5 sinyalleri array tarayıcıları yardımıyla farklı dalga boylarında okunur. İki farklı dalga boyunda elde edilen Cy3 ve Cy5 sinyallerinin oranları bir cDNA parçacığının iki farklı probdaki yoğunluğunu ifade eder. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaçla hazırlanmış bilgisayar programları kullanılır. Elde edilen bu görüntüde kırmızı renk, herhangi bir mRNA'nın prob 1'de prob 2'ye göre fazla olduğunu, sarı renk, mRNA'nın iki farklı probda da eşit miktarlarda bulunduğunu, yeşil renk ise, mRNA'nın prob 2'de prob 1'e göre daha fazla olduğunu ifade eder. Daha sonra her bir sinyalin ortalaması alındıktan sonra mikroarrayde kendiliğinden oluşabilecek sinyal çıkartılır. Her bir değer için normalizasyon işlemi farklı koşullarda ekspresyonu değişmeyen temel bir genle (housekeeping gene) veya sinyal yoğunluğu bilinen herhangi bir mRNA kullanılarak yapılır. Normalleştirilen bu veriler gen ekspresyon görüntülerinin belirlenmesinde kullanılır (Karşlı ve ark., 2006).

1.6.8. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms=Tek Nükleotid Polimorfizimleri)

İki farklı birey arasında genomda tek bir nükleotid değiştiğinde açığa çıkan DNA dizi varyasyonlarıdır (Örneğin; AAGGGCTAA'dan ATGGGCTAA'ya değişimi). SNP'lerin genomun her kısmında bulunmaları, mikroarray yöntemiyle 100'lerce SNP lokusunun (her örnek için) düşük maliyetle otomatik olarak skorlanabilmesi nedeniyle artan bir şekilde önemli markör sınıfından olmaktadır. Bu teknik mısır genotipleri arasında var olan ilişki hakkında önemli bilgilerin hızlı üretimine izin verebilmektedir (Cömertpay, 2008).

1.7. Bitki Genom Kaynakları ve Özellikleri

1.7.1. Nüklear DNA (nr DNA)

Bitki çekirdek genomu yani nüklear DNA, çok büyük bir çeşitliliğe sahiptir. Bu çeşitliliğin kaynakları arasında poliploidi, gen duplikasyonu veya silinmesi, mutasyonlar, genetik sürüklenme sayılabilir. Angiospermiler çok sayıda kromozoma sahiptirler. Diğer bitki türleri daha az sayıda kromozoma sahip olsalar dahi onların da genomları oldukça büyüktür (Bennett ve Leitch, 2003). Çiçekli bitkilerde kromozom sayısı çok değişkendir ama genelde bu durum genom büyüklüğüyle ilgili değildir. Örneğin; haploid pirinç genomunda 440 Mb (million base pairs) 12 kromozoma yayılmışken, haploid arpa genomunda 4900 Mb 7 kromozoma yayılmıştır. Sonuç olarak ortalama arpa kromozom büyüklüğü pirinç kromozom büyüklüğünün iki katıdır (Kellogg ve Bennetzen, 2004). Pek çok tohumlu bitkide kromozom sayısı ve büyüklüğü farklı olmasına rağmen kromozomlarında genel organizasyon benzerliği bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan genom dizileme çalışmalarının sonucunda bitki genlerinin oldukça sıkı kümелendiği görülmüştür. Bitki intronları genelde küçüktür ve ortalama 200 bp (baz çifti) meydana getirirler (Stam ve ark., 2002). Gen kümelerindeki gen yoğunluğu ortalama gen başına 5 kb (kilo base), *Arabidopsis thaliana* genomunda yaklaşık 4.5 kb (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000)'dir. Çiçekli bitkilerde çok etkileyici bir şekilde genom büyüklüğü oranı vardır. Haploid çekirdek başına bazı türler 50 Mb'ken bazılarında 85.000 Mb civarındadır (Bennett ve Leitch, 2003). Bu farklılığın da kromozom sayısı artışından kaynaklandığı düşünülmektedir (Wendel, 2000).

1.7.2. Mitokondrial DNA (mt DNA)

Mitokondriler, oksijenli solunum yapan ökaryotik hücrelerde bulunur. Dış ve iç zar olmak üzere iki zar ile çevrelenmiştir. Dış zar düz, iç zar ise kıvrımlı yapısı ile geniş bir yüzey oluşturmaktadır. İç zarın (krista) üzerinde elektron taşıma sistemi bulunur. Ribozom, DNA ve RNA moleküllerini barındırırlar. Bu da mitokondriyi bazı organellerden ayırır. (Anonim, 2006). Bitkiler alemindeki mitokondrial genom yapısı ve büyüklüğü çoğu ökaryottan daha fazla değişkenlik gösterir (Wolstenholme ve Fauron, 1995). Bitki mt DNA'sı yaklaşık olarak %5 oranında protein kodlayan bölgelere sahiptir. Bu proteinlerin çoğu solunumda görev alan solunum enzimlerinin alt birimi olarak görev yapar. Bu enzimler; sitokrom c-oksidad, sitokrom b-c, NADH dehidrogenaz ve ATP sentetaz'dır. Bitki mt DNA'larının diğer organizmaların mt DNA'larından başlıca farkları şunlardır;

- a) Diğer organizmalardakinden daha büyük ve çeşitlidir. En küçük angiosperm mtDNA'sı bile 200 kb'den daha büyüktür.
- b) Çok sayıda yabancı DNA dizileri bitki mitokondri genomunda bulunmaktadır. Örneğin; kloroplast DNA dizilerine rastlanılmaktadır.
- c) Kararsız ekstra kromozomal plazmidler genelde bitki mt DNA'sında bulunur.
- d) Kısa serpilmiş tekrar dizileri bulunur ve nükleotid dizileri çok yavaş şekilde değişir (Soltis ve ark., 1992).

Genomu tamamen dizilenmiş ve bitirilmiş olan model bitki *Arabidopsis thaliana* mt DNA'sı 366.924 nükleotidden meydana gelmiştir, 57 tane gen kodlar ve bu mt DNA'nın % 10'unu kaplar. İntron bölgeleri %8 civarındadır, 100 aminoasitten büyük olan açık okuma çerçeveleri (open reading frame) %10 civarındadır (Unseld ve ark., 1997).

1.7.3. Kloroplast DNA (cp DNA)

Son yıllarda moleküler biyoloji çalışmaları, bitki genetiği ve filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan diğer bir genom kaynağı da kloroplast DNA'sıdır. Kloroplastlar kendi genetik sistemlerine sahip organellerdir (Türkan, 2007). Yapı olarak prokaryotların (Örnek; bakteri) genomuna benzer ve kendilerine ait ribozomları vardır. Mendel kalıtımı yerine sitoplazmik kalıtım gösterirler. Organelde DNA replikasyonu yapıldıktan sonra, replike edilen DNA yeni oluşan oğul organelle aktarılır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Kloroplast DNA'sı 1960'lı yıllarda çekirdek DNA'sından farklı özelliklere sahip bir molekül olarak ortaya çıkarılmıştır. Kloroplastlar her organelde kopya sayıları farklı olan halkasal bir DNA molekülüne sahiptirler. Kloroplast genomu 120-160 kb uzunluğunda yaklaşık 120 gen içermektedir. Kloroplast 4000 protein içerir ve bunlardan 100'ü kloroplast genomu tarafından, geri kalanı ise çekirdek genomu tarafından kodlanır (Türkan, 2007).

Aynı organizmanın nr DNA'sı ile cp DNA'sı karşılaştırıldığında farklı baz kompozisyonu ve yoğunluğuna sahip oldukları görülmektedir (Dilsiz, 2004). cp DNA, nr DNA'ya göre daha düşük mutasyon oranına sahiptir. Kalıtım biçimi maternal kalıttır. Yani tek ebeveyninden (anneden) gelen kalıtım şekli olmasından dolayı genetik çeşitlilik ve evrim çalışmalarında kullanılmaya oldukça uygundur. Kloroplast DNA'sının gen düzeni ve genom boyutu çok iyi bir şekilde korunmuştur. Bu organel genomunun korunmuş olması pek çok bitkide kodlanmayan bölgeleri amplifiye etmek için kullanılan, evrensel primer çiftlerinin tasarlanmasına olanak sağlamıştır (Taberlet ve ark., 1991).

cp DNA'sının boyutu mitokondri DNA'sınınkinden daha büyüktür. Bu boyut farklılığı; kloroplastlarda mitokondrilere göre taşınan gen sayısının fazlalığı, genler arasında ve içinde oldukça uzun kodlama yapmayan nükleotit dizilerini taşıması ve DNA dizisinde duplikasyonlu bölgeleri içermesi ile açıklanabilir. Bitkiler arasında bu kodlama yapmayan dizilerin miktarlarında da farklılık bulunmaktadır. Bu da endosimbiyotik kuramı destekleyen ve ilkel ökaryotik hücrenin başlangıçta fotosentez mekanizmasına sahip bir siyanobakteri tarafından istila edilmesini takiben zamanla organel olma yolunda geçirdiği değişimin bir kanıtıdır.

cp DNA'sının kodladığı sayısız gen ürünü organel içindeki protein sürecinde işlev yapar. Düşük organizasyon seviyesindeki biryofitlerden yüksek organizasyonlu bitkiler kadar çeşitli bitkilerin cp DNA'sı birbirinden farklı sayıda gen ürünlerini kodlayabilmektedir. Genelleme yapacak olursak cp DNA'sı üzerinde bulunan genler transkripsiyonda görevli olan RNA polimeraz enziminin alt ünitelerinin, translasyonda görevli olan tRNA'ların tümünün, kloroplast ribozomlarına özgün birçok ribozomal proteinin ve 4.5S, 5S, 16S ve 23S rRNA'ların (iki set halinde) şifrelenmesinden sorumludurlar. Diğer kloroplast genleri fotosentetik işleve özgüdür. Bunlardan bazıları fotosentezin ışık bağımlı reaksiyonlarına birlik oluşturan protein tabiatlı hücresel bileşenleri şifreler. Söz konusu genlerdeki mutasyonlar fotosentezi inaktive edebilirler (Dilsiz, 2004). Kloroplast DNA'nın intron ve genler arası kesim bölgeleri gibi

kodlanmayan kısımları, kodlanan kısımlarına göre değişime daha yatkındır, hem nükleotid değişimlerinde hem de insersiyon ve delesyon (indels) yığılmalarında gözlemlendiği gibi (Xu ve ark., 2000). Zira bu kodlanmayan bölgelerin bilgi karakter potansiyelinin kodlanan bölgelere göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur, bu nedenledir ki onlar, taksonlar arası filogenetik çalışmalarda daha popüler bir yer alırlar (Downie ve ark., 2000).

Kloroplast Genomu

Genetik Sisteminde Yer Alan Genler		Fotosentez İçin Gerekli Genler	
r-RNA (23S,16S,5S,4.5S)	4	Fotosistem I	5
t-RNA	30	Fotosistem II	12
Ribozomal proteinler	21	Sitokrom bf kompleksi	4
RNA polimeraz alt birimleri	4	ATP sentaz	6
		Ribulobifosfat karboksilaz	1

Son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde bazı bitkilerin kloroplast genomu tamamlanmıştır. Kloroplast genomu tamamlanmış bazı bitkiler;

- Çeltik (1989),
- Mısır (1995),
- *Arabidopsis* (1999),
- Buğday (2000),
- Nilüfer (2001),
- *Medicago truncatula* (2001),
- Soya fasülyesi (2006),
- Domates (2006) (Türkan, 2007).

1.7.3.1. Kloroplast DNA'nın Transfer Ribonükleik Asit Bölgesi

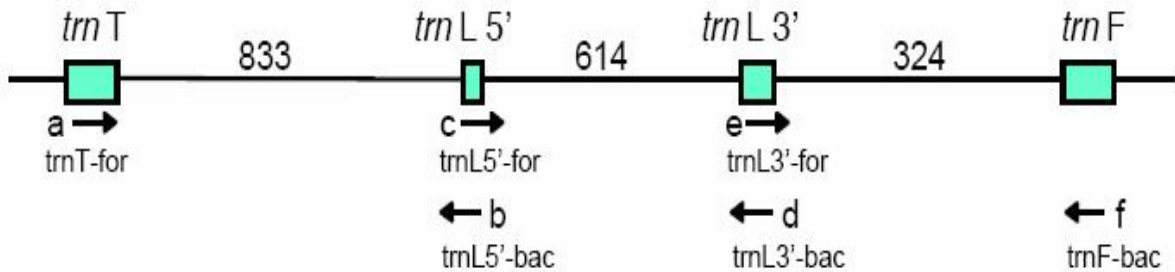
Kloroplast DNA sekans varyasyonları filogenetik çalışmalarda geniş ölçüde kullanılmaktadır (Palmer ve ark., 1988; Learn ve ark., 1992). Kloroplast DNA'nın kodlanmayan bölge mutasyonları evrimsel akrabalık analizlerinde en sık ve en etkili kullanılan kısımlarını ifade eder (Taberlet ve ark., 1991). Bu kodlanmayan bölgelerden biri

olan; *trnT-trnF* bölgesi familya altı kategorilerinin filogenetik akrabalıklarını belirlemekte geniş ölçüde kullanıldığından dolayı en kapsamlı olarak çalışılmış cp DNA kısmıdır (Taberlet ve ark., 1991; Kelchner 2000). *trnT-F* bölgesi yüksek ölçüde korunmuş üç adet transfer RNA genlerinin birlikte bulunduğu kloroplast genomunun geniş tek kopya bölgesinde bulunur. (Tarıkahya, 2009). Bu kısım *trnL* (UAA) geninden ve her iki yanında yer alan intergenik kesici bölgelerinden (IGS) oluşur (*trnT-L* ve *trnL-F*). *trnL* geni yükek oranda korunmuş iki ekzon içerir; bu ekzonlar grup I intron tarafından ayrılır. Bu ayrılmada her iki yanda bulunan kısımlar oldukça korunumlu iken merkezi kısım büyük ölçüde değişkendir (Bakker ve ark., 2000). Bununla beraber *trnT-trnF* bölgeleri (Şekil 1.2) çoğu bitki grubunda değişiklik göstermektedir (Bayer ve Star, 1998; Bakker ve ark., 2000; Mansion ve Struwe, 2004). Bazı yarı parazit bitkilerde *trnL* intronu hatta tüm *trnL* gen bölgesi yoktur ve bulunanlarda da *trnT-L* ile *trnL-F* intergenik kesici bölgelerinde (IGS) çok yüksek sekans sapmaları ve büyük ölçüde delesyonlar görülür (dePamphilis ve ark., 1997; Freyer ve ark., 1995; Lohan ve Wolfe, 1998).

trnT (UGU) ve *trnF* bölgeleri arasındaki kısım özellikle evrimsel çalışmalarda kullanılmaya şu nedenlerle de oldukça uygundur;

1. korunmuş *trn* genleri ve kodlanmayan bölgelerin yüzlerce baz çiftini içermesi,
2. tek kopya bölgelerindeki mutasyon oranının yüksek olması,
3. türler arasında genlerin yeniden düzenlenmesinde gen kaybı olması.

(Wolfe ve ark., 1987)



Şekil 1.2. Kloroplast DNA'nın *trn* bölgesi (Taberlet ve ark., 1991)

1.7.4. Bitki Genomları İle İlgili Bazı Çalışmalar

Diospyros (Ebenaceae) cinsinin 7 türüne ait 29 genotiple yapılan bir çalışmada 10 tane evrensel kloroplast primeri kullanılmış, elde edilen PCR ürünleri yedi restriksiyon (kesici) enzimi yardımıyla kesilmiş ve ürünler agaroz jelde yürütülmüştür. Yaklaşık olarak kloroplast genomunun %12.6'sının çoğaltıldığı çalışmada oluşan 267 parçadan 124 tanesinde polimorfizm olduğu saptanmıştır (Hu ve ark., 2008).

96 farklı lokaliteden alınan Çavdar (*Secale cereale*) (Poaceae) organel genomunun analiz edildiği bir çalışmada; 7 kloroplast DNA'sı ve 4 mitokondri DNA'sının kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri evrensel kloroplast ve mitokondri DNA primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan her bir parça 13 farklı restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve mitokondrial gen bölgelerinin benzerlik oranı 0.60, kloroplast gen bölgelerinin benzerlik oranı ise 0.39 olarak bulunmuştur (Işık ve ark., 2007).

53 farklı *Buchloe dactyloides* (Poaceae) genotipinde kromozom sayılarının incelendiği bir çalışmada 34 adet SRAP primer çifti kullanılarak yapılan PCR çalışmasında toplam 243 DNA bandı elde edilmiş ve bu bantlardan 231 tanesinin (%95) polimorfik olduğu bildirilmiştir. Daha sonra elde edilen DNA bantlarının 1-0 şeklinde değerlendirilmesi ile oluşturulan dendogram sayesinde genetik benzerlik matrisi ve bu sonucun ekolojik dağılımla olan ilişkisi ortaya konulmuştur (Budak ve ark., 2004b).

40 farklı genotipteki bezelye (*Pisum sativum*) (Fabaceae) türü kullanılarak yapılan bir çalışma, 15 farklı SRAP primerleriyle gerçekleştirilmiş ve bu primerlerden temiz bantlar veren 7 tanesi seçilip PCR işleminin sonucunda 162 polimorfik bant elde edilmiştir. Bantlar 1-0 şeklinde değerlendirilerek gerekli analizler yapılmış ve Euclidean uzaklık matrisi kullanılarak dendogram oluşturulmuştur (Esposito ve ark., 2007).

Houttuynia cinsine ait iki türün (*H. emeiensis* ve *H. cordata*) (Saururaceae) farklı popülasyonlarından toplanan 70 bitki örneği üzerinde PCR-RFLP tekniği kullanılarak türler ve bireyler arasındaki organel genomu çeşitliliğinin incelendiği bir çalışmada; DNA analizlerinden sonra, mitokondrial DNA ve kloroplast DNA'lara özel 7 primer kullanılarak PCR ürünleri elde edilmiş, daha sonra HinfI, Hin6I, BsuRI veya RsaI restriksiyon enzimleri kullanılarak bu PCR ürünleri kesilip, %3'lük agaroz jelde yürütülmüştür. Sonuçta 90 tane DNA bantı elde edilmiş ve bunlardan 31 tanesinin polimorfik (%34.44) olduğu bildirilmiştir. Çalışma sırasında kullanılan primer-enzim

kombinasyonlarından 4 tanesi kloroplast genomunda, 1 tanesi de mitokondri genomunda polimorfizmin belirlenmesini sağlamıştır (Wei ve ark., 2005).

7 yabancı *Triticum* ve *Aegilops* (Poaceae) türünün kullanıldığı PCR-RFLP çalışmasında, kloroplast DNA'ya ait olan *rbcL* ve *psaI* gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmış, ardından da *HpaII*, *AluI*, *HincII*, *AvaIII*, *NdeI* ve *HaeIII* kesici enzimleri kullanılarak kesilmiştir. *T. urartu* ve *T. monococcum* var. *boeoticum* türlerinin dendrogramda çalışılan diğer türlerden ayrıldığı ve genetik mesafe açısından da diğer türlerden uzak oldukları tespit edilmiştir (Ünlü ve Sümer, 2005).

Buchloe dactyloides (Poaceae) bitkisinin 56 farklı genotipiyle yapılan çalışmada; 6 tane cp DNA ve 3 tane mt DNA primeri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve PCR ürünleri sayısı 2 ile 6 arasında değişen restriksiyon enzimleriyle kesilip agaroz jelde yürütülmüştür. UPGMA metodu kullanılarak elde edilen dendrogramda genotiplerin sadece %16'sının farklı olduğu, geriye kalan genotiplerin ise farklı biyocoğrafik bölgelere ait olmalarına rağmen benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Şeker pancarı (*Beta vulgaris*) (Amaranthaceae) üzerinde mikrosatellit ve PCR-RFLP metodları uygulanarak yapılan çalışma esnasında; kloroplast genomuna ait *psbE* bölgesine özel primer kullanılarak PCR aşaması gerçekleştirilmiş ve PCR ürünleri *HindIII* enzimi yardımıyla kesilip, ürünler %0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Ancak kloroplast genomunun çok fazla genetik çeşitlilik göstermediği tespit edilmiştir (Fenart ve ark., 2008).

40 *Elymus*, 12 *Agropyron*, 7 *Leymus*, 4 *Hordelymus* ve dış grup olarak kullanılan 1 *Brachypodium* (Poaceae) olmak üzere 64 Triticeae örneğinde nüklear ribozomal DNA'nın iç transkripsiyonu aralayıcı (ITS) bölgesinin dizi çeşitliliği çalışılmış ve elde edilen veri analizleri, çalışılan cinsler içerisinde en fazla çeşitliliğin *Elymus* cinsi içerisinde varolduğunu göstermiştir (Dizkırıcı ve ark., 2010).

Bermuda otunun (*Cynodon* sp.) (Poaceae) genetik çeşitliliğin araştırıldığı bir çalışmada; 31 farklı genotipteki bermuda otu içindeki akrabalık ilişkisini belirlemek amacıyla 15 AFLP, 10 kloroplast SSRLP, 10 RAPD ve 10 tane de direk DNA'nın minisatellit bölgesini çoğaltacak (DAMD) primer veya primer çiftleri kullanılmış, elde edilen 2000 replikasyon UPGMA ve bootstrap analizleri ile değerlendirilmiş ve bermuda otu genotiplerindeki genetik benzerlik (GS) oranının 0.608 ile 0.977 arasında olduğu belirlenmiştir (Karaca ve ark., 2002).

Kuzeydoğu Tibet Qilian Dağları'nda bulunan endemik *Coelonema draboides* ile akraba cins *Draba* (Brassicaceae)'nın 30 türü arasındaki akrabalık ilişkisinin düzeyini belirlemek için nüklear ribozomal DNA'nın ITS bölgesi ile kloroplast DNA'nın *trnL* bölgesi kullanılmış ve çalışma sonunda elde edilen bulgularla bu iki cinsin monofiletik bir grup olduğu büyük ölçüde desteklenmiştir (Chen ve ark., 2010).

Güney Tunus'da yaygın yetişen tıbbi ve aromatik bir bitki olup, çok eski yıllardan beri sebze, baharat ve bitkisel ilaç olarak kullanılan pembe sarımsak (*Allium roseum* L.) (Amaryllidaceae) populasyonlarındaki genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla, 24 farklı populasyona ait 75 bireyin kloroplast DNA'larının 3 farklı parçasının (rpL32-*trnL* ve rps4-*trnT* intergenik kesici bölgeleri ve kodlanmayan psbM-*trnD*^{GUC} bölgesi) sekans diziliminden yararlanılmış ve çalışma esnasında, 9 haplotipe dayanan 7 polimorfik dizi ve 1 tane de insersiyon / delesyon tespit edildiğinden; populasyon içi haplotip ve nükleotit çeşitliliğin düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Guetat ve ark., 2010).

Tohum yağı biyodizel kaynağı olarak umut vadeden bir bitki olan *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae)'ın kloroplast genomunun tüm sekansını ve organizasyonunu belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada; bu bitkinin cp DNA'sının halkasal bir molekül olup 163,856 baz çifti uzunluğunda olduğu ve 110 farklı gen kodladığı (78 protein, 4 rRNA ve 28 farklı tRNA), aynı zamanda genom organizasyonu ve düzeninin angiospermilerin genomuyla benzer olduğu bildirilmiştir (Asif ve ark., 2010).

1.8. Hypericaceae Juss. Familyası İle İlgili Genel Bilgiler

Hypericaceae familyası 16000'den fazla türe sahip oldukça fazla çeşitlilik gösteren Malpighiales ordosuna ait bir familyadır (Wurdack ve Davis, 2009). Bu ordo tropikal yağmur ormanlarında yer alan çalı ve küçük ağaç türlerinin büyük bir yüzdesini içerir. Malpighiales ordosunun büyük çoğunluğu tropikal iklimle sınırlı iken, Violaceae, Salicaceae ve *Hypericum* gibi üyeleri tropik olmayan yerlerde de yaşamaya uyum sağlamıştır (Donoghue, 2008).

Dünyada taksonomik olarak 9 cins ile temsil edilen Hypericaceae familyasının içerdiği cinsler; *Cratoxylum* Blume, *Eliea* Cambess., *Harungana* Lamarck, *Hypericum* L., *Lianthus* N. Robson, *Santomasia* N. Robson, *Thornea* Breedlove & McClintock, *Triadenum* Rafinesque ve *Vismia* Vand. (Crockett ve Robson, 2011)'dir. Linne'nin zamanından beri

birçok taksonomist tarafından *Hypericum* cinsi yakın akrabaları ile birlikte Hypericaceae familyasının içine mi konulmalı veya Guttiferae familyasının Hypericoideae alt familyasında mı olmalı konusundaki tartışmalar üzerinde henüz bir görüş birliğine varılamamış (Crockett ve Robson, 2011) olsa da, ülkemizde bu familyanın tek temsilcisi *Hypericum* cinsidir (Davis ve ark., 1967). Bu familyanın sahip olduğu ortalama %80 çeşitlilik bu cinsden kaynaklanır (Crockett ve Robson, 2011). *Hypericum* cinsi içindeki bu çeşitlilikten dolayı Hypericaceae familyasını da içeren filogenetik ağaçlarda dengesiz bir dağılım söz konusu olabilir (Vamosi ve Vamosi, 2011).

Malpighiales ordosu ile ilgili yapılmış kemotaksonomik bir çalışmada; ksanton ve bazı flavonoid bileşenleri bulundurmalarından dolayı Hypericaceae, Calophyllaceae, Clusiaceae, Podostemaceae ve Bonnetiaceae familyalarının Malpighiales ordosunun diğer üyelerinden ayrıldığı ve bu durumun Wurdack ve Davis'in 2009 yılında yaptığı moleküler tabanlı çalışmayla da uygunluk gösterdiği rapor edilmiştir (Crockett ve Robson, 2011). Hypericaceae familyasının *Hypericum* dışında kalan diğer cinsleri hakkında çok fazla fitokimyasal çalışma bulunmadığından bu cinsler için yeterli bilgi de mevcut değildir, fakat *Harungana madagascariensis* bunlardan farklı olarak bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlarda geleneksel olarak kullanılan tıbbi bir bitki olmasından dolayı kimyasal olarak da daha fazla araştırılmıştır (Linuma ve ark., 1995, 1996; Kounam ve ark., 2005).

Hypericaceae familyasında soluk renkli glandlar üç alt familyada gözlenirken, koyu renkli glandlar daha çok Vismioideae ve Hypericoideae alt familyalarının üyelerinde bulunmakla birlikte aynı zamanda *Cratoxylum* (Cratoxylideae) cinsinde de mevcuttur. Naftodiantron grubundan Hypericin maddesinin şu ana kadar sadece *Hypericum* cinsinin çiçekli türlerinde mevcut olduğu belirlenmiş iken, koyu renkli glanda sahip *Marila* ve *Mammea* (Calophyllaceae) cinslerinde de Hypericin maddesinin olduğu düşünülmekle birlikte şu ana kadar yapılan izolasyon çalışmaları bu durumu onaylacak nitelikte değildir (Stevens, 2007).

Hypericum cinsinin ait olduğu Hypericaceae familyası Türkiye Florası'nda 1 cins ve yaklaşık 113 civarında taksonla temsil edilmektedir. Yurdumuzdaki türlerden %41.9'u endemiktir. Yapraklar basit ve karşılıklı, nadiren daireseldir. Sepal 5, tomurcuklar imbrikat pullu, petal 5 serbest, stamenler demet halinde veya açıkça belirsiz, ovaryum üst durumlu pariyetal veya aksillar plasentalanma gösterir, tohumlar endosperm içermez (Davis ve ark., 1967).

1.8.1. Hypericaceae Familyasının Filogenisi

Hypericaceae familyasının yanısıra, talloid sucul Podostemataceae, yarı parazit Rafflesiaceae, amentum çiçek durumuna sahip rüzgarla tozlaşan Salicaceae, kaktüs benzeri sukkulent Euphorbiaceae gibi familyaları da barındıran Malpighiales ordosu için son yıllarda yapılan moleküler filogenetik analizler şu hipotezleri destekler niteliktedir;

a) *Hypericum* cinsini içeren Hypericaceae familyası Guttiferae'nın diğer üyelerinden oldukça farklı bir familyadır,

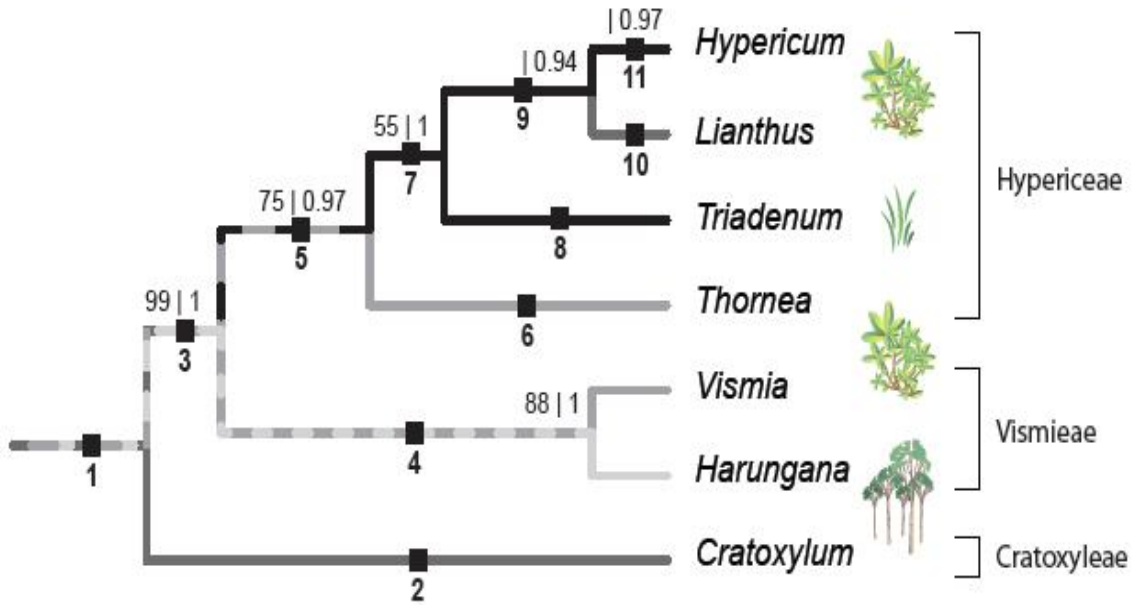
b) Hemen hemen bütün üyeleri talloid sucul olan Podostemaceae familyası ile Hypericaceae familyası kardeş familyalardır,

c) Hypericaceae-Podostemaceae kardeş familyaları eskiden Guttiferae'nın Kielmeyeroideae alt familyası olan ve yeni literatürlere Calophyllaceae olarak geçen familyayla da kardeşirler,

d) Guttiferae'nın diğer üyeleri ve Bonnetiaceae esas olarak daha geniş bir tabanda birleşirler (Korotkova ve ark., 2009).

Malpighiales ordosu içindeki filogenetik akrabalık ilişkilerini belirlemek üzere, kloroplast, mitokondri ve nükleer DNA'nın 13 gen bölgesi ile totalde 15.604 baz çiftinin ele alındığı çalışmada; DNA sekans dataları Maximum Likelihood, Bayesian ve Parsimony analizleri kullanılarak değerlendirilmiş ve Şekil 1.3'de verilen filogenetik ağaç elde edilmiştir. *Hypericum* cinsini içeren Hypericaceae familyası bu ağaçta da görüldüğü gibi Podostemaceae, Calophyllaceae, Bonnetiaceae ve Clusiaceae familyaları ile oldukça yakınlık gösteren kardeş bir familyadır (Wurdack ve Davis, 2009).

Hypericaceae familyasının cinsleri arasındaki akrabalık ilişkisini belirlemek amacıyla Stevens (2007) tarafından yapılmış sınıflandırmaya göre; monotipik bir cins olan *Santomasia*'nın *Hypericum* cinsi içinde, *Vismia* ve *Harungana* cinslerinin birbirine oldukça yakın, *Thornea* ve *Triadenum* cinslerinin birbirine yakın olup, *Lianthus* cinsinin ise *Hypericum* ile kardeş olduğu Şekil 1.4'de gösterilmiştir. Wurdack ve Davis'in 2009 yılındaki moleküler tabanlı çalışmalarının analiz sonuçları da Stevens'in sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. *Hypericum* cinsi türlerinin büyük çoğunluğu ve ona en yakın akraba cinsler *Lianthus* ve *Santomasia* kapsül şeklinde meyveye ve sarı-turuncu petallere sahiptir. Bu cinsler interstaminal verimsiz stamen demetinin olmayışı ile Hypericaceae familyasının diğer cinslerinden ayrılırlar. Bu özellik Hypericoideae'nin diğer üyelerinde (*Thornea* ve *Triadenum*), Cratoxyloideae alt familyası (*Eliea* ve *Cratoxylum*) ve Vismioideae alt familyası üyelerinde (*Vismia* ve *Harungana*) mevcuttur (Robson, 1977; 1981).



Şekil 1.4. Hypericaceae familyasının cinslerine ait filogenetik ağaç (Stevens, 2007)

1.9. *Hypericum* L. Cinsi İle İlgili Genel Bilgiler

Malpighiales ordosuna ait Hypericaceae familyasının 9 cinsinden biri de *Hypericum*'dur. Robson'un 1977 yılında *Hypericum* cinsi ile ilgili yaptığı monograf çalışmasında, bu cinsin 591 taksona sahip olduğu (457 tür, 70 alttür, 13 varyete, 11 forma ve 40 hybrid) belirtilmiştir.

Hypericum cinsi tüm kuzey yarımkürede, güney Amerika'nın And Dağları'nda, tropikal ve güney Afrika'da, Madagaskar'da, güneydoğu Asya'da yayılış göstermekle birlikte birkaç türü de Avusturalya ve Okyanusya'da bulunmaktadır. *Hypericum* cinsi içindeki çeşitliliğin ana merkezi Palearktik alanlar olup türlerin %45'den fazlası bu alanlarda doğal olarak bulunurken, çeşitliliğin ikinci merkezi olan Neotropik alanlarda ise türlerin %30'u mevcuttur. Hindistan-Malezya, Nearktik ve Afrotropik bölgelerde ise çeşitliliğin çok daha az olduğu tespit edilmiştir.

Hypericum cinsi tropikal bölgelerde yüksek dağları habitat edinen bir cins olup, bu cinsin ekvatoryal kökenli olan türlerinin evrimsel açıdan cins içindeki diğer türlere göre daha eski olduğu tahmininde bulunan Robson (1977), *Hypericum*'un Gondwanan (Orta Afrika) kökenli olduğu hipotezini ortaya koymuştur. Bu cinse çok yakın akraba olan cinslerin (*Thornea*, *Vismia*, *Harungana*, *Cratoxylum* ve *Eliea*) de tropikal flora elementi olduğu dikkate alındığında Robson'un hipotezinin akla ve mantığa uygunluğu artmıştır (Nürk, 2011).

Sarı petal rengi *Hypericum* cinsi için karakteristik olup, cinsin sınırlarını belirlemede kullanılır (Robson, 1977). Petal rengi *Lianthus* cinsinde beyaz, *Triadenum* cinsinde pembe-mor veya beyaz, *Thornea* cinsinde pembe veya pembe-beyaz, fakat *Santomasia* cinsinde sarıdır (Stevens, 2007). *Hypericum* cinsi içinde bazı modifikasyonlar da sözkonusudur. Çok nadir de olsa Tayvan ve Filipinler'deki *H. geminiflorum* ve Türkiye'deki *H. albiflorum* gibi türlerde saf beyaz renk gözlenmiştir. İçerdikleri antosiyanin renk maddesinden dolayı *H. revolutum* türünde kırmızı noktalı çiçekler, Türkiye ve Suriye'de bulunan *H. capitatum* var. *capitatum* türünde ise koyu kırmızı çiçekler bulunduğu Robson 1981'de belirtilmiştir.

Hypericum cinsinde belirlenmiş iki tip gland mevcuttur, bunlardan biri siyahtan kırmızıya kadar renklenmiş "koyu" (dark), diğeri ise amber renkli "soluk" (pale) gland tipidir. Koyu renkli glanda sahip olanlar naftodiantron grubundan Hypericin veya Pseudohypericin maddesini salgılayan, amber renkli glanda sahip olanlar uçucu yağ

bileşenlerini ve floroglusinol türevlerini (örneğin; Hyperforin) salgırlar. Bu glandlar yaprakların, sepallerin veya petallerin üzerinde intermarjinal ya da laminar olarak bulunurlar (Crockett ve Robson, 2011). Hyperisin ve pseudohyperisin gibi maddelerden dolayı cins üzerindeki çalışmalar, antibakteriyel, antimikrobiyal, antidepresan ve antioksidan aktivitesi üzerine yoğunlaşmış olup, aynı zamanda cinsin uçucu yağıyla ilgili de pek çok çalışma yapılmıştır (Bağcı ve Yüce, 2010a; Bağcı ve Yüce, 2010b). Cins, içerdği uçucu yağları nedeniyle potansiyel tat ve koku endüstrisinde de önemli bir hammadde kaynağı olmuştur.

Türkiye’ de yöresel olarak Binbirdelik otu, Kan otu, Kılıç otu, Mayasıl otu, Yara otu, Kuzu kıran ve İngilizcede St. John’s wort adıyla bilinen *Hypericum perforatum* L., Hypericaceae familyasına dahil ve Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Amerika Birleşik Devletleri’nde yetişen çok yıllık önemli bir bitkidir. Geleneksel tıpta antidepresan bir bitki olarak kullanılmaktadır (Merck Index, 2003). Çeşitli Avrupa ülkelerinde fitoterapi sahasında yaygın bir şekilde kullanımı sözkonusudur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *H. perforatum* ve diğer türlerden elde edilen uçucu yağlar ve ekstraktlarının antiviral, antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, yara iyileşmesi, anksiyolitik ve antikonvülsan aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır (Rocha ve ark., 1995; Vandenberghe ve ark., 2000; S’anchez-Mateo ve ark., 2002; Butterweck ve ark., 2003; Çakır ve ark., 2005; Gibbons ve ark., 2005; Hosseinzadeh ve ark., 2005; Po Shiu ve Gibbons, 2006).

Bazı *Hypericum* türlerinin sinir yaralanmalarında ve her türlü sinirsel şikayette, çarpma sonucu yaralanmalarda ve ağır kaldırma sonucu ortaya çıkan rahatsızlıklarda kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca bu bitkinin yağı; ağrı kesici, iltihap önleyici ve iyileştirici özellikleriyle, en iyi yara yağıdır. Yalnızca açık yaralarda, yeni yaralanmalarda, hematomlarda (deride mavi-mor lekeler), beze şişkinliklerinde, güneş yanıklarında ve pürüzlü ciltlerde bakım toniği olarak kullanılmakla kalmayıp, uçuklar (herpes), varisli damarlar, basurlar, sırt ağrıları, siyatik, mafsallık (eklem) iltihabı, romatizma ve felçli-inmeli bölgelerde de etkili bir friksiyon (ovarak sürme) yağı olarak da kullanılabilir (<http://www.bitkisel.tedavi.com>).

Robson 1981 yayınında, cins içindeki kromozom sayısının sabit olmadığı “n” olarak ifade edilen koromozom setinin genelde 12-7 arasında değişirken bazı türlerde de 6 olduğu belirtilmiştir (*H. setosum* ve *H. cumulicola* gibi). Genelde çalimsı görüntüde olanların n=9 ve n=10 olduğu rapor edilirken, otsu formda olanların n=7 ve n=8 olduğu belirlenmiştir.

Cins içinde diploit bireylerin yanı sıra, tetraploit hatta hekzaploit bireylerin mevcut olduğu da tespit edilmiştir (Robson 1981).

Robson 1977 yılında yaptığı *Hypericum* cinsinin monograf çalışmasında, cinsi 30 seksiyona ayırmış ve daha sonra farklı yıllarda yaptığı çalışmalarla tür tanımlamaları için eklediği karakterler sayesinde seksiyon sayısı 36'ya yükselmiştir (Carine ve Christenhusz, 2010).

Seksiyon 1. *Campylosporus* (Spach) R. Keller

Seksiyon 2. *Psorophytum* (Spach) Nyman

Seksiyon 3. *Ascyreia* Choisy

Seksiyon 4. *Takasagoya* (Y. Kimura) N. Robson

Seksiyon 5. *Androsaemum* (Duhamel) Godron

Seksiyon 6. *Inodora* Stef.

Seksiyon 7. *Umbraculoides* N. Robson

Seksiyon 8. *Roscyna* (Spach) R. Keller

Seksiyon 9. *Bupleuroides* Stef.

Seksiyon 10. *Hypericum* L.

Seksiyon 11. *Concinna* N. Robson

Seksiyon 12. *Graveolentia* N. Robson

Seksiyon 13. *Sampsonia* N. Robson

Seksiyon 14. *Elodeoida* N. Robson

Seksiyon 15. *Monanthema* N. Robson

Seksiyon 16. *Olympia* (Spach) Nyman

Seksiyon 17. *Campylopus* Boiss.

Seksiyon 18. *Origanifolia* Stef.

Seksiyon 19. *Drosocarpium* Spach

Seksiyon 20. *Oligostema* (Boiss.) Stef.

Seksiyon 21. *Thasia* Boiss.

Seksiyon 22. *Crossophyllum* Spach

Seksiyon 23. *Hirtella* Stef.

Seksiyon 24. *Taeniocarpium* Jaub. & Spach

Seksiyon 25. *Coridium* Spach

Seksiyon 26. *Myriandra* (Spach) R. Keller

- Seksiyon 27. *Webbia* (Spach) R. Keller
Seksiyon 28. *Arthrophyllum* Jaub. & Spach
Seksiyon 29. *Triadenioides* Jaub. & Spach
Seksiyon 30. *Heterophylla* N. Robson
Seksiyon 31. *Adenotrias* (Jaub. & Spach) R. Keller
Seksiyon 32. *Humifusoideum* R. Keller
Seksiyon 33. *Adenosepalum* Spach
Seksiyon 34. *Elodes* (Adans.) W. Koch
Seksiyon 35. *Brathys* (Mutix ex. L. f.) Choisy
Seksiyon 36. *Trigynobrathys* (Y. Kimura) N. Robson

Cinsin seksiyon ayrımı şu karakterler dikkate alınarak yapılmıştır (Robson, 1977);

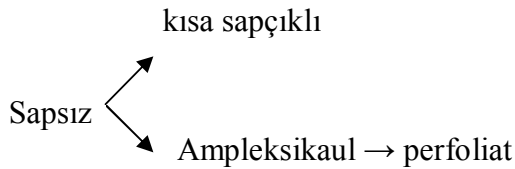
Habit : Ağaçlar → Çalılar → Çok yıllık otsu bitkiler → Tek yıllık otsu bitkiler

İndumentum : Yok → var (bazı bağımsız oluşumlar)

Guddeler : Genel olarak iki tip vardır; (i) tanen, bal mumları veya reçineler içeren salgı hücreleriyle schizogenous (ortasından bölünerek üreyen) cepler (oyuklar), bunlar solgun veya yarı şeffaf noktalar, çizgiler olarak tanımlanır; (ii) oyukları olmayan salgı hücrelerinin kütlesi, mumlu bir madde ve çoğunlukla hiperisin içerirler ve kehribar- kırmızı veya siyah (veya bazen sadece koyu) noktalar veya çizgiler olarak tanımlanır.

Gövde : Boyuna dört çizgili → iki çizgili → silindirik

Yapraklar :



Düşücü → Kalıcı

Karşılıklı → 3 halkalı → 4 halkalı

Damarlanma paralel → ağsı

Sepaller

Eşit olmayan → eşit

Kenarı düz → dişli → silli → saçaklı

Petaller

Kalıcı → düşücü (bir kaç bağımsız oluşum)

Asimetrik → simetrik

Periant

5-parçalı → 4-parçalı (iki bağımsız oluşum)

Stamen demetleri

5 → 4

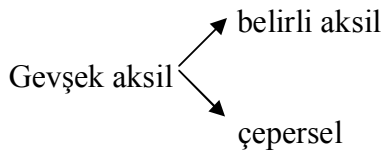
Tek → çeşitli şekillerde kümeli [2+1+1+1, 2+2+1, (5), (4)]

Kalıcı → düşücü (bir kaç bağımsız oluşum)

Stilus ve plasenta

5 → 4 → 3 → 2

Plasentalanma



Tohumlar

Dar kanatlı → omurgalı → silindirik

Kromozom sayısı

12 → 7 (? 6)

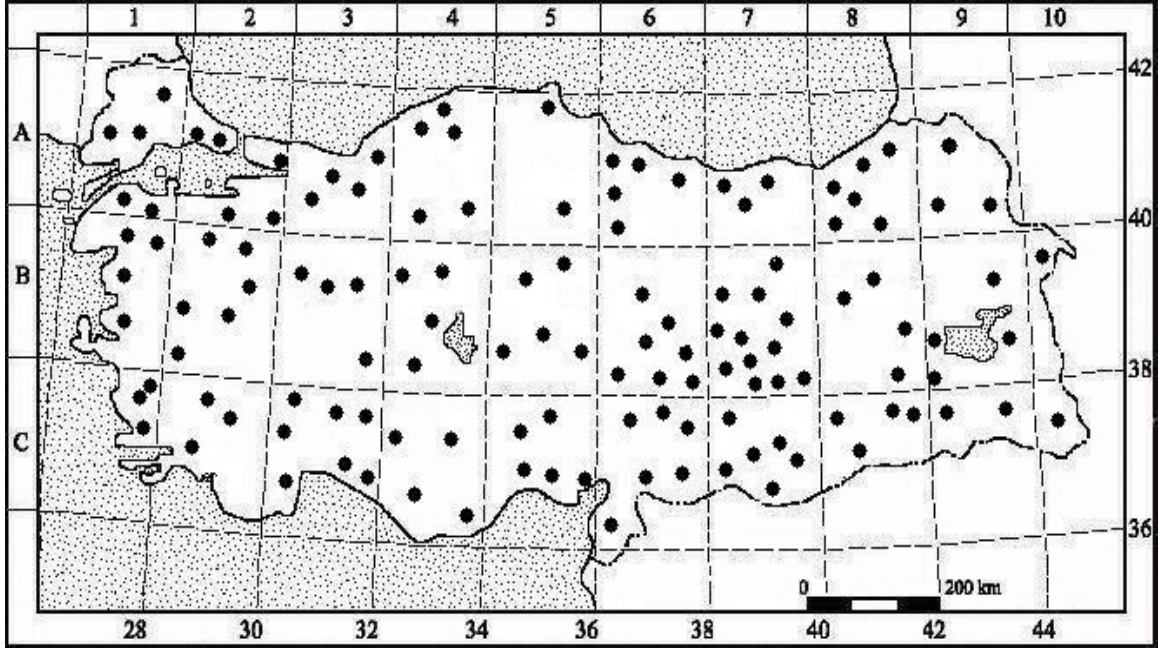
Türkiye Florasında *H. sorgerae* ve *H. davisii* türleri dışındaki *Drosanthe* seksiyonu taksonları *Hirtella* seksiyonunda yer almaktadır (Davis ve ark., 1967). *Hirtella* seksiyonundaki türler; *H. elongatum* Ledeb., *H. apricum* Karelin & Kiril., *H. uniglandulosum* Hausskn. Ex Bornm., *H. salsolifolium* Hand.-Mazz., *H. hyssopifolium* Vill., *H. lydium* Boiss., *H. amblysepalum* Hochst., *H. spectabile* Jaub. & Spach., *H. lysimachioides* Boiss. & Noé, *H. asperulum* Jaub. & Spach, *H. hirtellum* (Spach) Boiss., *H. retusum* Aucher-Eloy, *H. libanoticum* N. Robson, *H. pseudolaeve* N. Robson, *H. thymbrifolium* Boiss. & Noé, *H. helianthemoides* (Spach) Boiss., *H. vermiculare* Boiss. & Hausskn., *H. olivieri* (Spach) Boiss., *H. capitatum* Choisy, *H. scabroides* Robson & Poulter, *H. scabrum* L. ve *H. thymopsis* Boiss.'dir.

Hirtella seksiyonu taksonları Akdeniz, Türkiye, Kırım, Irak ve Altay Dağları'ndan Kafkasya'ya kadar yayılış göstermektedir. *H. hyssopifolium*, *H. asperulum*, *H. hirtellum*, *H. libanoticum* ve *H. vermiculare* taksonları ise Türkiye'de yayılış göstermemektedir (Robson, 1977).

Robson 2010 yılında yapmış olduğu *Hirtella* seksiyonun monograf çalışmasında; *Hypericum elongatum* türünü 3 varyete (var. *antasiaticum*, var. *elongatum*, var. *lythrifolium*) şeklinde yeniden düzenlemiştir. Daha önce bu türün alttürü olarak belirtilen *H. elongatum* subsp. *microcalycinum* ve subsp. *apiculaticum*, *H. microcalycinum* ve *H. apiculatum* olarak ayrı türler yapılmıştır.

Hypericum cinsi Türkiye Florası'nda A'dan başlayıp F'ye kadar devam eden gruplardan ve değişik seksiyonlardan oluşmaktadır. Oldukça geniş bir yayılışa sahip olan *Hypericum* cinsi bitkileri birçok fitocoğrafik bölgede doğal yayılış göstermektedir. Cinsin ülkemizdeki yayılışı ise Şekil 1.5'de verildiği gibidir. Cins üyeleri çok yıllık otsu, çoğu zaman ise çalı formundadırlar. *Hypericum* bitkisinde çiçekler iki eşeylidir. Sepaller (çanak yapraklar) 5 adettir. Petaller (taç yapraklar) 5 adet olup genellikle sarı, çoğu kez hafif kırmızı veya kırmızı damarlıdır. Nadiren nektar içerirler. Stamen sayısı 5'den 200'e kadar değişkenlik gösterir. Ovaryum 3-5 lokuslu veya kısmen ya da tamamen bir lokuslu ya da çok sayıda tohum taslağı üzerindeki plasentadan oluşur. Stiluslar 3-5 adet olup, ayrı, ince ve uzundur. Tohum; kapsül içinde kendi kendine zardan ayrılan, genellikle yağ muhafazası reçine ihtiva eden veya kese ya da duvar içinde ya da nadiren etli ve kendi kendine açılmayan bir özellik gösterir. Bitkide bezlerin görünümü ve dağılışı türlerin sistematik pozisyonun belirlenmesinde önemlidir. Bezler organ çevresinde olduğu zaman marjinal, çevrenin yakınında olduğu zaman intermarjinal ve çevreden uzakta olduğunda ise süperfisial olarak tanımlanırlar. Yumurtalık ve kapsül duvarları içerisinde dar ve ensiz bezler var ise vittae (yağ muhafazası) olarak isimlendirilirler. Kısa boylu şişkin bezler ise kese olarak tarif edilir (Davis ve ark., 1967).

Robson'un 1981 yılında cinsin türleri üzerinde 89 morfolojik karakter kullanarak yaptığı numerik kladistik analizler sayesinde elde edilen veriler, cinsin filogenesi ile ilgili çalışmalarda da temel bilgi niteliğindedir. Son zamanlarda cins içindeki akrabalık ilişkilerini daha ayrıntılı bir şekilde ortaya koymak adına, Avrupa ve Kuzey Amerika'da birçok farklı grup tarafından son moleküler teknikler kullanılarak bu konudaki çalışmalar devam ettirilmektedir (Crockett ve Robson, 2011).



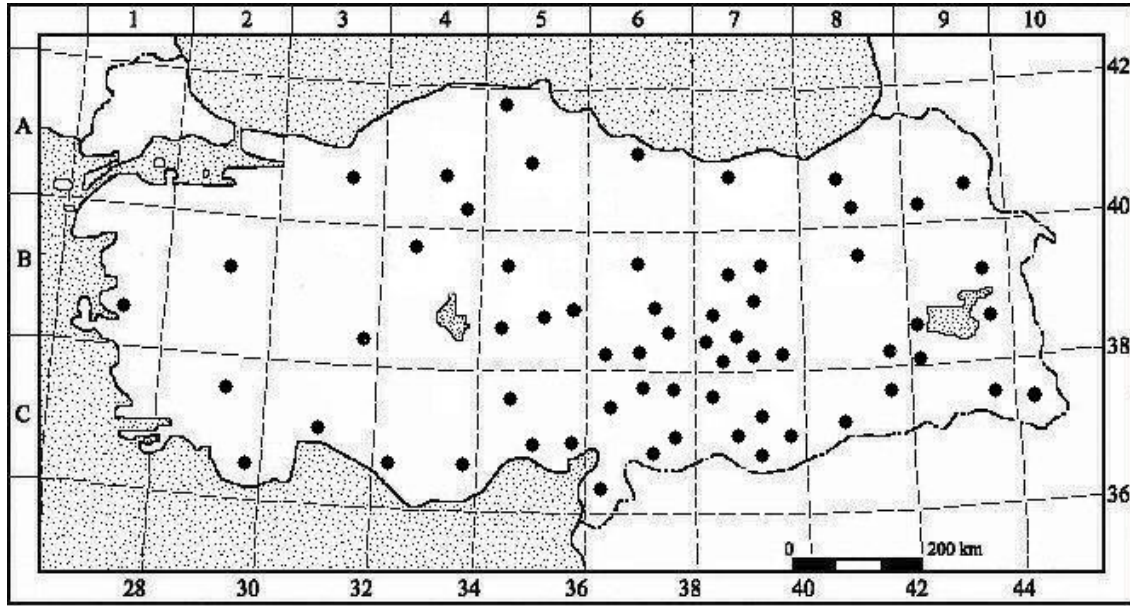
Şekil 1.5. *Hypericum* cinsinin Türkiye’deki yayılışı (Davis ve ark., 1967; Güner ve ark., 2000)

1.10. *Hypericum* L. Cinsi *Drosanthe* (Spach) Endl. Seksiyonunun Özellikleri

Drosanthe seksiyonu üyeleri Grup C’ye dâhildir. Bu grubu diğerlerinden ayıran özellikleri bu gruba dâhil türlerin; petallerinin tırnaklı, genellikle kırmızımsı veya kırmızı damarlı olması, üstteki bezlerin yuvarlak veya oval olması, gövdenin dik, otsu, köksüz, yaprakların ise çoğu kez dar, önemsiz derecede renksiz oluşu veya sert olmasıdır (Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000; Davis ve ark., 1967).

Drosanthe seksiyonu üyeleri Türkiye Florası’nda 23 taksonla temsil edilmektedir. Bu seksiyona ait taksonlardan; *H. spectabile* Jaub. & Spach, *H. pseudolaeve* Robson, *H. thymbrifolium* Boiss. & Noe., *H. uniglandulosum* Hausskn. Ex Bornm., *H. salsolifolium* Hand.-Mazz., *H. capitatum* Choisy, *H. scabroides* Robson & Poulter., *H. thymopsis* Boiss. ve *H. sorgerae* Robson, yurdumuz için endemiktir (Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000).

Hypericum cinsi içerisinde yer alan taksonların bazı taksonomik problemlerinin var olduğu bildirilmektedir. *H. spectabile* Jaub.&Spach, *H. amblysepalum* ve *H. lysimachioides* ile bir de Yunanistan'daki *H. vesiculosum* Griseb ile ilişki içindedir. *H. amblysepalum*'a Hochst. ait Türkiye'den örnek bulunmamakla beraber, Irak sınırımıza yakın yerden kayıt bulunmaktadır. Türün morfolojik karakterlerinde problem olduğu bildirilmiştir. *H. lysimachioides*, iki varyete ile temsil edilmekte (var. *lysimachioides* ve var. *spathulatum*) *H. amblysepalum* ve *H. asperulum* Jaub. & Spach. ile coğrafik ve morfolojik benzerlikler göstermektedir. *H. pseudolaeve* Robson endemik bir takson olup *H. amblysepalum*, *H. capitatum*, *H. helianthemoides* ve *H. thymbrifolium* ile yakın benzerlik içerisindedir. Aynı şekilde cins içinde birçok bitki türünün birbirleriyle yakın benzerlik gösterdiği bildirilmektedir (Davis ve ark., 1967).



Şekil 1.6. *Drosanthe* seksiyonu üyelerinin Türkiye'deki yayılışı (Davis ve ark., 1967) (*H. spectabile*, *H. amblysepalum*, *H. lysimachioides*, *H. retusum*, *H. elongatum*, *H. apricum*, *H. lydiun*, *H. davisii*, *H. sorgerae*, *H. pseudolaeve*, *H. thymbrifolium*, *H. helianthemoides*, *H. olivieri*, *H. uniglandulosum*, *H. salsolifolium*, *H. capitatum*, *H. scabroides*, *H. scabrum*, *H. thymopsis*)

Türkiye Florası'na göre *Drosanthe* seksiyonunun teşhis anahtarı:

1. Çiçeklenme hemen hemen başak şeklinden geniş piramite kadar
2. Gövde yaprakları perfoliat ya da geniş kordat-ampeksikaul, yarı dairemsiden üçgenimsi ovata **13. *spectabile***
2. Gövde yaprakları serbest, tabanda kuneat, diğerlerine nazaran daralmış
3. Gövde yaprakları oblong ya da lanseolattan ovata; petaller sıklıkla kırmızımsı ya da kırmızı damarlı
4. Sepaller yuvarlak, spathulat ya da oblongdan hemen hemen dairemsiye; yapraklar yuvarlak, tüysüz ya da yüzeyi dalgalı-papillalı **14. *amblysepalum***
4. Sepaller akut, spathulat ya da oblongdan lanseolata; yapraklar obtustan apikulat ya da akut, tüysüz ya da kenarlarında ya da yüzeyinde zayıf skabrit. **15. *lysimachioides***
3. Gövde yaprakları linear ya da dar lanseolat; petaller kırmızımsı ya da kırmızı damarlı değil (14&16 dışında)
5. Yapraklar retus, uçta siyah guddeli; gövde, yaprak ve petaller genellikle noktalı siyah guddeli; sepaller genellikle 2 siyah çizgili **18. *retusum***
5. Yapraklar mukronattan yuvarlağa; gövde, yaprak ve petaller siyah guddesiz; sepaller siyah çizgili değil
6. Sepaller oblongdan obovat-spathulat, petaller 8-12 mm, kapsül 8-13 mm **14. *amblysepalum***
6. Sepaller lanseolattan ovata ya da oblong, yuvarlak ise petal ve kapsüllerden küçük
7. Kapsül yumurtamsı, akuminat ya da belirli gagalı; budlar akut ya da obtus, genellikle elipsoid
10. Yapraklar yuvarlak, uçta guddesiz; sepaller nadiren kabartılı
8. Sepaller $\pm$ eşit değil, bazen imbrikat, en azından kısmen guddesiz kenarları ile obtus ya da yuvarlaktan apikulata; gövde guddeleri yok ya da küçük, belirli değil **16. *hyssopifolium***
8. Sepaller eşit, imbrikat değil, akut ya da hemen hemen akut, kenarları düzenli guddeli; gövde guddeleri genellikle çok sayıda ve $\pm$ belirli **17. *lydium***
7. Kapsül küremsi kısa gagalı ya da değil; budlar yuvarlak, genellikle küremsi
9. Sepaller $\pm$ eşit değil genellikle imbrikat ve kenarları düzensiz guddeli **16. *hyssopifolium***

9. Sepaller eşit ya da hemen hemen eşit, imbrikat değil, kenarları $\pm$ düzenli guddeli
11. Kapsül kısa gagalı; yapraklar genellikle dalgalı papillalı; çiçeklenme silindirikten geniş piramite

19. *pseudolaeve*

11. Kapsül küremsi; yapraklar genellikle tüysüz; çiçeklenme hemen hemen başak şeklinden piramite ya da silindirik

20. *helianthemoides*

10. Yapraklar apikulat ya da mukronat yada uçta siyah guddeli, yuvarlak, uçta guddesiz, sepaller kabartılı

12. Sepaller akut, tabanda 3 kabartılı; yaprakların mukrosu guddesiz; çiçeklenme piramitten kısa silindiriğe

21. *thymbrifolium*

12. Sepaller yuvarlaktan mukronata, tabanda 5 kabartılı; yaprakların genellikle ucu guddeli; çiçeklenme $\pm$ başak

13. Yapraklar ve genellikle sepaller guddeli ya da mukro guddesiz; gövde ve yapraklar kısa havlı tüylüden tüysüze

22. *uniglandulosum*

13. Yapraklar ve genellikle sepaller uçta guddeli ya da tepecikte guddeli; gövde ve yapraklar kısa havlı tüylü

23. *salsolifolium*

1. Çiçeklenme küremsiden hemen hemen küremsiye

14. Çiçeklenme hemen hemen küremsi; gövde tüysüz; petaller genellikle koyu kırmızıdan portakal kırmızısına; yapraklar yuvarlak

24. *capitatum*

14. Çiçeklenme küremsi; gövde genellikle kısa yumuşak ya da skabrit tüylü; petaller sarı; yapraklar mukronattan yuvarlağa

15. Gövde kısa yumuşak tüylüden kısa havlıya; sepaller serbest ya da sadece tabanda kümeli

25. *scabroides*

15. Gövde skabrit tüylü ya da nadiren tüysüz fakat yapraklar apikulat ya da mukronat; sepallerin uzunluklarının üçte biri ya da üçte ikisinden itibaren kümeli

16. Gövde guddeleri dallanmamış; çiçeklenme c. 15-çok çiçekli; gövde 10-60 cm

26. *scabrum*

16. Gövde guddeleri dallanmış; çiçeklenme 1- c. 22 çiçekli; gövde 3-11 cm

27. *thymopsis*

Drosanthe seksiyonuna ait en son biyosistematik tabanlı çalışma 2009 yılında Yüce tarafından yapılmıştır. Bu çalışmayla seksiyon üyelerinin morfolojik özellikleri yeniden değerlendirilmiş ve Türkiye Florası'nda yer alan betimlerine yeni karakterler eklenmekle birlikte, bazı farklılıklar da tespit edilmiştir. Bu farklılıklar Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

Tablo 1.1. *Drosanthe* üyelerinin morfolojik özellikler bakımından Türkiye Florası'ndaki betiminden farklılıkları (Yüce, 2009)

TAKSON	Türkiye Florası	Çalışma sonunda saptanan farklılıklar
<i>H. spectabile</i>	Gövde boyu 35-60 cm Gövde yaprakları boyu 20-45 mm Petal 9-14 mm	Gövde boyu 43-80 cm Gövde yaprakları boyu 20-30 mm Petal 6-13 mm
<i>H. amblysepalum</i>	Gövde boyu 20-80 cm Gövde genellikle guddesiz Gövde yaprakları boyu (15-)20-55 mm Petal 10-15 mm Kapsül 7-10 mm	Gövde boyu 25-40 cm Gövde guddesiz ya da kehribar guddeli Gövde yaprakları boyu 10-30 mm Petal 8-12 mm Kapsül 8-13 mm
<i>H. retusum</i>	Gövde boyu 15-50 cm Petal 7-10 mm	Gövde boyu 15-61 cm Petal 6-11 mm
<i>H. apricum</i>	Gövde boyu (15-)45-75cm Gövde yaprakları boyu 10-30 mm Çiçeklenme 12-39 mm Petal 6-9 mm Kapsül 5-8 mm	Gövde boyu 34-101 cm Gövde yaprakları boyu 8-20 mm Çiçeklenme 14-50 mm Petal 8-11 mm Kapsül 6-10 mm
<i>H. lydium</i>	Gövde yaprakları ucu yuvarlak Kapsül 6-8 mm	Gövde yaprakları ucu obtusdan mukronata Kapsül 7-12 mm
<i>H. pseudolaeve</i>	Gövde boyu 15-60 cm; dik	Gövde boyu 16-41 cm; dik ya da tabanda yatık
<i>H. sorgerae</i>	Gövde boyu (11)-17-22 cm Gövde yaprakları boyu 5-11 mm Çiçeklenme (3)-5-10mm Petal 9-12 mm Kapsül 5-7 mm	Gövde boyu 33-68 cm Gövde yaprakları boyu 8-23 mm Çiçeklenme 7-34 mm Petal 10-16 mm Kapsül 7-10 mm
<i>H. davisii</i>	Gövde yaprakları boyu 8-28 mm Çiçeklenme 8-22 mm Kapsül 4-7 mm	Gövde yaprakları boyu 7-12 mm Çiçeklenme 7-26 mm Kapsül 8-10 mm
<i>H. helianthemoides</i>	Petal 4-9 mm Kapsül 4-5 mm	Petal 6-10 mm Kapsül 7-8 mm

<i>H. thymbrifolium</i>	Gövde boyu 9-22 cm; dik Gövde yaprakları boyu 7-13 mm Kapsül 3-4.5 mm	Gövde boyu 8-45 cm; dik ya da tabanda yatık Gövde yaprakları boyu 6-17 mm Kapsül 6-9 mm
<i>H. uniglandulosum</i>	Gövde yaprakları boyu (10-)14-28(-33) mm Petal 6-8 mm Kapsül 2.5-4 mm	Gövde yaprakları boyu 11-39 mm Petal 6-10 mm Kapsül 6-9 mm
<i>H. salsolifolium</i>	Petal 6-8 mm Kapsül 2.5-4 mm	Petal 8-10 mm Kapsül 7-8 mm
<i>H. capitatum</i>	Gövde boyu 15-50 cm Gövde yaprakları boyu 8-28 mm Petal 5-7- mm Kapsül 5-7 mm	Gövde boyu 26-34 cm Gövde yaprakları boyu 9-15 mm Petal 4-8 mm Kapsül 4-5 mm
<i>H. scabroides</i>	Gövde boyu 15-40 cm Gövde yaprakları boyu 7-15 mm; ucu yuvarlak Petal 10-15 mm Kapsül 7-10 mm	Gövde boyu 20-46 cm Gövde yaprakları boyu 7-11 mm; ucu apikulat-mukronat Petal 8-12 mm Kapsül 8-13 mm
<i>H. thymopsis</i>	Gövde boyu 3-11 cm Gövde yaprakları boyu 6-18 mm Kapsül c. 4 mm	Gövde boyu 5-12 cm Gövde yaprakları boyu 5-13 mm Kapsül 5-6 mm

H. spectabile, *H. pseudolaeve*, *H. thymbrifolium*, *H. salsolifolium*, *H. thymopsis* ve *H. retusum* türlerinin braktelerinin siyah guddeli diğer türlerin ise siyah guddesiz olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca seksiyon üyeleri içinde sadece *H. retusum*'un anterinin siyah gudde taşıdığı ilk defa bu çalışmayla belirlenmiştir. Diğer taksonların anterlerinin şeffaf ya da kehribar guddeli ya da guddesiz olduğu saptanmıştır.

H. capitatum (var. *capitatum* ve var. *luteum*), *H. scabrum*, *H. scabroides* ve *H. thymopsis* taksonlarını seksiyonun diğer üyelerinden ayıran en önemli özellik ise çiçeklenme şekillerinin küremsi ya da hemen hemen küremsi olmasıdır. Bu beş takson birbirleri ile yakın ilişkilidir. *H. capitatum*'un diğer 3 türe oranla çiçeklenme şekli az küremsidir. *H. scabroides*'in gövdesinde kısa havlı ya da kısa yumuşak tüyler bulunmaktadır.

H. scabrum ve *H. thymopsis* türlerinin gövdesi ise skabrit tüylü ya da tüsüzdür. *H. thymopsis*'in bitki boyu diğer türlere oranla oldukça kısadır (3-11 cm). Braktenin gudde durumuna bakıldığında ise bu dört tür içinde siyah guddeli olan sadece *H. thymopsis*'dir.

H. spectabile türünün gövde yaprakları seksiyonun diğer taksonlarından oldukça farklılık göstermektedir. Gövde yapraklarının perfoliat ya da geniş kordat-ampleksikaul, yarı dairemsiden üçgenimsi-ovat olmasından dolayı yakın ilişkili olduğu *H. lysimachioides* ve *H. amblysepalum* türlerinden ayrılmaktadır. Ayrıca Türkiye Florası'nda yer almayan brakte karakterine göre de bu iki türden ayrılmaktadır. *H. spectabile*'nin braktesi siyah guddeli, diğer iki türün ise guddesizdir.

H. retusum'u seksiyon içindeki diğer taksonlardan ayıran en önemli karakterler gövde, yaprak ve petallerinin siyah guddeli ve sepallerinin ve braktelerinin iki siyah çizgili guddeli olmasıdır. Brakteleri sepalleri gibi 2 siyah çizgili guddeye sahiptir. Bu özellik ilk kez Yüce (2009) tarafından tespit edilmiştir.

H. elongatum (subsp. *apiculatum* ve *microcalycinum*), *H. apricum* ve *H. lyidium* birbiri ile yakın ilişkilidir. *H. lyidium* sepallerinin eşit olması ve gövdesinde bulunan çok sayıda ve belirli kırmızı ve kehribar guddeleri ile diğer üç taksondan ayrılmaktadır.

H. pseudolaeye, *H. thymbrifolium*, *H. helianthemoides* ve *H. olivieri* ile ilişkilidir. Özellikle yaprak ucunun yuvarlak olması ile *H. thymbrifolium* ve *H. helianthemoides* türlerinden ayrılmaktadır. *H. thymbrifolium*'un sepallerinin kabartılı ve yapraklarının ucunun mukronat olması *H. helianthemoides* ile arasındaki en ayırt edici özelliklerdir.

H. uniglandulosum ve *H. salsolifolium* türleri yakın ilişkilidir. İki türü birbirinden ayıran farklılıklar *H. salsolifolium* taksonunun gövdesinin daima skabrit-kısa havlı tüylü, yapraklarının obtus şeklinde mukronat, uç kısmının guddeli ve kısa havlı tüylü, braktelerinin mukrosunun guddeli, sepallerinin geniş oblong, yuvarlaktan obtusa, uç kısmının mukrosuz, bazen siyah guddeli olmasıdır.

H. capitatum var. *capitatum* seksiyon içinde kırmızımsı turuncu petal rengine sahip tek taksondur. Diğer taksonların petal rengi sarıdır. Cins içinde taksonomik önemi olan petallerin kırmızı damarlı olma özelliği seksiyon içinde; *H. amblysepalum*, *H. davisii*, *H. elongatum*, *H. lyidium*, *H. lysimachioides*, *H. apricum* ve *H. spectabile* taksonlarında nadiren olsa rastlanmaktadır. Diğer taksonlarda ise petaller kırmızı ya da kırmızımsı damarlı değildir. *H. retusum* ise petal yüzeyinde siyah gudde taşıyan tek türdür (Yüce, 2009).

1.11. Çalışmanın Amacı

- Bu çalışmada, *Hypericum* L. (Hypericaceae) cinsinin *Drosanthe* (Spach) Endl. seksiyonuna ait 23 takson arasındaki filogenetik ilişkinin moleküler teknikler kullanarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle, daha önceden yapılan arazi çalışmaları sonucunda toplanmış bazı bitki örnekleri ve tez döneminde toplanan örneklerin yapraklarından izole edilen kloroplast genomu çalışmada kullanılmıştır.
- Kloroplast DNA'nın kodlanmayan bölgelerden biri olan; *trnL-trnF* bölgesi familya altı kategorilerin filogenetik akrabalıklarını belirlemede geniş ölçüde kullanıldığından dolayı bizim çalışmamızda da tercih edilen kısım olmuştur. Evrimsel akrabalıkları ve bireyler arasındaki çeşitliliği belirlemek amacıyla kloroplast DNA'nın *trnL3'* ve *trnF* bölgeleri arasındaki kısım *trne* ve *trnf* primer seti kullanılarak çoğaltılmıştır.
- Elde edilmesi planlanan moleküler verilerle, çeşitli analiz yöntemleri kullanılarak çalışma materyali 23 taksona ait bir filogenetik ağaç (kladogram) hazırlanması hedeflenmiştir. Bu sayede taksonların birbirine olan genetik yakınlığı ve uzaklığı hakkında yorum yapılabilmesi, taksonlar arası akrabalık, sistematik ve infragenerik ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.
- Çalışma kapsamında kullanılan bireylerin sekans dizilimine dayalı; korunmuş bölge sayısını, varyasyon sayısını, nükleotid kompozisyonunu, nükleotid çeşitliliğini, genetik uzaklık değerini ve türlerarası ilişkileri belirlemek amaçlanmıştır.
- Yüce (2009) tarafından ortaya konulan *Hypericum* cinsi *Drosanthe* seksiyonu ile ilgili biyosistematik ilişkilere, fenetik ve biyokimyasal yaklaşımlara bu çalışma ile moleküler açıdan da yeni yaklaşımlar sağlanması, cins içi genetik benzerlik ve farklılıkların ortaya çıkartılması hedeflenmiştir.
- Ayrıca bu seksiyona ait çalışılmayan taksonların çok amaçlı olarak çalışılmasına da imkan sağlanmış olacaktır.
- Bunların yanı sıra 23 taksona ait sekans analiz sonuçları da tarafımızca belirleneceğinden seksiyon ve cins ile ilgili çalışmalara yeni bir bakış açısının da getirilmesi amaçlanmıştır.
- Seçilen tez konusu ülkemizde bu cins ve bu seksiyona ait ilk filogenetik tabanlı çalışma olması açısından da ayrıca önemlidir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Bitki Materyallerinin Elde Edilmesi

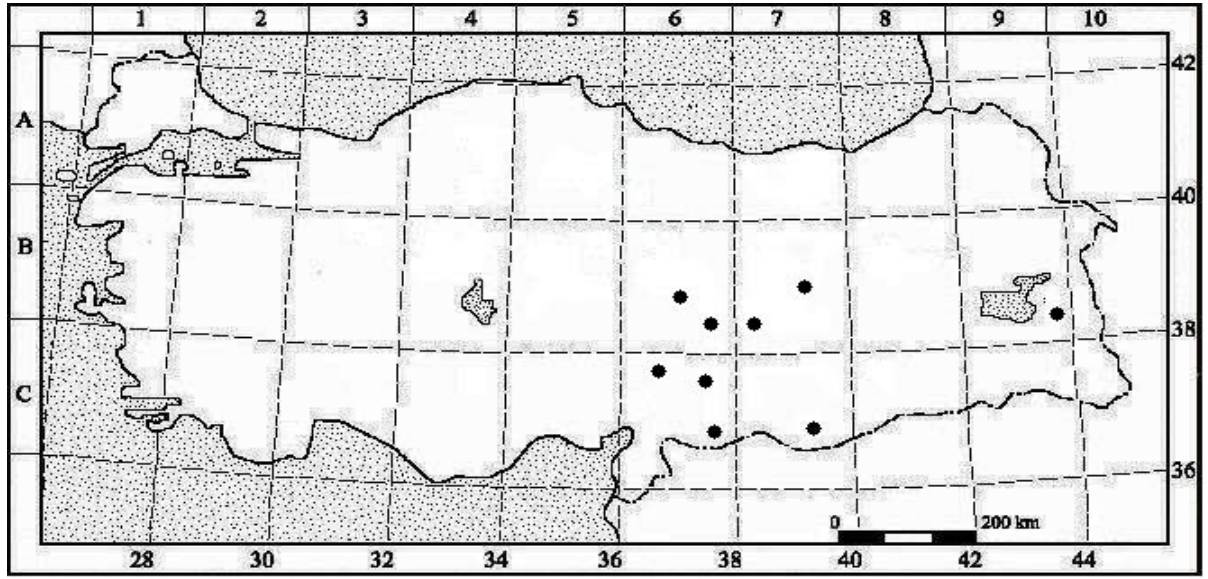
Bu çalışmada Türkiye’de yetişen *Hypericum* L. (Hypericaceae) cinsine ait *Drosanthe* (Spach) Endl. seksiyonunun taksonları kullanılmıştır. Bu bitkilerin çoğu 2005-2009 yıllarında Mayıs–Temmuz ayları arasında çiçekli olarak doğal habitatlarından Yüce (2009) ve Doğan tarafından toplanmış olup Fırat Üniversitesi Herbaryum (FUH)’unda ve Bitki Ürünleri ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı (BUBAL)’nda korunmaktadır. Eksik taksonlar da tarafımızca toplanmış ve seksiyon üyelerinin sekans dizilimine dayalı bir filogenetik analiz çalışması yapılmıştır. *H. spectabile*, *H. sorgerae*, *thymbriifolium*, *H. salsolifolium*, *H. scabroides* ve *H. thymopsis* türleri tip lokalitesinden toplanmıştır. Tip lokalitelerinde bulunamayanlar veya ulaşılamayanlar ise tip lokalitesine en yakın yerlerden veya doğal habitatlardan temin edilmiştir.

Çalışma kapsamında seksiyon üyelerinin her biri için 3 farklı populasyon veya 3 değişik bitki örneğinden yararlanılmıştır. Her bir örneğin yaprağı -20 °C’lik derin dondurucuda DNA izolasyonu yapılana kadar korunmuştur. Çalışmada kullanılan bitkilerin toplandığı lokaliteler Tablo 2.1’de, bu lokalitelerin Türkiye Haritası üzerindeki gösterimi Şekil 2.1’de, bazı bitkilerin habitusları ise Şekil 2.2’de verilmiştir.

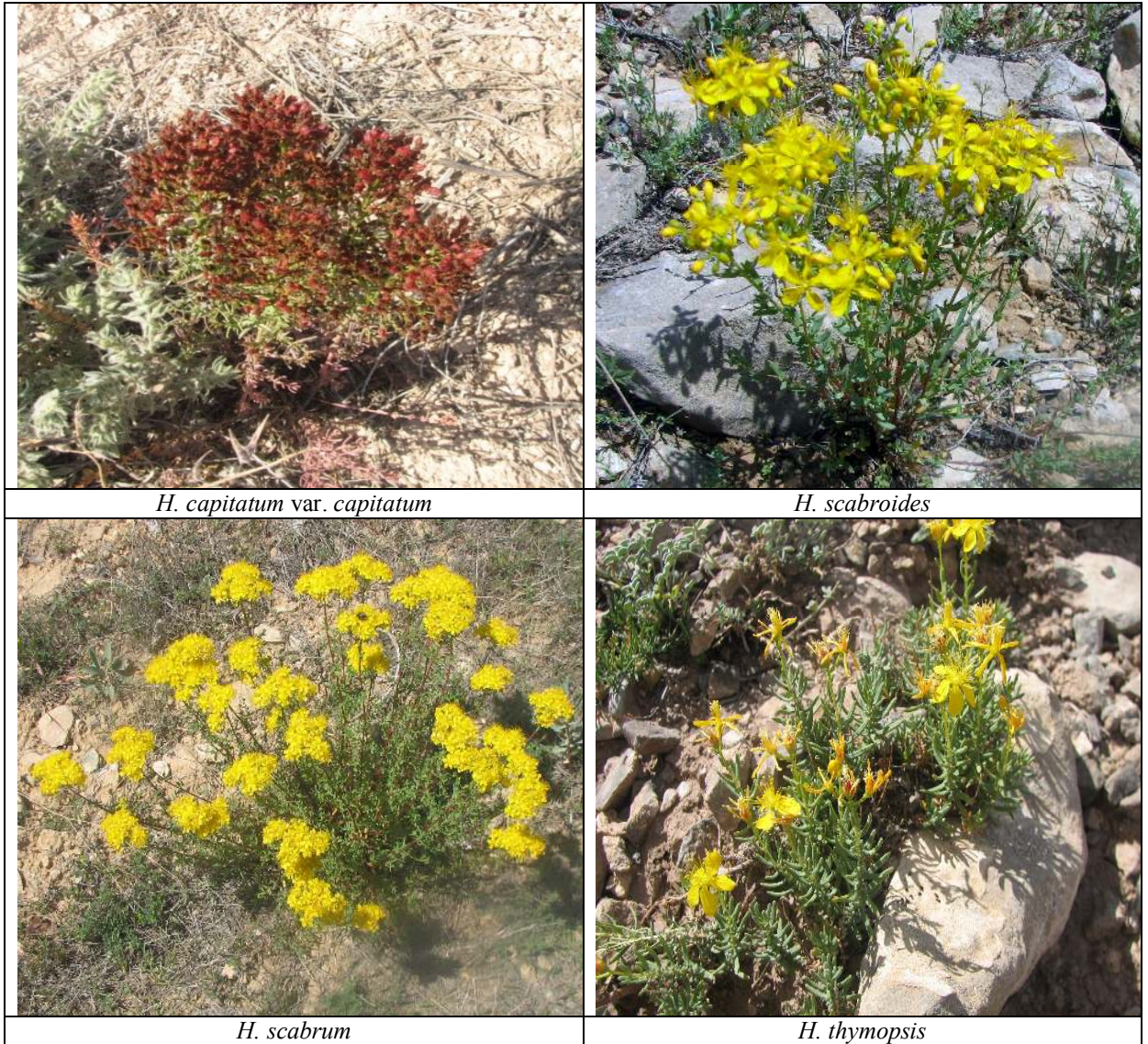
Tablo 2.1. Çalışma kapsamında kullanılan taksonların listesi ve lokalite bilgileri

TAKSON	TOPLAYICI NO	TOPLANDIĞI YER
<i>H. spectabile</i>	G. Doğan 2202	Kahranamaraş-Narlı arası, 85. yıl ormanı yanı, tarla içi.
<i>H. amblysepalum</i>	E. Yüce 1037	Karabıyıklı-Gaziantep arası, eski Antep yolu 30. km, yol kenarı, 700-800 m.
<i>H. lysmachiodides</i> var. <i>lysimachiodides</i>	E. Yüce 1025	Karga-Ortaçalı, Gözeli yol ayrımı, 1550 m, tarla kenarı, Elazığ.
<i>H. lysmachiodides</i> var. <i>spathulatum</i>	G. Doğan 2277	Körpe Köyü'ne 3 km kala, yolun sağ, yamaçlar, Elazığ.
<i>H. elongatum</i> var. <i>elongatum</i>	G. Doğan 2203	Devlet Hastanesi çıkışı, Ahir Dağı girişi, 3. km, 1000 m, Kahramanmaraş.
<i>H. apiculatum</i>	E. Yüce 2600	Gümüşhane-Erzincan arası
<i>H. microcalycinum</i>	E. Yüce 1023 E. Yüce 1027 E. Yüce 1029	Harput, Şüşnaz, 1400 m, dağ yamaçları, Elazığ. Kürk Eskibağlar, 1600 m, dağ yamaçları, Elazığ. Gözeli merkezinin üst kesimleri, 1550 m, Elazığ.
<i>H. sorgerae</i>	G. Doğan 2330	Zara girişinden içeri 25 km sonra, yamaç, yol kenarı, 1350 m, Sivas.
<i>H. apricum</i>	G. Doğan 2332	Sivas il sınırı levhasından sonra yolun sağ, Kangal'a 40 km kala, 1550 m.
<i>H. davisii</i>	G. Doğan 2331	Sivas havaalanı girişi, yol kenarı, 1620 m.
<i>H. lyidium</i>	G. Doğan 2213 G. Doğan 2229 G. Doğan 2231	Narlı-Karabıyıklı arası, eski Antep yolu üzeri. Reşadiye Tüneli çıkışı, 2. km, Gölbaşına 25 km kala, Gölbaşı-Malatya arası. Erkenek Vadi karşı, dağ yamacı, Adıyaman-Malatya arası.
<i>H. retusum</i>	G. Doğan 2271	Kabahaydar-Üçkenar Köyü civarı, 675 m, Şanlıurfa.
<i>H. pseudolaeve</i>	E. Yüce 1061	Arabkir-Malatya arası, 1200 m, dağ yamaçları.
<i>H. helianthemoides</i>	E. Bağcı 2029	Gevaş, Artos Dağı etekleri, 1990 m, Van.

<i>H. thymbrifolium</i>	G. Doğan 2248 G. Doğan 2273 E. Yüce 1084	Akçadağ'a 20 km kala, Malatya. Elbistan yolu üzeri, Gökpınar çıkışı, yol kenarı, Kahramanmaraş. Malatya-Darende arası, 50. km, 1500 m, tarla içi.
<i>H. uniglandulosum</i>	G. Doğan 1334 G. Doğan 1394 Ş. Hayta 2056	Harmantepe Köy yolu üzeri, orman kenarı, 1100 m, Elazığ. Cip Baraj Gölü, piknik alanı çevresi, 1080 m, Elazığ. Dambüyük Köyü Deliktaş Mevkii, 1000 m, Elazığ.
<i>H. salsolifolium</i>	E. Yüce 1047	Şanlıurfa-Hilvan arası, Eski Hilvan Yolu, 25. km, yol kenarı, 694 m.
<i>H. capitatum</i> var. <i>capitatum</i>	G. Doğan 2284	Atatürk Barajı arkasındaki adalar çevresi, 1200 m, Adıyaman.
<i>H. capitatum</i> var. <i>luteum</i>	G. Doğan 2212	Gaziantep çıkışı, yol kenarı.
<i>H. scabroides</i>	G. Doğan 1413 G. Doğan 2261 E. Yüce 1069	Beşik Köyü çevresi, yol kenarı, 1120 m, Elazığ. Darende-Elbistan yol ayrımı, Darende çıkışı, 5. km. 1400 m, Malatya. Elazığ-Mürüdü Köyü arası, 1315 m, yol kenarı.
<i>H. scabrum</i>	G. Doğan 2209 G. Doğan 2227 G. Doğan 2268	Ahir Dağı, 2000 m, Kahramanmaraş. Pazarcık'a 15 km kala, Maraş. Elbistan Ekinözü İçmeler Mevkii, 10. km, Kahramanmaraş.
<i>H. thymopsis</i>	E. Yüce 1087	Darende-Gürün arası, 20. km, 1500 m, jipsli alanlar, Malatya.
<i>H. olivieri</i>	G. Doğan 2270 G. Doğan 2272	Darende'ye 40 km kala, yol kenarı, 1330 m, Malatya. Malatya-Darende Arası, Darende'ye 20 km kala.



Şekil 2.1. Çalışma kapsamında kullanılan taksonların toplandığı lokaliteler





H. spectabile



H. amblysepalum



H. lysimachioides var. *lysimachioides*



H. retusum



H. elongatum subsp. *microcalycinum*



H. apricum



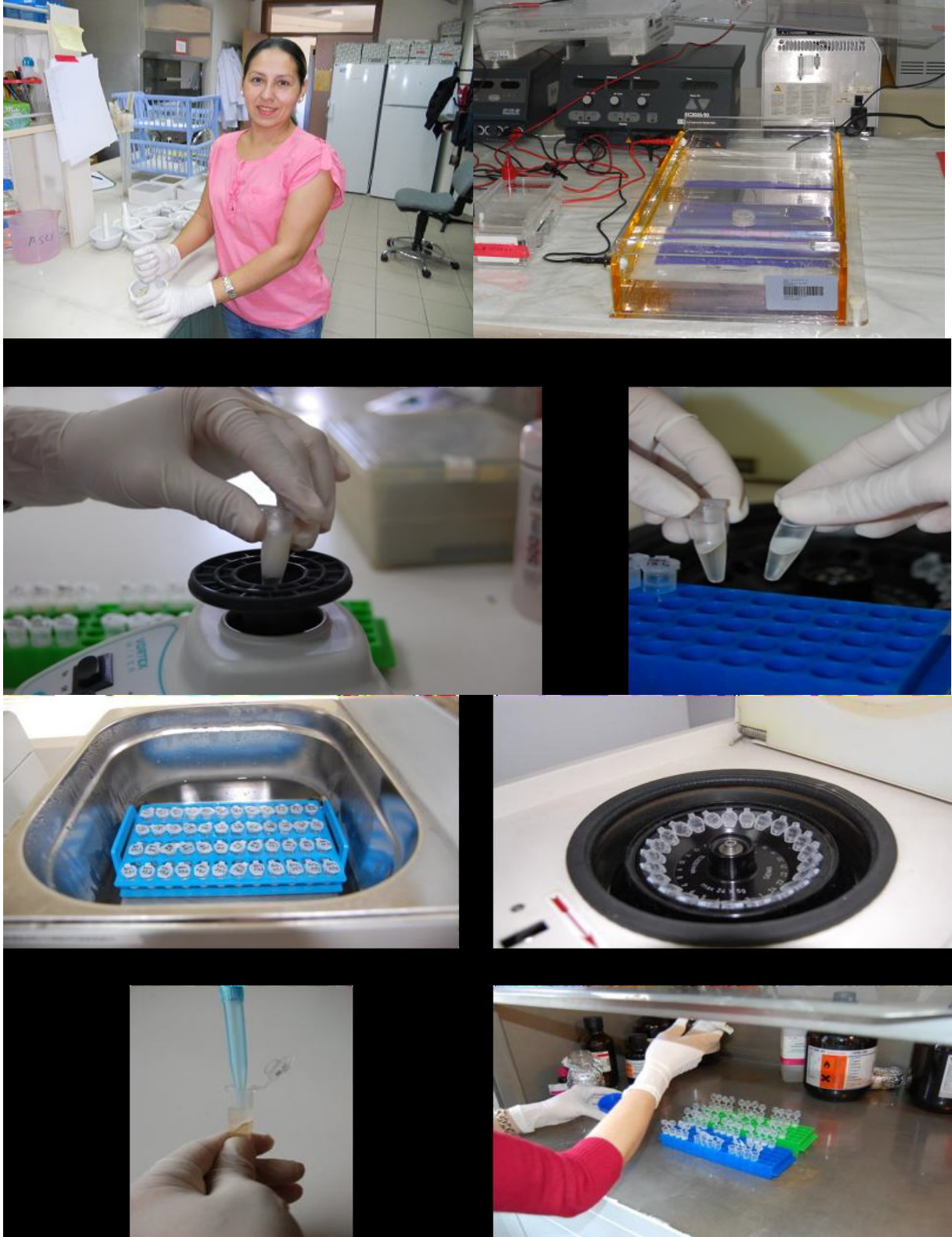
Şekil 2.2. Çalışma kapsamında kullanılan bazı bitkilerin habitusları

2.2. Yapraklardan DNA İzolasyonu

Toplanan örneklerin sekans okuma aşamasına gelene kadar bütün ön çalışmaları, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Biyolojik Bilimler Bölümü'ndeki Bitki Moleküler Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Sekans okutma işlemi ise yine ODTÜ yerleşkesinde bulunan Refgen'e yaptırılmıştır.

DNA, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) metodu temel alınarak izole edilmiştir (Doyle ve Doyle, 1987). Bu metoda göre;

- 1) Bitki yaprakları porselen bir havan içerisinde sıvı azot yardımıyla ince toz haline getirilip beyazımsı renk gözlenene kadar dövüldü.
- 2) 1.5 mL'lik santrifüj tüplerinin içerisine öğütülmüş bu yapraklardan 0.2 gram konulup, üzerine önceden 60 °C'de ısıtılmış CTAB tamponundan 750 µL eklendi.
- 3) Örnekler bu solüsyonla birlikte 60 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 4) Inkübasyondan sonra kloroform-izoamil alkol (24:1) karışımından 750 µL eklendi.
- 5) Bu tüpler hafifçe çalkalanıp, 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 6) Bu basamaktan sonra 2 faz gözlemlendi; biri DNA'yı içeren sulu faz diğeri ise alt kısımda kalan bazı protein, lipid ve birçok sekonder bileşeni içeren kloroform fazıydı. Bu iki faz arasındaki ara yüzey, fazla miktarda hücre kalıntısı ve biraz da çökmüş protein ve benzerlerini içeren kısımdır.
- 7) Üst kısımdaki temiz ve renksiz olan sulu faz, geniş bir pipet yardımıyla yeni santrifüj tüplerine alındı.
- 8) Hacmin 2/3'ü kadar (yaklaşık 600 µL) soğuk iso-propanol eklenip, tüpler hafifçe çalkalandı.
- 9) Bu örnekler -70 °C'lik dondurucuda en az 1 saat bekletildi.
- 10) Sonra 15 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- 11) Santrifüjden sonra süpernatant (sıvı kısım) dökülüp, pelet 750 µL % 70'lik etanol ile yıkandı.
- 12) Süpernatantın tüpten tamamen uzaklaştırılması için tüpler tekrar 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- 13) Peletler kuruyana kadar oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat bekletildi.
- 14) DNA'yı süspanse etmek için 50 µL apirojen su (PCR solüsyonu) kullanıldı ve izole edilmiş olan bu DNA daha sonrada kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.
- 15) DNA bu haliyle % 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.



Şekil 2.3. Laboratuvar çalışmalarından görüntüler

2.3. DNA Ölçümü

Örneklerdeki DNA konsantrasyonu Nanodrop 2000 spektrofotometre kullanılarak 260 nm (ng/ μ L)'de ölçüldü. Bu cihazda 260/280 nm'deki absorbe değerleri DNA-protein saflık derecesini, 260/230 nm'deki absorbe değerleri ise DNA-RNA saflık derecesini belirtmektedir. DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın 260/280 oranının yaklaşık 1,8-2,0 civarında olması beklenmektedir. Elde edilen değer 2,0'den yüksek olması; örneğin RNA, kloroform ya da fenol ile kirli olduğunu ve 1,8 değerinden düşük olması ise örnek içerisinde proteinler ya da fenolik (polifenol) bileşikler bulunduğunu ifade eder (Hoisington, 1992). DNA ölçümleri yapılmadan önce DNA'nın yükleneceği kısım alkollü bir bezle silinip, temizlendikten sonra ince uçlu bir pipet yardımıyla her bir DNA örneğinden 0,1 μ L kadar yüklendi. DNA'ların kalite ve miktar tayini bu cihaz yardımıyla tespit edildi. DNA numunelerinin okunması için de kör (blank) olarak ultra saf su kullanıldı. Kalite ve miktar açısından en iyi olan DNA'lar PCR'da çoğaltma işlemi için seçildi.

2.4. Ön Denemeler ve Kloroplast DNA'nın t-RNA Bölgesinin Çoğaltılması

Kloroplast DNA'nın t-RNA bölgesini PCR'da çoğaltma için başlangıçta 3 primer seti kullanıldı. *trnT*- *trnL5'* bölgesini çoğaltmak için *trna* ve *trnb*, *trnL5'*-*trnL3'* bölgesini çoğaltmak için *trnc* ve *trnd* ve son olarak *trnL3'*-*trnF* bölgesini çoğaltmak için de *trne* ve *trnf* primer setleri kullanılarak, her bir bölge için 5 birey üzerinden ön denemeler yapıldı. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Denemeler Refgen'e gönderildi. Refgen'den gelen pikler Finch TV 1.4'de incelendiğinde en kaliteli ve spesifik sonuçların *trne* ve *trnf* primerlerinin kullanıldığı bölgeye ait olduğuna karar verildi. Bu nedenle çalışmanın daha sonra sadece bu primerlerle yürütülmesi uygun görüldü.

trnT- *trnL5'* bölgesi:

trna (Forward): 5' CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT 3'

trnb (Reverse): 5' TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC 3'

trnL5'-*trnL3'* bölgesi:

trnc (Forward): 5' CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3'

trnd (Reverse): 5' GGG GAT AGA GGA CTT GA AC 3'

*trnL*3'-*trnF* bölgesi:

trne (Forward): 5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3'

trnf (Reverse): 5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3'

2.5. PCR'da oğaltma

PCR karışımı hazırlanırken önce toplam hacim 25 µL olacak şekilde gereken maddeler farklı miktarlarda kullanılarak Tablo 2.2'de gösterildiği gibi 7 farklı koşulda denemeler yapıldı.

Tablo 2.2. PCR şartlarının optimizasyonu için denenen reaksiyon karışımları

	dH ₂ O (µL)	10X PCR tamponu	MgCl ₂ (25mM)	dNTP (mM)	Primer çifti (100µM)	Taq Pol. (5u/µL)	DNA (µL)	Toplam (µL)
1	21.95	1 µL	1 µL	0.25 µL	0.1+0.1 µL	0.1 µL	0.5	25
2	21.65	1 µL	1 µL	0.25 µL	0.25+0.25 µL	0.1 µL	0.5	25
3	20.15	1.5 µL	1.5 µL	0.25 µL	0.25+0.25 µL	0.1 µL	1	25
4	21.4	1 µL	1 µL	0.5 µL	0.25+0.25 µL	0.1 µL	0.5	25
5	20.9	1 µL	0.5µL	0.5 µL	0.25+0.25 µL	0.1 µL	1.5	25
6	19.4	1.5 µL	1.5 µL	1 µL	0.25+0.25 µL	0.1 µL	1	25
7	18.35	2.5 µL	2 µL	0.25 µL	0.25+0.25 µL	0.15µL	1.25	25

Denenen bu reaksiyon karışımları içerisinde en iyi sonucu 7. reaksiyon sağladığından geri kalan basamaklar sadece bu şarta riayet edilerek devam ettirildi. Sekans analizleri için bu şartta belirtilen miktarlar son karışım hacmi 50 µL olacak şekilde optimize edildi. Bu durumda toplam PCR karışımı için; 5 µL 10x PCR tamponu, 4 µL MgCl₂ (25 mM stok solüsyon), 0.5 µL dNTP (10 mM her bir dNTP) (Fermentas, Ontorio, Canada), 2.5 µL DNA, 100 µM'lık pimerlerin her birinden 0.5 µL, 0.3 µL Taq DNA polimeraz (5u/ µL) ve 36.7 µL dH₂O (steril su) kullanıldı (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Optimize edilmiş PCR reaksiyon karışımı

PCR içeriği	Kullanılan Hacim	Son Konsantrasyon
d H ₂ O	36.7	NA
MgCl ₂ (25 mM stok solüsyon)	4	2.3 mM
10x PCR tamponu	5	1X
dNTP (10 mM her bir dNTP)	0.5	0.1µM
Forward primer (<i>trne</i>) (100 µM)	0.5	1µM
Reverse primer (<i>trnf</i>) (100 µM)	0.5	1µM
Taq DNA polimeraz (5u/ µL)	0.3	0.03 u/ µL
DNA (3ng/ µL)	2.5	0.5µg/ µL
Toplam Hacim	50	

En iyi PCR döngü programının hangisi olduğunu anlamak için, özellikle primerlerin bağlanma basamağında (Annealing) 50-60 °C’ler arasında farklı sıcaklık değerleri girilerek deneme PCR’ları yapıldı, denemeler sonunda çalışılan örnekler için en uygun PCR döngü programının Tablo 2.4’de gösterildiği gibi olduğuna karar verildi. Buna göre PCR döngü programı; ön denatürasyon basamağı 1 döngü için, 94 °C’de 2 dakika, 30 döngü için; denatürasyon basamağı 94 °C’de 15 saniye, primer bağlanması 58 °C’de 30 saniye, uzama 72 °C’de 45 saniye ve en son uzama basamağı 1 döngü için 72 °C’de 5 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 2.4. Kloroplast DNA’nın *trn* bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR döngü programı

SICAKLIK (°C)	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI	AMAÇ
94	2 dk.	1	Ön denatürasyon
94	15 sn.	30	Denatürasyon
58	30 sn.	30	Bağlanma
72	45 sn.	30	Uzama
72	5 dk.	1	Sonlandırma
4	15 dk.	-	Bekleme

2.6. PCR Ürünlerinin Gözlenmesi

PCR işleminden sonra, çoğaltma işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldü. Bunun için;

- 1) Sıvı solüsyona (50 mM Tris borat, 1 Mm EDTA, 0.5 µg/mL Etidyum bromür) partikül halindeki agar (%1-2) ilave edildikten sonra partiküllerin çözülmesi için bir şişe içerisinde kaynar su banyosunda kaynatıldı.
- 2) Solüsyon oda sıcaklığında 50 °C'ye kadar soğutulup, agar tankına döküldü.
- 3) Jelin bir tarafına elektroforez targağı yerleştirilip, 25-30 dakika sonra katılan jelden tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel 0.5X TAE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi.
- 4) Tarak dişleri sayesinde oluşturulan kuyucuklara, bir miktar boya maddesi (%0.25 brom fenol mavisi) ilave edilen PCR ürünlerinden 10 µL otomatik pipetler aracılığı ile dikkatlice yüklenerek 80 voltta 60 dakika süreyle yürütüldü.
- 5) Daha sonra jeldeki DNA bantlarının durumu alttan aydınlatma yapabilen bir ultraviyole ışık kaynağı transillüminatör kullanılarak incelendi ve DNA bantlarının fotoğrafı çekildi.

2.7. Kloroplast DNA'nın t-RNA Bölgesinin Sekanslanması

Bu bölgenin sekanslanmasında hem ileri (*trne*) hem geri (*trnf*) her iki primer seti de kullanıldı. Sekanslama reaksiyonları için “Amersham dye-terminator sekans kiti” tercih edildi. Sekanslama reaksiyonunda 4 viyal toplam hacim 10 µL olacak şekilde sırasıyla içlerine ddATP, ddCTP, ddGTP ve ddTTP konularak hazırlandı (Tablo 2.5). Sekanslama için PCR programı da şu şekilde ayarlandı; ön denatürasyon 94 °C'de 5 dakika 1 döngü için; 18 döngü için 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 45 saniye; 15 döngü için 94 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika ile son uzama 1 döngü için 72 °C'de 5 dakika (Tablo 2.6). Sekanslama reaksiyonlarındaki arıtma işleminde üretici firma tarafından arıtıcı olarak tanımlanan amonyum asetat (Amersham Biosciences, New Jersey, USA) kullanıldı.

Arıtma işlemi sırasında şu prosedür uygulandı;

1. Her bir tüpe 7.5 M'lık amonyum asetattan 2 µL ve % 99'luk soğuk etanolden 30 µL eklendi.
2. Tüpler hafifçe vortekslenip, 20 dakika buz üzerinde bekletildi.
3. DNA'nın dibe çökmesi için tüpler 25 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Üsteki süpernatant kısmı atılıp, yıkama solüsyonu olarak % 70'lik etanolden 200 µL eklendi.

5. Tüpler tekrar hafifçe vortekslenip, 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısım atılıp, tüpler 20 dakika süreyle kurumaya bırakıldı.
7. 5 µL formamid boyası eklenerek tüpler vortekslendi ve -20 °C’lik dondurucuda saklandı.

Son olarak ürünler % 6’lık polyakrilamid jelde koşturulduktan sonra, otomatik sekanslama sisteminde (Open Gene; Visible Genetics, Ontario, Canada) üretici firmanın direktifleri doğrultusunda uygun olan veriler toplandı. Verilerin toplanmasından sonra ileri ve geri primerlerin sekanslarındaki bazların doğruluğu ve dizilimi kontrol edildi. Eğer her iki sekans arasında uyumsuzluk varsa bu örnekler analizden ihmal edildi.

Tablo 2.5. Sekanslama reaksiyonu için gereken koşullar

Sekanslama Reaksiyonu Bileşenleri	Kullanılan Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
d H ₂ O	6.5	NA
Reaksiyon Tamponu	0.7	NA
Primerler (5 µM)	1.0	0.5 µM
ddNTP karışımı	0.6	0.1 mM
Sekanslama enzimi	0.2	0.02 u/µL
Saflaştırılmış PCR ürünü	1	NA

Tablo 2.6. Sekanslama reaksiyonu için gerekli PCR programı

SICAKLIK (°C)	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI	AMAÇ
94	5 dk.	1	Ön denatürasyon
94	30 sn.	18	Denatürasyon
55	30 sn.	18	Bağlanma
72	45 sn.	18	Uzama
94	30 sn.	15	Denatürasyon
72	1 dk.	15	Uzama
72	5 dk.	1	Sonlandırma

2.8. Veri Analizleri

Hypericum cinsinin *Drosanthe* seksiyonunun 23 farklı taksonuna ait 69 farklı birey analizlerde kullanıldı. Üzerinde çalışılan 23 taksondan 3 tanesinde yapılan bütün denemelere rağmen düzenli bir pik dağılımı elde edilemedi. Hatta bu taksonlara ait bireylerin DNA'ları agaroz jelde yürütülürken her seferinde çift bant veya DNA kırıkları şeklinde görüntüler belirlendi. Bu taksonlar; *H. davisii*, *H. apricum* ve *H. apiculatum*'dur. *H. sorgerae* taksonunun ise sadece 1 bireyinden sekans dizilimi elde edilebilmiştir. Dolayısıyla çalışma sonunda 20 taksona ait toplam 58 bireyin kloroplast DNA'sının *trnL-trnF* bölgesinin sekans dizilimi kullanılabilmektedir. Ham sekanslar FASTA formatında düzenlendi. Analiz edilen sekanslar ham sekanslara göre daha kısa oldu, çünkü baştan ve sondan güvenilir olmayan sekanslar analizlerden çıkartıldı.

Sekanslar düzenlendikten sonra Mega programının 5.1 versiyonu kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Bu kapsamda; bireylerdeki A, T, G ve C oranları, AT ve GC yüzdeleri, korunmuş bölgeler, varyasyonlu bölgeler, bilgi verici bölgeler, tekli kısımlar, homolog baz çiftleri, transitiyonel ve transversiyonel çiftlerin sayısı belirlendi. Ayrıca bireyler kendi arasında gruplandırıldıktan sonra gruplar arası genetik mesafe, nükleotid çeşitliliği ve standart hata değerleri hesaplandı. Dış grup olarak NCBI'da AB219639.1 referans numarasıyla kayıtlı *Hypericum kamtschaticum*'un Ledeb. bizim çalıştığımız bölgeyle aynı olan DNA sekans dizilimi de bu program kapsamında istatistiksel analizlere tabii tutuldu.

Filogenetik ve evrimsel analizler sırasında çalışmamıza en uygun metodu belirleyebilmek için Mega 5.1'de yer alan tahmini model algoritmasından yararlanıldı. Buna göre çalışmamıza en uygun modelin, en düşük "BIC" (Bayesian Information Criterion) değerini veren T92 (Tamura-3-parameter) olduğuna karar verildi. Bu model kapsamında yer alan Maximum Likelihood yöntemi kullanılarak hem bireysel hem de gruplar bazında filogenetik ağaç hazırlandı.

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu

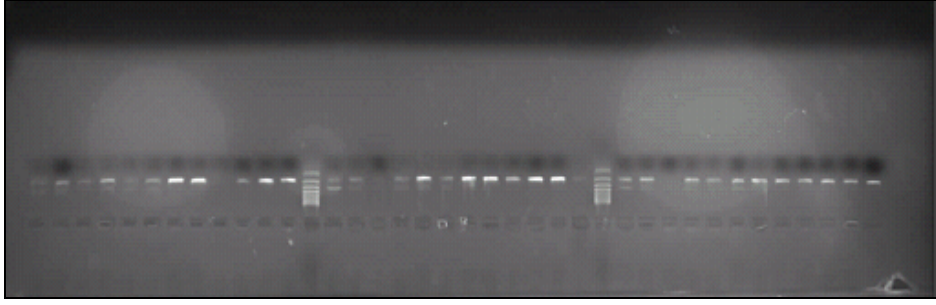
DNA sekans analizleri için tüm bireylerin kloroplast DNA'ları izole edilmiş ve Nanodrop 2000 spektrofotometre ile DNA miktar ve kalite tayini yapılarak elde edilen sonuçlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. DNA'ların saflık oranlarının ise 1,8-2,0 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ölçümler her takson için 3 birey üzerinden yapılmış, DNA'ların minimum ve maksimum değerleri belirlendikten sonra miktar ve kalite bakımından en iyi olanlar PCR'da kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bireylerin minimum ve maksimum DNA konsantrasyonları

Takson Adları	Örnek Sayısı	DNA Konsantrasyonu ng/μL	
		Minimum	Maksimum
<i>H. spectabile</i>	3	697	2480
<i>H. amblysepalum</i>	3	468	1287
<i>H. lysimachoides</i> var. <i>lysimachoides</i>	3	598	1615
<i>H. lysimachoides</i> var. <i>spathulatum</i>	3	844	1469
<i>H. elongatum</i> subsp. <i>elongatum</i>	3	754	1379
<i>H. elongatum</i> subsp. <i>apiculatum</i>	3	836	1709
<i>H. elongatum</i> subsp. <i>microcalycinum</i>	3	945	2163
<i>H. sorgerae</i>	3	700	1751
<i>H. apricum</i>	3	965	1103
<i>H. davisii</i>	3	597	1756
<i>H. lydium</i>	3	652	2625
<i>H. retusum</i>	3	1098	2407
<i>H. pseudolaeye</i>	3	871	1919
<i>H. helianthemoides</i>	3	470	1683
<i>H. thymbrifolium</i>	3	958	1844
<i>H. uniglandulosum</i>	3	829	2165
<i>H. salsolifolium</i>	3	346	1333
<i>H. capitatum</i> var. <i>capitatum</i>	3	599	2682
<i>H. capitatum</i> var. <i>luteum</i>	3	850	1826
<i>H. scabroides</i>	3	489	2400
<i>H. scabrum</i>	3	665	2341
<i>H. thymopsis</i>	3	752	1474
<i>H. olivieri</i>	3	672	1615

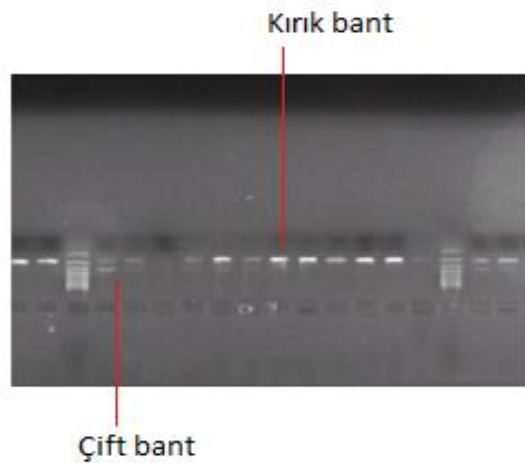
3.2. Kloroplast DNA'nın *trnL-trnF* Bölgesinin Çoğaltılması

Kloroplast DNA'nın *trnL-trnF* bölgesinin e-f primer çifti kullanılarak, materyal ve metot kısmında verilen PCR şartlarında çoğaltılması sonucu elde edilen PCR ürünü DNA'lar, %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve DNA bantları Şekil 3.1'de gösterildiği gibi elde edilmiştir.



Şekil 3.1. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

Üzerinde çalışılan 23 taksondan 3 tanesinde yapılan bütün denemelere rağmen düzenli bir pik dağılımı elde edilememiştir. Hatta bu taksonlara ait bireylerin DNA'ları agaroz jelde yürütülürken her seferinde çift bant veya DNA kırıkları şeklinde görüntüler verdiği Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Bu taksonlar; *H. davisii*, *H. apricum* ve *H. apiculatum*'dur.



Şekil 3.2. Çift ve kırık DNA bantları

3.3. Kloroplast DNA'nın *trnL-trnF* Bölgesinin Sekans Analiz Sonuçları

Hypericum cinsi *Drosanthe* seksiyonuna ait 23 takson ve her taksondan 3 bireyin kloroplast DNA'sının *trnL-trnF* bölgesinin sekans dizisi tespit edilmeye çalışılmış, Refgen'den gelen pik sonuçları Finch TV 1.4 versiyonu kullanılarak değerlendirilmiş, e-primer (forward) ve f-primer (reverse) sonuçları "Multiple Alignment Blast" otomatik sekanslama sistemi kullanılarak karşılaştırılmış ve göze çarpan bazı farklılıklar manuel olarak düzeltilmiştir. NCBI (National Center for Biotechnology Information)'dan yapılan taramalar sonucu *Hypericum* cinsi için *trnL-trnF* bölgesinin yaklaşık 188 bazlık bir bölge olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Primerlerin sağlıklı bir şekilde bağlanabilmesi için baştan 20 bazlık bir kısım tarafımızca değerlendirilmeye alınmamıştır. Bu nedenle istatistiksel analizler sırasında bireylere ait yaklaşık 168 baz çifti kullanılmıştır. Üzerinde çalışılan 23 taksondan 3 tanesinde yapılan bütün denemelere rağmen düzenli bir pik dağılımı elde edilememiştir. Hatta bu taksonlara ait bireylerin DNA'ları agaroz jelde görüntülenirken, her seferinde çift bant veya DNA kırıkları şeklinde görüntü vermiştir. Bu taksonlar; *H. davisii*, *H. apricum* ve *H. apiculatum*'dur. *H. sorgerae* taksonunun ise sadece 1 bireyinden sekans dizilimi elde edilebilmiştir. Dolayısıyla çalışma sonunda 20 taksona ait toplam 58 bireyin kloroplast DNA'sının *trnL-trnF* bölgesinin sekans dizilimi kullanılmış ve bu dizilim ekler kısmında verilmiştir.

3.4. Veri Analizleri

58 bireye ait DNA sekans dizilimleri Mega programının 5.1 versiyonu kullanılarak değerlendirilmiş, bütün bireylerin DNA sekans dizilimi ve buna ilaveten dış grup olarak NCBI'da AB219639.1 referans numarasıyla kayıtlı *Hypericum kamtschaticum*'un Ledeb. bizim çalıştığımız bölgeyle aynı olan DNA sekans dizilimi de bu program kapsamında istatistiksel analizlere tabii tutulmuştur.

3.4.1. Kloroplast DNA'nın *trnL-trnF* Bölgesinin Nükleotid Kompozisyonu

Çalışma kapsamında kullanılan bütün bireylerin sekans dizilimi Mega 5.1 programına aktarılarak “Align DNA” basamağında karşılaştırıldı, 168 baz çifti ortak olduğundan en sondaki fazla kısımlar kesildi ve yapılan istatistik sonucunda bireylerin nükleotid kompozisyonu belirlendi. Buna göre; Tablo 3.2’de verilen değerler incelendiğinde bireylerin T, C, A ve G bazlarının oranları bakımından birbirinden çok farklı olmadığı, baz kompozisyonlarının hemen hemen benzer olduğu, avaraj değerler toplandığında ise bireylerdeki A-T oranının % 69,3 ve G-C oranının % 30,7 olduğu, yani bireylerin A-T’ce daha zengin olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3.2. Kloroplast DNA'nın *trnL-trnF* bölgesinin nükleotid kompozisyonu

Birey No	Nükleotid Kompozisyonu				
	T (U)	C	A	G	Toplam
1a	47,1	18,5	22,3	12,1	157
1b	47,1	18,5	22,3	12,1	157
1c	46,5	18,7	22,6	12,3	155
2a	47,1	18,5	22,3	12,1	157
2b	47,1	18,5	22,3	12,1	157
2c	47,1	18,5	22,3	12,1	157
3a	47,1	18,5	22,3	12,1	157
3b	47,1	18,5	22,3	12,1	157
3c	47,1	18,5	22,3	12,1	157
4a	46,8	19,2	21,8	12,2	156
4b	48,1	18,8	21,3	11,9	160
4c	48,1	18,8	21,3	11,9	160
5a	47,1	18,5	22,3	12,1	157
5b	47,1	18,5	22,3	12,1	157
5c	47,1	18,5	22,3	12,1	157
6a	45,1	18,9	23,0	13,1	122
6b	45,1	18,9	23,0	13,1	122
6c	45,1	18,9	23,0	13,1	122
7a	49,1	17,4	21,7	11,8	161
7b	49,1	17,4	21,7	11,8	161
7c	49,1	17,4	21,7	11,8	161
8a	47,8	18,9	21,4	11,9	159
8b	47,8	18,9	21,4	11,9	159
8c	47,8	18,9	21,4	11,9	159
9a	47,8	18,9	21,4	11,9	159
9b	47,8	18,9	21,4	11,9	159
9c	47,8	18,9	21,4	11,9	159
10a	44,6	18,2	24,0	13,2	121
10b	44,6	18,2	24,0	13,2	121
10c	44,6	18,2	24,0	13,2	121
11a	48,1	18,1	21,9	11,9	160
11b	48,1	18,1	21,9	11,9	160
11c	48,1	18,1	21,9	11,9	160
12a	46,5	18,7	22,6	12,3	155
12b	46,5	18,7	22,6	12,3	155
12c	46,5	18,7	22,6	12,3	155
13a	47,8	18,6	21,7	11,8	161
13b	47,8	18,6	21,7	11,8	161
13c	47,8	18,6	21,7	11,8	161
14a	47,5	18,4	22,2	12,0	158
14b	47,5	18,4	22,2	12,0	158
14c	47,5	18,4	22,2	12,0	158
15a	48,1	17,9	21,8	12,2	156
15b	48,1	17,9	21,8	12,2	156
15c	48,1	17,9	21,8	12,2	156
16a	47,1	19,1	21,7	12,1	157
16b	47,1	19,1	21,7	12,1	157
16c	47,1	19,1	21,7	12,1	157
17a	44,6	18,2	24,0	13,2	121
17b	44,6	18,2	24,0	13,2	121
17c	44,6	18,2	24,0	13,2	121
18a	47,8	18,2	22,0	11,9	159
18b	47,8	18,2	22,0	11,9	159
18c	47,8	18,2	22,0	11,9	159
19a	47,8	18,9	21,4	11,9	159
19b	47,8	18,9	21,4	11,9	159
19c	47,8	18,9	21,4	11,9	159
20a	44,6	18,2	24,0	13,2	121
Avg.	47,2	18,5	22,1	12,2	151,8

3.4.2. Bireyler Arasındaki Moleküler Çeşitlilik Parametreleri

Çalışma kapsamında kullanılan 58 bireyin, e-f primerleri kullanılarak çoğaltılan *trnL-trnF* bölgesinin sekans diziliminin istatistiksel analizleri sırasında; korunmuş bölgeler (C), varyasyonlu bölgeler (V), bilgi verici bölgeler (Pi), tekli kısımlar (S), homolog baz çiftleri (ii), transitiyonel (si) ve transversiyonal (sv) çiftler ile R değeri (si/sv) gibi parametreler önce dış grup eklenmeden hesaplanmış ve elde edilen değerler Tablo 3.3’de, dış grup eklendikten sonra meydana gelen değişimleri göstermek için de elde edilen yeni değerler Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Dış grup eklenmeden önce bireyler arasındaki moleküler çeşitlilik parametreleri

Moleküler Çeşitlilik Parametreleri	<i>trnL-trnF</i> Bölgesi
Toplam Örnek Sayısı	58
Toplam Bant Uzunluğu	168
GC (%)	30,7
Korunmuş Bölgeler (C)	162
Varyasyonlu Bölgeler (V)	6
Tekli Kısımlar (S)	-
Bilgi Verici Bölgeler (Pi)	6
Homolog Baz Çiftleri (ii)	144
Transitiyonel Çiftler (si)	1,00
Transversiyonal Çiftler (sv)	1,00
R (si/sv)	0,70

Tablo 3.4. Dış grup eklendikten sonra bireyler arasındaki moleküler çeşitlilik parametreleri

Moleküler Çeşitlilik Parametreleri	<i>trnL-trnF</i> Bölgesi
Toplam Örnek Sayısı	58+1
Toplam Bant Uzunluğu	168
GC (%)	30,7
Korunmuş Bölgeler (C)	159
Varyasyonlu Bölgeler (V)	9
Tekli Kısımlar (S)	3
Bilgi Verici Bölgeler (Pi)	6
Homolog Baz Çiftleri (ii)	144
Transitiyonel Çiftler (si)	1,00
Transversiyonel Çiftler (sv)	1,00
R (si/sv)	0,71

İstatistiksel analizlere dış grup eklendikten sonra GC (%) oranının, ii, si ve sv değerlerinin değişmediği, R değerinde küçük bir değişimin olduğu (0.70'den 0.71'e), korunmuş bölgelerin sayısının 162'den 159'a düştüğü, varyasyon sayısının 6'dan 9'a çıktığı, bu 9 varyasyondan 6'sının bilgi verici ve güvenilir olduğu (Pi), 3'ünün ise significant (tek) kaldığı belirlenmiştir. Tekli kısımların 62. bazda G, 96. bazda C, 145. bazda A şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Varyasyon açısından bilgi verici bölgelerin dış grup eklenmeden öncede, sonrada 6 olduğu belirlenmiştir. 18., 76., 89., 97., 164. ve 166. bazlar bilgi verici bölgeleri göstermekte olup, bu bazların pozisyonu Şekil 3.3'de verilmiştir.

Şekil 3.3 incelendiğinde; 18. bazın hemen hemen tüm bireylerde C şeklinde olmasına rağmen, 10. takson (*H. amblysepalum*) ile 17. taksonun (*H. lysimachioides* var. *spathulatum*) tüm bireylerinde ve 20a olarak gösterilen *H. sorgerae* taksonunda A olarak varyasyon gösterdiği; 76. bazın seksiyonun incelenen tüm bireylerinde C iken, sadece 7. taksonun (*H. thymopsis*) bireylerinde T şeklinde varyasyon gösterdiği; 89. bazın tüm bireylerde C iken, sadece 15. taksonun (*H. lysimachioides* var. *lysimachioides*) bireylerinde T şeklinde varyasyon gösterdiği; 97. bazın bireylerde genelde C şeklinde olmasına rağmen, 6. takson (*H.*

spectabile), 10. takson (*H. amblysepalum*), 15. takson (*H. lysimachioides* var. *lysimachioides*) ve 17. taksonun (*H. lysimachioides* var. *spathulatum*) tüm bireyleri ile 20a şeklinde ifade edilen *H. sorgerae* taksonunun yanı sıra dış grup olarak seçtiğimiz *H. kamtschaticum* taksonunda da T şeklinde varyasyon gösterdiği; 164. bazın birçok bireyde A şeklinde olduğu fakat 4. takson (*H. scabrum*), 8. takson (*H. pseudolaeve*), 9. takson (*H. salsolifolium*), 11. takson (*H. helianthemoides*), 15. takson (*H. lysimachioides* var. *lysimachioides*), 16. takson (*H. scabroides*) ve 19. taksonun (*H. microcalycinum*) tüm bireylerinde C olarak varyasyon gösterdiği; 166. bazın seksiyonun hemen hemen tüm bireylerinde C olduğu tespit edilirken, sadece 11. taksonun (*H. helianthemoides*) bireylerinde A şeklinde varyasyon gösterdiği göze çarpmaktadır.

	1	7	8	9	1	1
	8	6	9	7	4	6
1a	C	C	C	C	A	C
1b	.	.	.	.	.	.
1c	.	.	.	.	.	.
2a	.	.	.	.	.	.
2b	.	.	.	.	.	.
2c	.	.	.	.	.	.
3a	.	.	.	.	.	.
3b	.	.	.	.	.	.
3c	.	.	.	.	.	.
4a	.	.	.	.	C	.
4b	.	.	.	.	C	.
4c	.	.	.	.	C	.
5a	.	.	.	.	.	.
5b	.	.	.	.	.	.
5c	.	.	.	.	.	.
6a	.	.	.	T	.	.
6b	.	.	.	T	.	.
6c	.	.	.	T	.	.
7a	.	T	.	.	.	.
7b	.	T	.	.	.	.
7c	.	T	.	.	.	.
8a	.	.	.	.	C	.
8b	.	.	.	.	C	.
8c	.	.	.	.	C	.
9a	.	.	.	.	C	.
9b	.	.	.	.	C	.
9c	.	.	.	.	C	.
10a	A	.	.	T	.	.
10b	A	.	.	T	.	.
10c	A	.	.	T	.	.
11a	.	.	.	.	C	A
11b	.	.	.	.	C	A
11c	.	.	.	.	C	A
12a	.	.	.	.	.	.
12b	.	.	.	.	.	.
12c	.	.	.	.	.	.
13a	.	.	.	.	.	.
13b	.	.	.	.	.	.
13c	.	.	.	.	.	.
14a	.	.	.	.	.	.
14b	.	.	.	.	.	.
14c	.	.	.	.	.	.
15a	.	.	T	T	C	.
15b	.	.	T	T	C	.
15c	.	.	T	T	C	.
16a	.	.	.	.	C	.
16b	.	.	.	.	C	.
16c	.	.	.	.	C	.
17a	A	.	.	T	.	.
17b	A	.	.	T	.	.
17c	A	.	.	T	.	.
18a	.	.	.	.	.	.
18b	.	.	.	.	.	.
18c	.	.	.	.	.	.
19a	.	.	.	.	C	.
19b	.	.	.	.	C	.
19c	.	.	.	.	C	.
20a	A	.	.	T	.	.

	1	7	8	9	1	1
	8	6	9	7	4	6
1a	C	C	C	C	A	C
1b	.	.	.	.	.	.
1c	.	.	.	.	.	.
2a	.	.	.	.	.	.
2b	.	.	.	.	.	.
2c	.	.	.	.	.	.
3a	.	.	.	.	.	.
3b	.	.	.	.	.	.
3c	.	.	.	.	.	.
4a	.	.	.	.	C	.
4b	.	.	.	.	C	.
4c	.	.	.	.	C	.
5a	.	.	.	.	.	.
5b	.	.	.	.	.	.
5c	.	.	.	.	.	.
6a	.	.	.	T	.	.
6b	.	.	.	T	.	.
6c	.	.	.	T	.	.
7a	.	T	.	.	.	.
7b	.	T	.	.	.	.
7c	.	T	.	.	.	.
8a	.	.	.	.	C	.
8b	.	.	.	.	C	.
8c	.	.	.	.	C	.
9a	.	.	.	.	C	.
9b	.	.	.	.	C	.
9c	.	.	.	.	C	.
10a	A	.	.	T	.	.
10b	A	.	.	T	.	.
10c	A	.	.	T	.	.
11a	.	.	.	.	C	A
11b	.	.	.	.	C	A
11c	.	.	.	.	C	A
12a	.	.	.	.	.	.
12b	.	.	.	.	.	.
12c	.	.	.	.	.	.
13a	.	.	.	.	.	.
13b	.	.	.	.	.	.
13c	.	.	.	.	.	.
14a	.	.	.	.	.	.
14b	.	.	.	.	.	.
14c	.	.	.	.	.	.
15a	.	.	T	T	C	.
15b	.	.	T	T	C	.
15c	.	.	T	T	C	.
16a	.	.	.	.	C	.
16b	.	.	.	.	C	.
16c	.	.	.	.	C	.
17a	A	.	.	T	.	.
17b	A	.	.	T	.	.
17c	A	.	.	T	.	.
18a	.	.	.	.	.	.
18b	.	.	.	.	.	.
18c	.	.	.	.	.	.
19a	.	.	.	.	C	.
19b	.	.	.	.	C	.
19c	.	.	.	.	C	.
20a	A	.	.	T	.	.
dg	.	.	.	T	.	.

Şekil 3.3. Varyasyon açısından bilgi verici bazların pozisyonu

3.4.3. Bireylerin Gruplandırılması ve Gruplar Arası Uzaklık (Distance) Analizi

Çalışmalar her taksona ait 3 farklı birey üzerinde yapıldığından, ilk 19 taksonun bireyleri 19 farklı gruba, 20. takson tek bir bireyle çalışıldığından 20. grup tek bir bireyi ve 21. grup sadece dış grubu temsil edecek şekilde bireyler gruplandırılmış ve Mega programının Kimura-2-Parametre baz değişim modeli kullanılarak, gruplar arasındaki genetik uzaklık hesaplanmıştır (Tablo 3.5). Tablo 3.5 incelendiğinde birden çok grup arasında uzaklık değerinin bulunmadığı (0.00) ve en yüksek uzaklık değerinin ise grup 11 (*H. helianthemoides*) ile grup 21 (*H. kamtschaticum*) arasında olduğu (0.05) göze çarpmaktadır. Bununla beraber grup 21'in; grup 4 (*H. scabrum*), grup 7 (*H. thymopsis*), grup 8 (*H. pseudolaeve*), grup 9 (*H. salsolifolium*), grup 15 (*H. lysimachioides* var. *lysimachioides*), grup 16 (*H. scabroides*) ve grup 19 (*H. microcalycinum*) ile 0.04 oranında yüksek bir uzaklık değerine sahip olduğu da görülmektedir. Gruplar oluşturulduktan sonra Mega programının "Diversity" (çeşitlilik), menüsünden bootstrap değeri 100 girilerek nükleotid çeşitliliği hesaplanmış ve gruplar arasındaki nükleotid çeşitliliğinin değeri dış grup varken de yokken de 0.01 olarak bulunmuştur. Ayrıca standart hata da (SE) 0.01 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.5. Gruplar arasındaki genetik uzaklık matrisi

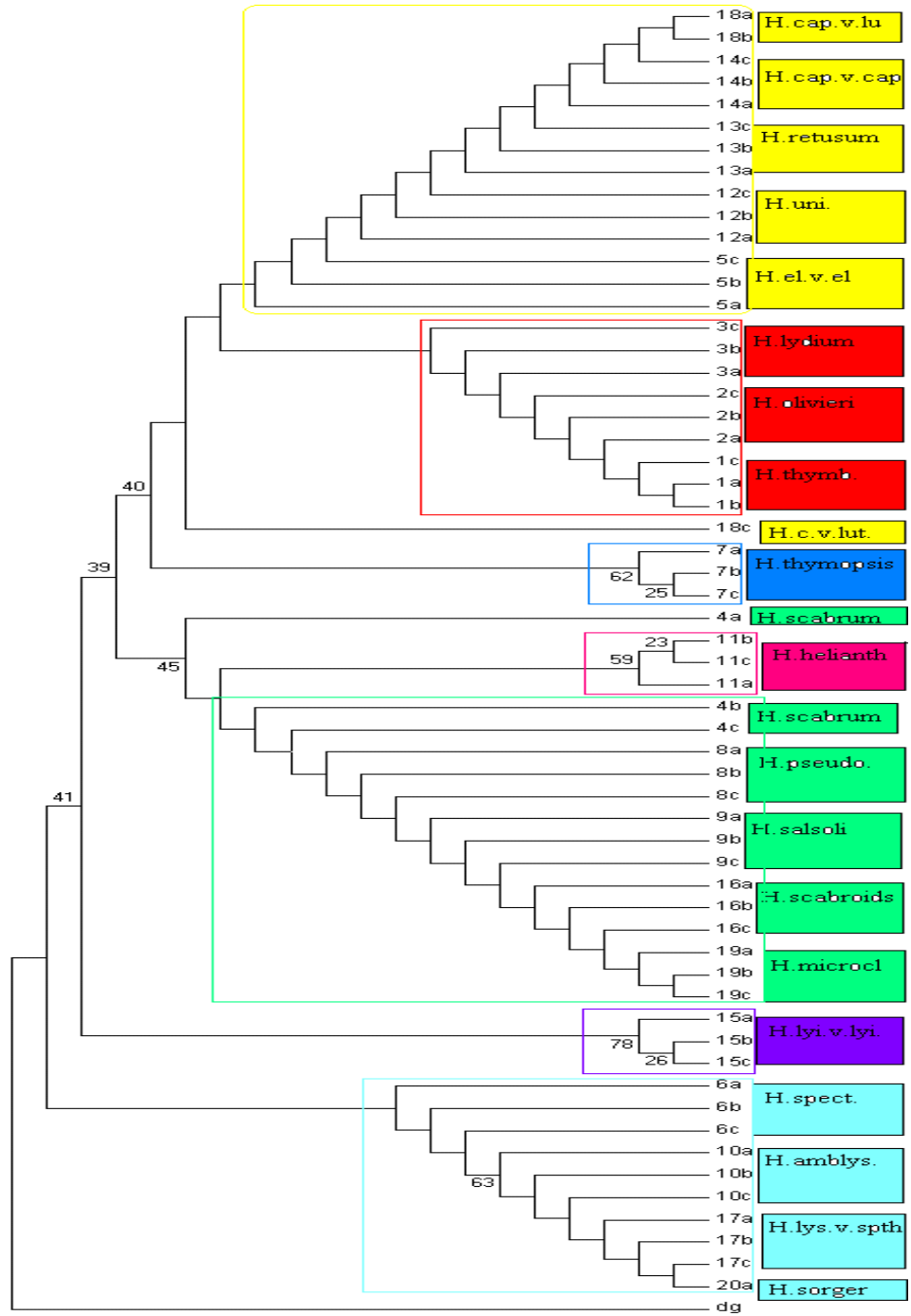
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. Gp 1																					
2. Gp 2	0.00																				
3. Gp 3	0.00	0.00																			
4. Gp 4	0.01	0.01	0.01																		
5. Gp 5	0.00	0.00	0.00	0.01																	
6. Gp 6	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01																
7. Gp 7	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02															
8. Gp 8	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02														
9. Gp 9	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.00													
10. Gp 10	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03												
11. Gp 11	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01	0.03											
12. Gp 12	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02										
13. Gp 13	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00									
14. Gp 14	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00								
15. Gp 15	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03							
16. Gp 16	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.00	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02						
17. Gp 17	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.00	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03					
18. Gp 18	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.02				
19. Gp 19	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.03	0.01			
20. Gp 20	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.00	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.00	0.02	0.03		
21. Gp 21	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.05	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	

1. *H. thymbrifolium*, 2. *H. olivieri*, 3. *H. lydiu*m, 4. *H. scabrum*, 5. *H. elongatum* var. *elongatum*, 6. *H. spectabile*, 7. *H. thymopsis*, 8. *H. pseudolaeve*, 9. *H. salsolifolium*, 10. *H. amblysepalum*, 11. *H. helianthemoides*, 12. *H. uniglandulosum*, 13. *H. retusum*, 14. *H. capitatum* var. *capitatum*, 15. *H. lysimachioides* var. *lysimachioides*, 16. *H. scabroides*, 17. *H. lysimachioides* var. *spatulatum*, 18. *H. capitatum* var. *luteum*, 19. *H. microcalycinum*, 20. *H. sorgerae*, 21. Dış grup (*Hypericum kamtschaticum*)

3.4.4. Bireyler Arasındaki Filogenetik İlişkilerin Belirlenmesi

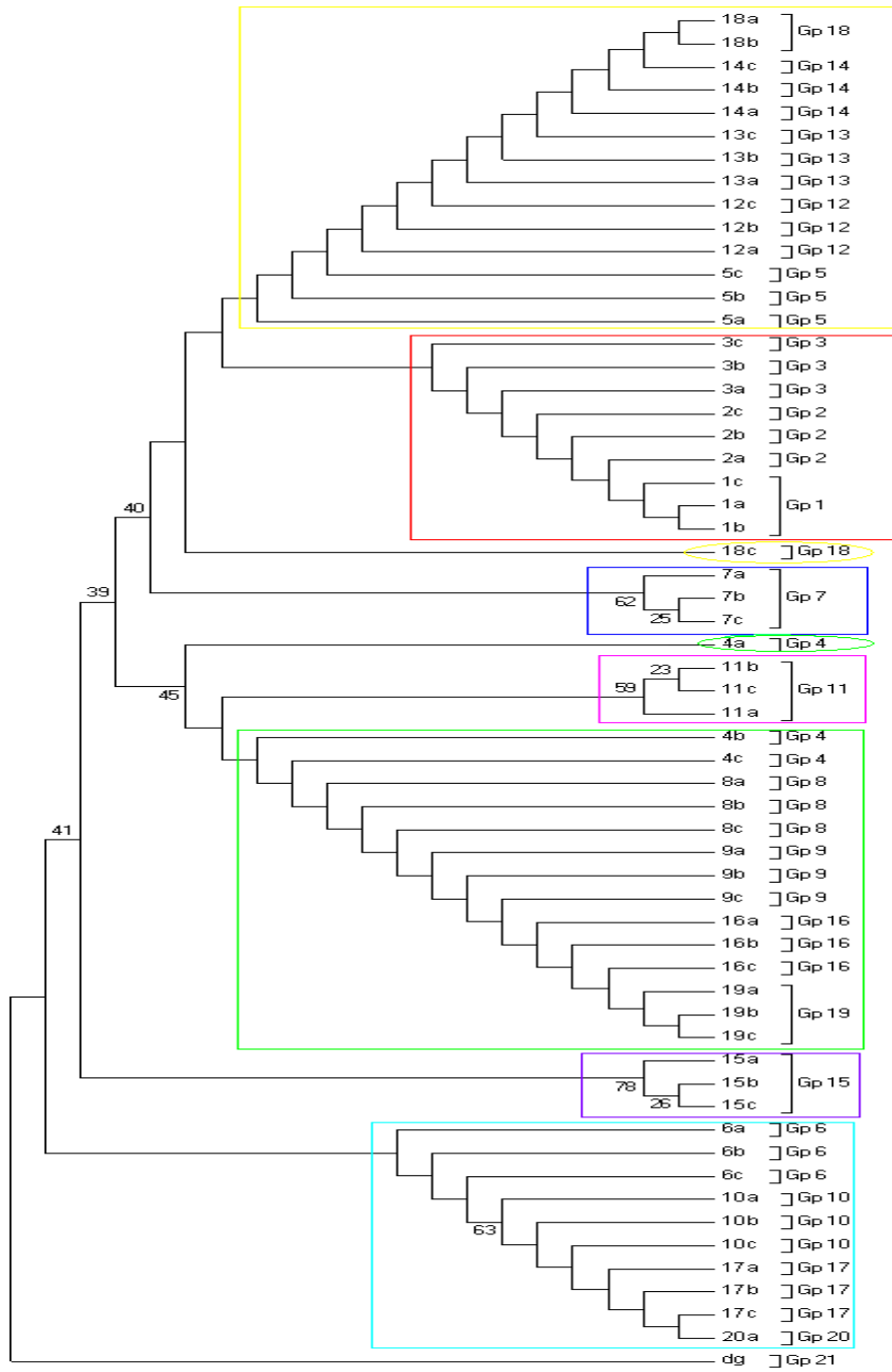
Çalışma kapsamında sekans dizilimi belirlenmiş 58 bireyin ve dış grup olarak kullanılan *Hypericum kamtschaticum*'un sekans bilgileri Mega programında düzenlendikten sonra, programın önce “Models” menüsünden “Find Best DNA/Protein” basamağı kullanılarak bireyler arasındaki filogenetik ilişkiyi en iyi biçimde ifade edecek metotlar belirlenmeye çalışıldı. Verilen metotlar listesinde en düşük “BIC” (Bayesian Information Criterion) değerine “T92” (Tamura-3-parameter) ve “JC” (Jukes Cantor) metotlarında rastlanıldı. T92'ye göre bireyler arasındaki filogenetik ilişkileri görebilmek için Maximum Likelihood başta olmak üzere, Neighbor-Joining, UPGMA ve Maximum Parsimony gibi yöntemlerden herhangi biri kullanılarak filogenetik ağaç çizilebilir.

Önce bireyler bazında daha sonrada bireyleri kendi arasında gruplayarak gruplar bazında Maximum Likelihood, Neighbor-Joining, UPGMA ve Maximum Parsimony yöntemlerinin her biri ayrı ayrı denendi, ancak çalıştığımız bireyler arasındaki evrimsel ve filogenetik ilişkiyi en iyi biçimde ortaya koyan yöntemin Maximum Likelihood yöntemi olduğuna karar verildi ve bu yöntemde bootstrap değeri 100 girilerek filogenetik ağaç yapıldı. Bireysel ağaç Şekil 3.4'de, grup ağacı ise Şekil 3.5'de gösterildiği gibi elde edildi.



Şekil 3.4. Bireyler arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Maximum Likelihood ağacı

1. *H. thymbrifolium*, 2. *H. olivieri*, 3. *H. lydiu*, 4. *H. scabrum*, 5. *H. elongatum* var. *elongatum*, 6. *H. spectabile*, 7. *H. thymopsis*, 8. *H. pseudolaeye*, 9. *H. salsolifolium*, 10. *H. amblysepalum*, 11. *H. helianthemoides*, 12. *H. uniglandulosum*, 13. *H. retusum*, 14. *H. capitatum* var. *capitatum*, 15. *H. lysimachioides* var. *lysimachioides*, 16. *H. scabroides*, 17. *H. lysimachioides* var. *spatulatum*, 18. *H. capitatum* var. *luteum*, 19. *H. microcalycinum*, 20. *H. sorgerae*, 21. Dış grup (*Hypericum kamtschaticum*)



Şekil 3.5. Gruplar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Maximum Likelihood ağacı

1. *H. thymbrifolium*, 2. *H. olivieri*, 3. *H. lydiun*, 4. *H. scabrum*, 5. *H. elongatum* var. *elongatum*, 6. *H. spectabile*, 7. *H. thymopsis*, 8. *H. pseudolaeye*, 9. *H. salsolifolium*, 10. *H. amblysepalum*, 11. *H. helianthemoides*, 12. *H. uniglandulosum*, 13. *H. retusum*, 14. *H. capitatum* var. *capitatum*, 15. *H. lysimachioides* var. *lysimachioides*, 16. *H. scabroides*, 17. *H. lysimachioides* var. *spathulatum*, 18. *H. capitatum* var. *luteum*, 19. *H. microcalycinum*, 20. *H. sorgerae*, 21. Dış grup (*Hypericum kamtschaticum*)

Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’de verilen her iki ağaç incelendiğinde bireysel de gruplandırmada da filogenetik ilişkilerin aynı şekilde çıktığı göze çarpmaktadır. *Hypericum capitatum* var. *luteum* (18a, 18b) ile diğer varyete *H. capitatum* var. *capitatum* (14a, 14b, 14c)’un birbirine oldukça yakın ve *H. retusum* (13a, 13b, 13c), *H. uniglandulosum* (12a, 12b, 12c), *H. elongatum* var. *elongatum* (5a, 5b, 5c) ile aynı kladda (clade) yer aldığı görülmektedir. *H. lydiun* (3a, 3b, 3c), *H. olivieri* (2a, 2b, 2c) ve *H. thymbrifolium* (1a, 1b, 1c) ise kendi arasında klad oluşturmuş diğer türlerdir. *H. thymopsis*’in bu üç tür ile yakın olduğu görülse de bireylerinin (7a, 7b, 7c) kendi içinde küçük bir klad oluşturduğu göze çarpmaktadır.

H. helianthemoides (11a, 11b, 11c) bireyleri kendi içinde küçük bir kladda toplansa da, *H. scabrum* (4b, 4c), *H. pseudolaeve* (8a, 8b, 8c), *H. salsolifolium* (9a, 9b, 9c), *H. scabroides* (16a, 16b, 16c) ve *H. microcalysinum* (19a, 19b, 19c)’un oluşturduğu daha büyük kladda bir noktada birleşerek yakınlık göstermektedir. Ağaç incelendiğinde açık mavi renkle gösterilen kladın *H. spectabile* (6a, 6b, 6c), *H. amblysepalum* (10a, 10b, 10c), *H. lysimachioides* var. *spathulatum* (17a, 17b, 17c) ve *H. sorgerae* (20a) taksonlarından oluştuğu görülmektedir. *H. lysimachioides* türünün diğer varyetesi olan *H. lysimachioides* var. *lysimachioides* (15a, 15b, 15c)’in bireyleri kendi arasında küçük bir klad oluşturmuş ve *H. lysimachioides* var. *spathulatum*’dan farklı bir kladda yer almıştır.

H. spectabile, *H. amblysepalum*, *H. lysimachioides* var. *spathulatum* ve *H. sorgerae* taksonlarının oluşturduğu klad, çalışılan diğer taksonların yer aldığı kladlardan farklı bir gruplama oluşturduğunu filogenetik ağaçta görmek mümkündür. Dış grup olarak kullandığımız *Hypericum kamtschaticum* ise (grup 21) diğer bütün bireylerden ayrı ve bağımsız tek başına bir kladda yer almaktadır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Türkiye Florası yazıldığı dönemde gerek sınırlı zaman gerekse sınırlı materyallerle çalışıldığı için sadece morfolojik karakterler dikkate alınabilmektedir. Bu yüzden birçok cinsin türlerinde, hatta seksiyonlarında açığa kavuşturulmamış taksonomik sorunlar vardır. Bu durumda olan cinslerin problemlerinin saptanarak daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerekliliği taksonomistleri yeni revizyon ve monografların oluşturulması yönünde yoğun çabalara sevk etmiştir. Bu tarz problemler Hypericaceae familyasına ait *Hypericum* cinsinde de mevcuttur. Cins üyelerinin adları, sistematik pozisyonları günümüzde de son yapılan çalışmalara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin; Robson'un 2010 yılında yapmış olduğu "Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 5(2). Sections 17. *Hirtella* to 19. *Coridium*" adlı çalışmada; *Hirtella* (*Drosanthe*) seksiyonunda yer alan *Hypericum elongatum*'un 3 alttürü mevcutken bu yayımla birlikte, alttür *microcalycinum* ve *apiculatum* tür seviyesine çıkartılmış, *H. elongatum* türü ise 3 varyete şeklinde (var. *antasiaticum*, var. *elongatum* ve var. *lythrifolium*) yeniden düzenlenmiştir.

Son yıllarda bitkilerin moleküler evrim ve sınıflandırma çalışmalarında kloroplast DNA önemli ölçüde kullanılmaya başlanmıştır. Kloroplast DNA'nın genom boyutu ve yapısı, nükleer DNA'dan daha düşük bir mutasyon oranına sahip olması, maternal kalıtım sergilemesi ve nispeten evrim açısından korunmuş olması, araştırmacıların onu ideal bir sistem olarak benimsemesini sağlamıştır. Bunun sonucunda da türler arasındaki organel genom varyasyonunun belirlenmesinde kloroplast dizi analizleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Clegg ve ark., 1994; Wei ve ark., 2005).

Kloroplast DNA'nın kodlanmayan bölgelerden biri olan; *trnL-trnF* bölgesi familya altı kategorilerin filogenetik akrabalıklarını belirlemede geniş ölçüde kullanıldığından dolayı bizim çalışmamızda da tercih edilen kısım olmuştur (Taberlet ve ark., 1991; Kelchner 2000). Evrimsel akrabalıkları ve bireyler arasındaki çeşitliliği belirlemek amacıyla kloroplast DNA'nın *trnL3'* ve *trnF* bölgeleri arasındaki kısım e ve f primer seti kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR'da çoğaltma işlemine geçmeden önce DNA miktar ve kalite tayini yapılmıştır. Sekans analiz sonuçları da kullanılarak bireylerin; nükleotid kompozisyonu, AT ve GC oranları, korunmuş bölgeler, varyasyonlu bölgeler, bilgi verici kısımlar, homolog baz çiftleri, transitiyonel ve transversiyonel çiftler, nükleotid çeşitliliği ve standart hata ile gruplar arası genetik mesafe değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sekans sonuçları Maximum Likelihood yöntemi kullanılarak bireyler ve gruplar bazında filogenetik ağaç (kladogram) hazırlanmıştır.

Bu sayede bireyler ve gruplar arasındaki genetik yakınlık ve uzaklık belirlenmiş, taksonlar arası akrabalık ve sistematik ilişkiler tespit edilmiştir. Şekil 3.4 ve 3.5’de verilen her iki ağaç incelendiğinde *Drosanthe* seksiyonu üyelerinin polifiletik bir yapı sergiledikleri söylenebilir. Çalışılan taksonların moleküler sonuçlara göre ortaya çıkan durumları, hem moleküler filogenetik açıdan hem de morfolojik açıdan değerlendirilmiştir. Morfolojik karşılaştırmalar sırasında, seksiyonla ilgili son yapılan düzenlemeleri içermesi bakımından Yüce (2009) tarafından hazırlanmış morfolojik teşhis anahtarından faydalanılmıştır.

Filogenetik kladograma göre; *Hypericum capitatum* var. *luteum* (18) ile diğer varyete *H. capitatum* var. *capitatum* (14)’un birbirine oldukça yakın ve *H. retusum* (13), *H. uniglandulosum* (12), *H. elongatum* var. *elongatum* (5) ile aynı kladda (clade) yer aldığı görülmektedir. Bir türe ait iki varyetenin aynı kladda yer alması gayet doğal bir sonuçtur, ancak *H. capitatum*’un her iki varyetesinin de aynı kladda yer alan diğer türlerden (13, 12, 5) farklı olarak, çiçeklenme durumu küremsiden hemen hemen küremsiye, gövdesi tüysüz, petalleri genellikle koyu kırmızımsıdan portakal sarısına ve yaprakları yuvarlaktır. Diğer türlerin ise çiçeklenme durumu hemen hemen başak veya silindir şeklinde olup, *H. uniglandulosum* (12)’un gövde ve yaprakları kısa havlı tüylüden tüysüze kadar değişkenlik gösterirken, *H. retusum* (13)’un gövde yaprakları şeritsi ya da dar lanseolat, petalleri kırmızımsı ya da kırmızı damarlı değil, gövde, yaprak ve petalleri genellikle noktalı, siyah guddeli, sepalleri 2 siyah çizgili, *H. elongatum* var. *elongatum*(5)’un ise; yaprakları mukronattan yuvarlağa, gövde, yaprak ve petalleri siyah guddesiz, sepaller siyah çizgili değil, petalleri kırmızımsı ya da kırmızı damarlı, çiçeklenmesi dar silindirikten dar piramite değişkenlik gösterdiğinden aynı kladda yer alan bu taksonların morfolojik açıdan pek de benzer oldukları söylenemez. Ancak Yüce (2009) tarafından yapılmış morfolojik ve morfometrik karakterlere dayanan kümeleme analizine göre de; *Hypericum capitatum* var. *luteum* (18) ile diğer varyete *capitatum* (14)’un kendi aralarında birleşerek en küçük ve anlamlı kümeyi oluşturdukları (A kümesi) ve yine aynı kümeleme analizinde *H. uniglandulosum* (12) ile *H. retusum* (13)’un aynı kümede (E kümesi) yer aldığı bildirilmektedir. Yine Yüce (2009) tarafından uçucu yağ bileşenleri dikkate alınarak hazırlanmış kimyasal teşhis anahtarına göre de, filogenetik ağacımızda aynı kladda yer alan *H. capitatum* var. *capitatum* (14), *H. retusum* (13) ve *H. uniglandulosum* (12) taksonlarının, en yüksek uçucu yağ bileşenlerinin α -pinen olması bakımından da benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca Şekil 3.3’de gösterilen varyasyon açısından bilgi verici olan 18., 76.,

89., 97., 164. ve 166. bazlarda herhangi bir değişimin olmadığı aynı kladda toplanan bu 5 taksonda da bu bazların sırasıyla C, C, C, C, A ve C şeklinde olduğu belirlenmiştir.

H. lydium (3), *H. olivieri* (2) ve *H. thymbrifolium* (1) ise Şekil 3.4 ve 3.5'e göre aynı kladda yer alan diğer türlerdir. Bu türlerin çiçeklenme durumu benzer görünümde, hemen hemen başak şeklinden silindiriğe kadar değişen yapıda olup, üçünde de gövde yaprakları serbest, tabanda kuneat, diğerlerine nazaran daralmış, şeritsi ya da dar lanseolat tiptedir, petalleri kırmızımsı ya da kırmızı damarlı değil, gövde guddeleri çok sayıda ve belirgin olduğundan aynı kladda toplanan bu üç türün (3, 2, 1) morfolojik olarak da benzer olduğunu söylemek mümkündür. Ancak *H. thymbrifolium* (1) ve *H. olivieri* (2)'de kapsül küremsi, kısa gagalı veya gagasızken, *H. lydium* (3)'da kapsül yumurtamsı ve belirgin gagalıdır. Ağacımızda (Şekil 3.4 ve 3.5) aynı kladda toplanan bu üç türden *H. lydium* (3) ve *H. thymbrifolium* (1) türleri, Yüce (2009)'nin uçucu yağ bileşenlerini dikkate alarak hazırladığı kimyasal teşhis anahtarına göre de, en yüksek uçucu yağ bileşenlerinin α -pinen olması bakımından da benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu 3 türün, varyasyon açısından bilgi verici bazların durumu incelendiğinde (Şekil 3.3) herhangi bir varyasyon göstermeyerek C, C, C, C, A ve C baz dizilimini sergilediklerinden aynı kladda toplanmaları olağan bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. *H. thymopsis* (7)'in bu üç tür (1, 2, 3) ile yakın olduğu görülse de bireylerinin kendi içinde küçük bir klad oluşturma nedeni de; çiçeklenme durumunun küremsiden hemen hemen küremsiye, gövdenin skabrit tüylü ya da tüysüz oluşu, yapraklarının apikulat veya mukronat, gövde guddelerinin dallanmış ve gövde boyunun diğerlerinden oldukça kısa (3-11 cm) olması ile kendine has karakterler göstermesidir. Şekil 3.3'de, 76. bazın seksiyonun diğer tüm taksonlarında ve bireylerinde C şeklinde olduğu, sadece *H. thymopsis*'in bireylerinde T şeklinde varyasyon gösterdiği dikkate alındığında, bu türün bireylerinin tek başlarına küçük bir kladda toplanmaları beklenen bir sonuç olmuştur.

H. helianthemoides (11) bireyleri kendi içinde küçük bir kladda toplansa da, *H. scabrum* (4), *H. pseudolaeve* (8), *H. salsolifolium* (9), *H. scabroides* (16) ve *H. microcalycinum* (19)'un oluşturduğu daha büyük kladla ve *H. thymopsis* (7)'in oluşturduğu küçük kladla da bir noktada birleşerek yakınlık göstermektedir. *H. helianthemoides* (11), *H. pseudolaeve* (8), *H. salsolifolium* (9) ve *H. microcalycinum* (19)'un çiçeklenme durumu benzer olup, başak şeklinden piramite kadar değişen bir yapıdadır. *H. helianthemoides* (11) ve *H. pseudolaeve* (8)'da gövde yaprakları serbest, şeritsi dar lanseolat, gövde, yaprak ve petalleri siyah guddesiz, sepalleri siyah çizgili değil, kapsül küremsi kısa gagalı ya da gagasız olması gibi özellikler aynıdır. *H. pseudolaeve* (8) ve *H. salsolifolium* (9) brakteleri siyah guddeli olmasıyla diğerlerinden ayrılır. *H. salsolifolium* (9)'da sepaller kabartılı, gövde ve yapraklar

kısa havlı tüylüdür. *H. scabrum* (4) ve *H. scabroides* (16) ise aynı kladda yer alan diğer türlerden (8, 9, 19) çiçeklenme durumunun küremsi (korimboz) ya da hemen hemen küremsi (subkorimboz) olmasıyla farklılık gösterirler. Ağacımıza göre (Şekil 3.4 ve 3.5); *H. scabrum* (4) ve *H. scabroides* (16) türlerinin aynı kladda yer alması Robson (1977) ve Türkiye Florası (Davis ve ark., 1967)'nda belirtilen morfolojik betimleri ile uygun bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Filogenetik ağacımıza (Şekil 3.4 ve 3.5) göre aynı ve yakın kladlarda yer alan bu türlerden; *H. scabrum* (4) ve *H. scabroides* (16) türlerinin Yüce (2009)'nin morfolojik ve morfometrik karakterlere dayanan kümeleme analizinde de aynı kümede (B kümesi), *H. pseudolaeye* (8), *H. salsolifolium* (9), ve *H. microclycinum* (19) türlerinin de yine aynı kümede (E kümesi) yer aldıkları tespit edilmiştir. Bu türlerden; *H. scabrum* (4), *H. scabroides* (16), *H. salsolifolium* (9), *H. microclycinum* (19), *H. helianthemoides* (11) ve *H. thymopsis* (7) türlerinin, Yüce (2009)'nin uçucu yağ bileşenlerini dikkate alarak hazırladığı kimyasal teşhis anahtarında, en yüksek uçucu yağ bileşenlerinin α -pinen olması bakımından da benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 3.3 incelendiğinde; *H. scabrum*, *H. scabroides*, *H. pseudolaeye*, *H. salsolifolium*, ve *H. microclycinum* türlerinin 164. bazda gösterdikleri varyasyona göre (A yerine C) aynı kladda toplanmaları filogenetik ağacımızda beklenen bir durumdur. *H. helianthemoides* bireyleri kendi arasında küçük bir kladda toplansa da 164. bazda aynı varyasyonu (A yerine C) sergilediğinden bu 5 takson ile bir noktada birleşerek yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir.

Şekil 3.4 ve 3.5'de verilen bireysel ve grup ağaçları incelendiğinde; *H. spectabile* (6), *H. amblysepalum* (10), *H. lysimachioides* var. *spathulatum* (17) ve *H. sorgerae* (20) taksonlarının ise kendi arasında bir kladda toplandıkları görülmektedir. Yüce (2009)'nin morfolojik teşhis anahtarında da; *H. spectabile* (6), *H. amblysepalum* (10), *H. lysimachioides* var. *spathulatum* (17) taksonlarının seksiyonda yer alan diğer taksonlardan ayrıldığını görmek mümkündür. Her üç taksonda da çiçeklenme durumu aynı olup, hemen hemen piramit şeklindedir. *H. spectabile* (6)'yi diğer iki taksondan ayırt etmemizi sağlayan en önemli özelliği perfoliat ya da geniş kordat, ampleksikaul, yarı dairemsiden, üçgenimsi ovata kadar değişebilen yaprak yapısıdır. *H. amblysepalum* (10) ve *H. lysimachioides* var. *spathulatum* (17)'da ise gövde yaprakları serbest, tabanda kuneat ve *H. spectabile* (6)'nin yapraklarına nazaran daha da daralmış durumdadır. *H. amblysepalum* (10)'u *H. lysimachioides* var. *spathulatum* (17)'dan ayıran en önemli özellik ise; sepallerinin yuvarlak, yapraklarının yuvarlak, tüysüz ya da yüzeyinin dalgalı-papillalı olmasıdır, *H. lysimachioides* var. *spathulatum* (17)'da sepaller akut, yapraklar obtustan, apikulat ya da akut, tüysüz ya da yüzeyi veya kenarları zayıf skabrit tüylüdür. Ayrıca bu türlerden; *H. spectabile* (6) ve *H.*

amblysepalum (10) türlerinin, Yüce (2009)'nin morfolojik ve morfometrik karakterlere dayanan kümeleme analizine göre de; aynı kümede (D kümesi) yer aldığı, *H. sorgerae*'nin ise farklı bir kümede yer almasına (C kümesi) rağmen daha sonra D kümesi ile birleştiği yani bir noktada *H. spectabile* ve *H. amblysepalum* türlerine yaklaştığı belirlenmiştir. Ayrıca 97. bazın C yerine T şeklinde varyasyon göstermesinden dolayı (Şekil 3.3), *H. spectabile*, *H. amblysepalum*, *H. lysimachioides* var. *spathulatum* ve *H. sorgerae* taksonlarının aynı kladda toplanmaları elde ettiğimiz datalarla uyuşan bir sonuç olmuştur. Yüce (2009)'nin morfolojik ve kimyasal dendogramları ile kloroplast genomunun *trnL-trnF* bölgesinden elde edilen moleküler verilerin birbirini büyük ölçüde destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir.

H. lysimachioides türünün diğer varyetesi olan *H. lysimachioides* var. *lysimachioides* (15)'in bireyleri kendi arasında küçük bir klad oluşturmuş ve *H. lysimachioides* var. *spathulatum* (17)'dan farklı bir kladda yer almıştır. Zaten bu iki varyete morfolojik açıdan da farklılıklar göstermekte olup, sepallerinin spathulat, sepal kenarlarının kısa saçaklı ve yapraklarının geniş oblongdan eliptiğe değişen yapısıyla *H. lysimachioides* var. *spathulatum* diğer varyeteden ayrılır (Davis ve ark., 1967). *H. lysimachioides* var. *lysimachioides* bireylerinin tamamen farklı bir kladda yer almaları Şekil 3.3'e göre de; 89. bazın C yerine T, 97. bazın C yerine T ve 164. bazın A yerine C şeklinde varyasyon göstermesiyle örtüşen bir durum olarak karşımıza çıkmıştır.

Dış grup olarak kullandığımız *Hypericum kamtschaticum*'un ise (grup 21) diğer bütün bireylerden ayrı ve bağımsız tek başına bir kladda yer aldığı görülmektedir, çalıştığımız seksiyona ait olmaması dolayısıyla bu olağan ve beklenen bir sonuçtur. Yüce tarafından analiz edilmeyen *H. olivieri*, *H. elongatum* var. *elongatum* ve *H. lysimachioides* var. *spathulatum* taksonları doğal habitatlarından toplanarak seksiyon ile ilgili çalışmamıza dahil edilmiştir.

Hindistan'daki *Citrus* L. (*Rutaceae*) cinsinde PCR-RFLP metodu kullanılarak yapılan filogeni çalışmasında, 50 farklı lokasyondan toplanmış olan yabani, yarı yabani ve tarımı yapılan *Citrus* türleri kullanılmıştır. Kloroplast genomundaki *trnD-trnT* ve *trnL-trnF* ara bölgeleri ile *rbcL* gen bölgesinin kullanıldığı çalışmada, PCR ürünleri 10 farklı restriksiyon enzim ile kesilip, toplam 47 DNA bandı elde edilmiş ve bu DNA bantlarından 24 tanesinin (%51) polimorfik olduğu, genetik mesafe oranının ise 0.00 ile 0.79 arasında değişim gösterdiği rapor edilmiştir (Jena ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda ise *trnL-trnF* ara bölgesinin e-f primerleri kullanılarak çoğaltılması sonucunda 59 birey arasındaki genetik mesafe oranının 0.00 ile 0.05 arasında değişim gösterdiği ve nükleotid çeşitliliğinin de 0.01 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre; en yüksek ayrımın *H. helianthemoides* (grup 11) ile *H. kamtschaticum* (grup 21) arasında olduğu belirlenmiştir.

“*Cercis* L. (Fabaceae)’in moleküler filogenisinde kloroplast DNA’sının *trn* L-F sekanslarının kullanımı” adlı çalışmada 13 *Cercis* taxonu ve bir de dış grup olarak *Bauhinia faberi* Oliv. kullanılmış ve elde edilen verilerden yararlanılarak filogenetik ağaç yapılmıştır. Çalışma sonunda % 0.064 oranla en yüksek ayrımın *C. racemosa* ve *C. chingii* ile *C. yunnanensis* ve *C. chingii* arasında olduğu tespit edilirken, *C. chingii* türünün cinsin diğer üyelerinden çok farklı olduğu ve *C. yunnanensis*, *C. racemosa*, *C. glabra*, *C. gigantea* ile *C. chuniana* türlerinin filogenetik ağaçta aynı yerde toplandıkları rapor edilmiştir (Coşkun ve Parks, 2009). Çalışma sırasında elde ettiğimiz verilerden yararlanarak hazırladığımız filogenetik ağaçta 0.05 oranla en yüksek ayrımın *H. helianthemoides* ile *H. kamtschaticum* arasında olduğu tespit edilirken, çalışılan taksonların daha çok 4 büyük kladda toplandığı, *H. thymopsis*, *H. helianthemoides*, *H. lysimachioides* var. *lysimachioides* bireylerinin ise kendi içlerinde küçük kladlar oluşturduğu ve dış grup olarak seçtiğimiz *H. kamtschaticum*’un ise diğerlerinden tamamen ayrı bir kladda yer aldığı belirlenmiştir.

Dünyada 115 türle temsil edilen *Luzula* DC. (Juncaceae) cinsinin 93 türü arasındaki moleküler filogeninin belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada; Maksimum Parsimony ve maksimum benzerlik analizlerinde kloroplast DNA’nın *trnL* intron bölgesi ile *trnL-trnF* ara bölgesi ve nüklear ribozomal DNA’nın ITS1-5.8S-ITS2 bölgeleri kullanılmıştır. Kloroplast ve nüklear genomlardaki birbirine uyuşmayan filogenetik sinyaller son yıllarda bu grup içinde melezleşme olduğunu göstermiştir (Drabkova ve Vlcek, 2010). Tez kapsamında sadece kloroplast genomu çalıştığımız için cins içindeki melezleşme durumları hakkında bir yorum yapamayız, ancak ileride yapılacak bir çalışmada nüklear genomunun da kullanılmasıyla kloroplast genomuna ait elimizdeki bilgilerle bu yeni bilgileri karşılaştırarak bu konu hakkında bir yorum getirilebilir.

Lamiaceae familyası Ocimeae soyuna ait ekonomik ve tıbbi değeri yüksek olan fesleğen (*Ocimum* L.) bitkisi ile ona akraba 27 cinsden 122 türün filogeni ve evriminin araştırıldığı bir çalışmada, kloroplast DNA’nın üç farklı bölgesinden (*trnL* intronu, *trnL-trnF* intergenik kesici bölgesi ve rps16 intronu) yararlanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturmak için, Maksimum Parsimony, Bootstrap ve Bayesian gibi birkaç istatistik metodun birlikte kullanıldığı çalışmada; morfoloji, perikarp anatomi, kimyasal ve polen karakterleri ile birlikte coğrafik dağılım da dikkate alınmıştır. Çalışma sonunda, Ocimeae soyunun monofiletik olduğu ve sonradan edindiği morfolojik karakterler sayesinde kolayca tanınabileceği rapor edilmiştir (Paton ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda da en iyi filogenetik ağacın Bayesian değerinin en düşük çıktığı Maximum Likelihood yöntemiyle yapılacağı belirlenmiş, bootstrap değeri 100 girilerek filogenetik ağaç hazırlanmıştır.

Korsika Adası'nda yetişen ve aynı iklimik şartlardan alınan *Teucrium flavum*'un L. iki alttürü (*T. flavum* subsp. *flavum* ve *T. flavum* subsp. *glaucum*) (Lamiaceae) arasındaki kimyasal ve genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla; her iki alttürün uçucu yağı GC-MS kullanılarak analiz edilmiş, kloroplast DNA'nın iki bölgesi (rpL32-trnL ve trnL-trnF) ile nüklear ribozomal DNA'nın ITS bölgesi de aynı çalışmada kullanılmıştır. Her iki alttürün kimyasal kompozisyonu genel anlamda benzer görünse de, *flavum* alttüründe hidrokarbonlu monoterpenlerin, *glaucum* alttüründe ise oksijenli bileşenlerin yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Genetik analizlerde de *T. flavum* populasyonlarının iki gruba bölündüğü, birinci grubu *glaucum* populasyonları oluştururken, diğer grubu da *flavum* populasyonlarının oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmayla, genetik geçmişlerinin fazla ve çevresel faktör değişkenliğinin az olmasından dolayı, her iki alttür arasındaki kimyasal farklılığın da az olduğu ispatlanmıştır (Djabou ve ark., 2011). Türkiye'den toplanan anti-inflamator, anti-romatizmal, anti-bakteriyel, anti-ülser, anti-alerjik ve anti-pasmodik gibi özellikleri bakımından önemli tıbbi bir bitki olan *Teucrium chamaedrys* L. türünün uçucu yağ kompozisyonunun GC ve GC-MS kullanılarak belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada; analiz edilen 36 bileşen içerisinde en çok germacren D (%32.1), β -karyofillen (%14.2), δ -kadinen (%13.1), bisiklogermakren (%6.7) ve β -farnesen (%4.3) bulunduğu rapor edilmiştir (Bağcı ve ark., 2010c). Benzer bir çalışmada da, antioksidan aktivitesi oldukça yüksek *Teucrium parviflorum* L. türünün uçucu yağ kompozisyonu yine GC ve GC-MS kullanılarak belirlenmiş; β -karyofillen (%18.6), germacren D (%9.2), karyofillen oksit (%8.8) ve bisiklogermakren (%6)'ın analiz edilen 33 bileşen içerisinde major bileşenler olduğu bildirilmiştir (Bağcı ve ark., 2011).

Echinops L. cinsinin (Asteraceae) moleküler sistematigi üzerine yapılan bir çalışmada ITS bölgesi ile kloroplast DNA'nın trnL-trnF bölgelerinin dizi analizleri, *Cenchrrolepis* ve *Pterolepis* seksiyonları hariç bütün *Echinops* seksiyonlarından temsili türler alınarak toplamda 89 örnek üzerinde incelenmiştir. Elde edilen veriler Maximum Parsimony ve Bayesian analizleri ile değerlendirilmiş ve oluşan filogenetik ağaç incelendiğinde *Echinops* cinsinin 8 gruptan oluştuğunu, %100 bootstrap değeri ile 2 ana soy hattı şeklinde gruplandığını görmüşlerdir. Birinci soy hattını %85 bootstrap değeri ile *Chamaechinops*, *Nanechinops* seksiyonlarından temsili türler ve *E. acantholepis* (= *Acantholepis orientalis*) türünün oluşturduğunu, ikinci soy hattını ise %72 bootstrap değeri ile diğer *Echinops* türlerinin oluşturduğunu belirtmişlerdir (Sanchez, 2010).

Asteraceae familyasının *Oligolepis* seksiyonuna ait *Echinops melitenensis* ve *Echinops phaeocephalus* türlerinin kloroplast DNA polimorfik yapılarını, PCR-RFLP ve DNA dizi analiz yöntemlerini kullanarak inceleyen bir çalışmada, bu türleri karşılaştırmak amacıyla *Ritrodes* seksiyonundan iki tür, *Echinops* seksiyonundan üç tür, bir alttür, dört varyete ve *Senecio* cinsinden de bir tür çalışmaya dahil edilmiştir. Kloroplast DNA'nın iki bölgesi (*trnH-trnK* ve *trnK* exon1- *trnK* exon2) bazı restriksiyon enzimlerince taranmış, 48'i polimorfik olmak üzere toplamda 81 bant bulunmuştur. Yine kloroplast DNA'da yer alan *rps16* geninin (800 bp) dizi analiz sonuçlarına göre; haplotip sayısı 11, haplotip çeşitliliği 0,9545, nükleotid çeşitliliği 0.01286 ve polimorfik bölge sayısı 45 olarak tespit edilmiştir (Özhüner, 2011). Bizim çalışmamızda da bireyler arasındaki nükleotid çeşitliliği 0.01 ve standart hata da 0.01 olarak tespit edilmiştir.

Hypericum cinsinin genetik çeşitliliğini ve *H. perforatum* L. türünün AFLP markırları kullanılarak tanımlanmasını içeren çalışmada, 11 *Hypericum* türünü temsil eden 56 farklı lokaliteden toplanan bireylerin yanı sıra *H. perforatum*'un kültür formu da kullanılmıştır. 4 primer kombinasyonunun kullanıldığı çalışmada; totalde 298 polimorfik bölge belirlenmiş ve bunlardan 17 tanesinin *H. perforatum*'un bütün lokalitelerinde ortak olduğu belirlenirken, 2 tanesinin sadece tek bir lokaliteye ait olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışmayla *Hypericum* türleri arasındaki akrabalık ilişkisini belirlemede AFLP'nin ucuz, basit ve doğru sonuç veren bir yöntem olduğu da rapor edilmiştir (Percifield ve ark., 2007).

ITS ve rDNA'nın 5.8S bölgesi kullanılarak PCR yardımı ile *Hypericum perforatum* L. türünün moleküler tanımını ortaya koyan çalışmada, 8 *Hypericum* türünün yanı sıra, *H. perforatum*'a ait 3 DNA örneğinin ITS dizilimleri kullanılmış ve *H. perforatum* türüne özgü PCR primerleri kısaca “mikrokod” dizilimi olarak tanımlanmıştır. En etkili primer kombinasyonu kullanıldığında *H. perforatum*'a ait DNA örneklerinin tamamı çoğaltılırken, kullanılan diğer türlerden yalnızca *H. delphicum*'a ait DNA örneği çoğaltılmıştır. Kullandıkları bu primeri bitkisel ilaç olarak ve “Sarı Kantron” adıyla satılan, örnek üzerinde de denemiş ve pozitif sonuç almışlardır (Howard ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da kullanılan e-f primerleri ile seksiyon üyelerinin çoğunun kloroplast DNA'sının *trnL-F* bölgesinin sekans dizilim bilgisi elde edilmesine rağmen, aynı primerler *H. davisii*, *H. apricum* ve *H. apiculatum* türleri üzerinde sonuç vermemiştir.

Hypericum perforatum'un Avusturalya populasyonlarının üretim biçimlerinin DNA parmakizi ve sitolojik metodlar kullanılarak açığa çıkarılmasını amaçlayan çalışmada, RFLP ve AFLP moleküler teknikleri birlikte kullanılmıştır. İki Avustralya populasyonu arasında totalde 22 RFLP markırından 14 tanesinde polimorfizm tespit edilmiştir. Aynı parmakizine

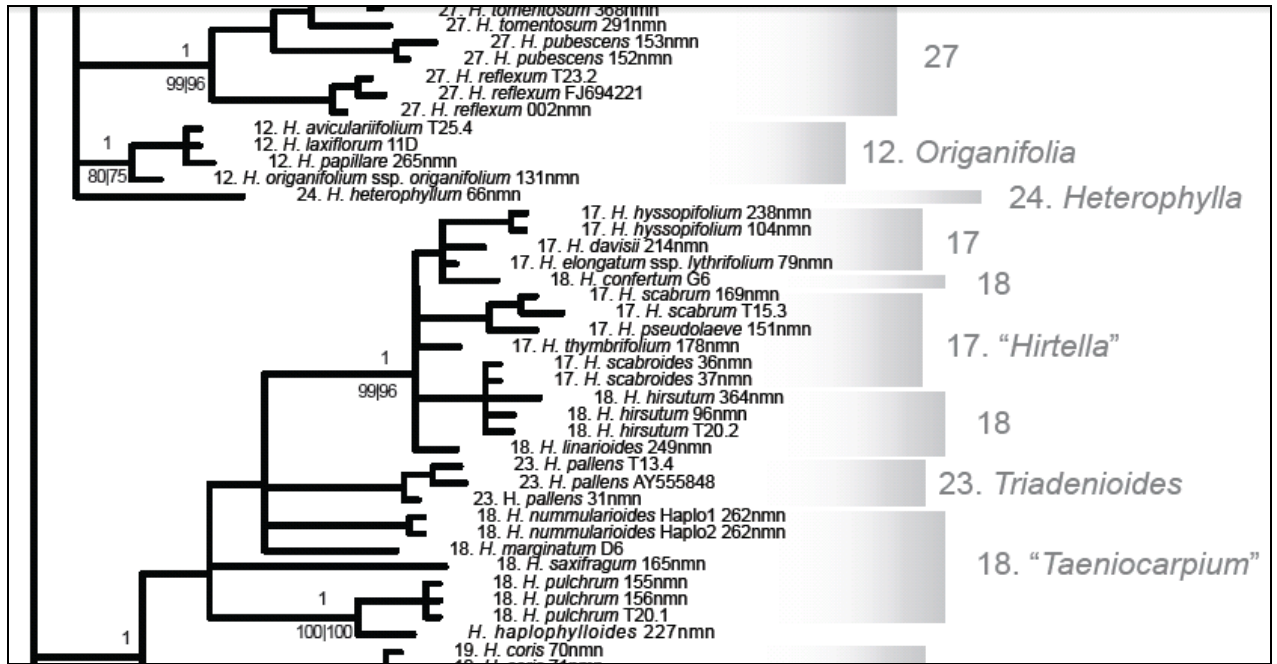
sahip iki populasyon arasında yapılan 4 çaprazlama sonunda oluşan 7 rekombinant fideden üç tanesinin tetraploid ($2n=4x=32$), üç tanesinin hekzaploid ($2n=6x=48$) ve bir tanesinin anoploid ($2n-1=31$) olduğu rapor edilmiştir (Mayo ve Langridge, 2003). Zaten cins içerisinde tetraploid ve hekzaploid bireylerin mevcut olduğu, Robson (1981) tarafından yapılmış çalışmalarda da rapor edilmiştir.

Kore ve Japonya'dan toplanan *Hypericum* cinsi üyelerinin moleküler filogenisinin, nükleer DNA'nın ITS dizilim bilgisinden yararlanılarak açıklanması sırasında grup içi olarak 36 *Hypericum* türü ile birlikte grup dışından 2 *Thornea* türü birlikte analiz edilmiştir. Bu çalışmayla; kullanılan *Hypericum* türlerinin bir kısmının monofiletik bir seksiyon olan *Trigynobrathys*'e geri kalanların ise polifiletik bir seksiyon olan *Hypericum* seksiyonuna ait olduğu belirlenmiştir (Park ve Kim, 2004).

Senni ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada; Japonya ve Rusya'dan toplanan 23 alpin bitkisinin genetik farklılıklarını ve türler arası varyasyonlarını belirlemek amacıyla kloroplast DNA'nın kodlanmayan iki bölgesinin (*trnT-trnL-trnF* bölgesi ve rp116 intronu) sekans dizilimi kullanılmış ve *Carex scita* dışındaki diğer türlerde intraspesifik farklılıklar belirlenmiştir. Kodlanmayan *trnL* 5' ekzon ile *trnF* bölgesi arasındaki kısımda, *H. kamtschaticum*'da 628, *Carex stenantha*'da 1016, *Gentiana algida*'da 752, *Diapensia lapponica*'da 1338 baz çiftinin sekans dizilimi belirlenmiştir. Mutasyon oranlarının çalışılan diğer türlere nazaran *Anemone narcissiflora* (%0.90), *Arenaria arctica* (%0.74), *Geum calthifolium* (%0.86), *Hypericum kamtschaticum* (%1.04), *Pedicularis yezoensis* (%1.18) ve *Trollius riederianus* (%0.77) gibi türlerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmayla sekans dizilimi belirlenen *H. kamtschaticum*'un verileri NCBI'da AB219639.1 referans numarasıyla kayıtlı olup, çalışmamızda kullanılan dış grubu oluşturmuştur.

Sırbistan'ın farklı lokalitelerinden toplanan 6 *Hypericum* türünün (*H. hirsutum*, *H. linarioides*, *H. maculatum*, *H. barbatum*, *H. rumeliacum* ve *H. tetrapterum*) genetik profilini belirlemek amacıyla RAPD ve SSR tekniklerinden yararlanılmış, başlangıçta rastgele seçilen 52 primerin kullanılmasıyla, 111 polimorfik markır elde edilmiş, SSR analizleri sırasında kullanılan 18 primerden 8'nin polimorfik olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonunda RAPD verilerine göre hazırlanan filogenetik ağaçta; *H. tetrapterum* ile *H. maculatum* türlerinin bir kladda, *H. hirsutum*, *H. barbatum* ve *H. rumeliacum* türlerinin de birlikte ikinci bir kladda, *H. linarioides* türünün ise tek başına farklı bir kladda yer aldığı görülmektedir. SSR verilerine dayanarak hazırlanan dendogramda ise; *H. tetrapterum*, *H. rumeliacum*, *H. maculatum* ve *H. barbatum* türlerinin birlikte bir kladda toplandığı, *H. hirsutum* ve *H. linarioides* türlerinin de tek başlarına ayrı kladlarda yer aldığı tespit edilmiştir (Smelcerovic ve ark., 2006).

Nürk tarafından (2011) yapılan *Hypericum* cinsinin filogenetik analizleri adlı doktora tezinde DNA'nın ITS bölgesi kullanılmış ve elde edilen 366 bazlık sekans diziliminden yararlanılarak filogenetik ağaç hazırlanmıştır. Hazırlanan bu ağaçta bizim çalıştığımız taksonların yer aldığı *Hirtella* (*Drosanthe*) seksiyonunun olduğu kısım Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Hirtella* seksiyonunun da yer aldığı filogenetik ağaç (Nürk, 2011)

Bu ağaca göre; çalışmamızda yer alan taksonların bulunduğu *Hirtella* seksiyonuna ait *H. scabrum*, *H. scabroides*, *H. thymbrifolium*, *H. pseudolaeve*, *H. davisii* ve *H. elongatum* subsp. *lythrifolium* bireylerinin büyük bir kladda toplandığı görülmektedir. Türkiye’de kaydı bulunmayan ama *Hirtella* seksiyonunda yer alan *H. hyssopifolium* türü de bu klad içerisinde yer almaktadır. Ayrıca *Taeniocarpium* seksiyonuna ait *H. confertum*, *H. linarioides* ve *H. hirsutum* taksonlarının da *Hirtella* seksiyonuna ait 7 taksonun bulunduğu kladda yer alması dikkat çekici olmuştur (Nürk, 2011). Yukarıda verilen ağaca göre iç içe geçen *Hirtella* (17) ve *Taeniocarpium* (18) seksiyonları Robson tarafından 1977 yılında yapılan monograf çalışmasında da, bu cins içinde yer alan diğer seksiyonlara göre yakın iki seksiyon olduğu görülmektedir. Türkiye Florası’na göre ise *Hirtella* seksiyonu üyeleri C grubunda yer alan

Drosanthe seksiyonu içerisinde yer almaktadır. C grubuna en yakın olan D grubu üyelerinin çoğu ise *Taeniocarpium* seksiyonuna aittir. Bu iki grup (C ve D) ise; petallerin tırnaklı veya tırnaksız, kırmızı damarlı veya değil, şeffaf guddeli veya çizgili guddeli, gövdenin köklü veya köksüz olma durumuna göre birbirinden ayrılmaktadır (Davis ve ark., 1967).

Nürk (2011)'ün elde ettiği filogenetik ağaçta; *H. scabrum* ile *H. pseudolaeve* türlerinin kendi aralarında küçük bir klad oluşturduğu, *H. thymbrifolium* türünün ise bu iki türün toplandığı klada yakın kendi başına farklı bir kladda yer aldığı görülmektedir. *H. scabroides* ile *H. hirsutum* türleri de aynı kladda yer alıp, diğer taksonlardan ayrılmıştır. *H. hyssopifolium*, *H. davisii*, *H. elongatum* subsp. *lythrifolium* ve *H. confertum* taksonları da kendi aralarında birleşerek bir klad oluşturmuşlardır. Bizim çalışmamız sonucunda elde edilen Şekil 3.4 ve 3.5'de gösterilen filogenetik ağaçta da; *H. scabrum* ile *H. pseudolaeve* türlerinin aynı kladda yer alması Nürk'ün çalışmasıyla benzerlik gösteren bir durumdur.

Çalıştığımız taksonların sekans dizilimine dayanarak hazırlanan filogenetik ağaçta (Şekil 3.4 ve 3.5) *H. capitatum*'un her iki varyetesinin aynı kladda yer alması, Türkiye Florası (Davis ve ark., 1967), Robson'un 1977'de yaptığı monograf çalışması ve Yüce (2009) tarafından hazırlanmış morfolojik teşhis anahtarında verilen betimiyle uygunluk göstermektedir. Aynı şekilde bu çalışmalarda morfolojik olarak birbirine yakınlık gösteren *H. scabrum* ve *H. scabroides* türleri de filogenetik ağacımızda aynı kladda yer alarak, morfolojik betimlerine uygun bir durum sergilemiştir. Bu iki türün Yüce (2009)'nin uçucu yağ bileşenlerini dikkate alarak hazırladığı kimyasal teşhis anahtarında da benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. *H. spectabile*, *H. amblysepalum* ve *H. lysimachioides* var. *spathulatum* taksonlarının literatürlerde (Davis ve ark., 1967; Robson, 1977 ve Yüce 2009) yer alan morfolojik betimlerindeki benzerlik, bu türlerin filogenetik ağacımızda aynı kladda toplanmaları ile de desteklenmiştir.

Yaprak ve sepal yapıları oldukça farklı olan *H. lysimachioides* var. *lysimachioides* ile diğer varyete *spathulatum*'un ağacımızda da farklı kladlarda yer alması, bu iki taksonun yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ile ayrı türler olarak yeniden düzenlenebileceği fikrini doğurmuştur.

Filogenetik ağacımızda yeni adlandırmaya göre *H. microcalycinum* (Robson, 2010), yani eski adıyla *H. elongatum* subsp. *microcalycinum* (Davis, ve ark., 1988) diğer alttür *H. elongatum* subsp. *elongatum* yeni adlandırılması ile *H. elongatum* var. *elongatum* ile (Robson, 2010) çok farklı ve birbirinden uzak kladlarda yer alması bunların çalışılan bölge bakımından birbirinden farklı olduğu anlamını taşır ki; ağacımızda ortaya çıkan bu durum son yapılan düzenlemelerle (Robson, 2010) bu iki alttürün gerçekte alttür olamayacağı sonucunu destekler nitelikte olup, oldukça önemli bir ayrım olarak tespit edilmiştir.

Hypericum cinsi *Drosanthe* seksiyonu ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda; seksiyon üyelerinin morfolojik ve anatomik özellikleri ile polen karakterleri ve uçucu yağ kompozisyonları belirlenmiş, ortaya konan verilerin, morfolojik ve kimyasal dendogramların, fenetik benzerlik ve farklılıkların, bizim elde ettiğimiz kloroplast DNA'nın *trnL-F* bölgesi sekans dizilimine göre ortaya çıkan filogenetik kladogram sonuçları ile büyük ölçüde örtüştüğü tespit edilmiştir. Dolayısıyla bizim elde ettiğimiz moleküler datalarla daha önce ortaya konan datalar birleştirildiğinde seksiyon üyelerine ait geniş bir veri tabanının ortaya konulacağı ve bütün bunların seksiyon ile ilgili ilerde yapılacak çalışmalarda yol gösterici temel bilgiler olacağı kanaatindeyiz. Çalışma kapsamında kullanılan bütün taksonların *trnL-F* bölgesinin sekans diziliminden yararlanarak hazırladığımız filogenetik ağaca göre *Drosanthe* seksiyonu üyelerinin polifiletik bir grup oluşturduğunu söylemek mümkündür. Morfolojik olarak birbirinden oldukça farklı bir profil çizen seksiyon üyelerinin çalışılan moleküler bölge bakımından da farklı kladlarda yer alması taksonlar arasındaki yüksek farklılık oranlarını doğrulamaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, R., Liowb, P., David, F., Spencer, D.F. and Jasieniuk, M., 2008. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States, *Aquatic Botany*, **88**,113–120.
- Alberts B., Johnson, A. and Lewis, J., 2002. DNA and chromosomes : Chromosomal DNA and Its Packaging in the Chromatin Fiber, *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Newyork.
- Anonim, 2006. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Mitokondri>
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering Plant, *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, **408**, 796–815.
- Asif, M.H., Mantri, S.M., Sharma, A., Srivastava, A., Trivedi, I., Gupta, P., Mohanty, C.S., Sawant, V.S. and Tuli, R., 2010. Complete Squence and organisation of the *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) chloroplast genome, *Tree Genetic & Genomes*, **6**, 941-952.
- Bağcı, E. and Yüce, E., 2010a. Constituents of the essential oils of two varieties (var. capitatum and var. luteum) of *Hypericum capitatum* from Turkey, *Journal of Essentail Oil Bearing Plants*, **14** (1), 106-113.
- Bağcı, E. and Yüce, E., 2010b. The essential oils of the aerial parts of two *Hypericum* (*H. pseudolaeye* Robson and *H. thymbrifolium* Boiss. & Noë) species from east anatolian region of Turkey, *Journal of Essential oil Bearing Plants*, **18** (3).
- Bağcı, E., Yazgın, A., Hayta, Ş. and Çakılcioglu, U., 2010c. Composition of the essential oil of *Teucrium chamaedrys* L. (Lamiaceae) from Turkey, *Journal of Medicinal Plants Research*, **4** (23), 2588-2590.
- Bağcı, E., Hayta, Ş., Yazgın, A., and Doğan G., 2011. Composition of the essential oil of *Teucrium parviflorum* L. (Lamiaceae) from Turkey, *Journal of Medicinal Plants Research*, **5** (15), 3457-3460.
- Bakker, F.T., Culham,A., Gomez-Martinez, R., Carvalho, J., Compton, J., Dawtrey, R. and Gibby, M., 2000. Patterns of nucleotide substitution in angiosperm cpDNA trnL (UAA)-trnF (GAA) regions, *Molecular Biology. Evoution*, **17**, 1146-1155.
- Bayer, R.J. and Star, J.R., 1998. Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the trnL intron and trnL/trnF intergenic spacer, *Ann, Missouri Botanic Garden*, **85**, 242-256.

- Bennett, M.D. and Leitch, I.J.**, 2003. Plant DNA C-value database. Release 2.0. Royal Botanical Gardens, Kew, West Sussex, U.K.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. and Clarke, N.D.**, 2002. Biochemistry, DNA, RNA, and the flow of genetic information : Amino acid are encoded by groups of three bases starting from a fixed point, **5th edition**, New York: W.H. Freeman and Company, I, 5.
- Bretting, P.K. and Widrechner, M.P.**, 1995. Genetic Marker and Horticultural Germplasm Management, *Hortscience*, **30** (7), 1329-1356.
- Brown, T.A.**, 2002. Genomes 2, 2nd edition. ISBN 1-85996-228-9, The Methodology for DNA Sequencing, **2**, Chapter 6:6.1.
- Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I., Gaussoin, R.E., Riordan, T.P. and Dweikat, I.**, 2004a. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers, *Theoretical and Applied Genetics*, **108**, 328–334.
- Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I. and Dweikat I.**, 2004b. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograss based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, SRAPs, *Theoretical and Applied Genetics*, **109**, 280-288.
- Butterweck, V., Christoffel, V., Nahrstedt, A., Petereit, F., Spengler, B. and Winterhoff, H.**, 2003. Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioural models, *Life Science*, **73**, 627–639.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H. and Kaya, E.**, 2005. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse, *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 245–256.
- Carine, M.A., Christenhusz, M.C.M.**, 2010. About this volume: the monograph of *Hypericum* by Norman Robson, Department of Botany, Natural History Museum, *Phytotaxa*, **4**, 1-4.
- Chen, S., Wu. G., Chen, S., Ren, J. and Qin, D.**, 2010. Molecular phylogeny and biogeography of the narrow endemic *Coelonema* and affinitive *Draba* (Brassicaceae) based on two DNA regions, *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**, 796-805.
- Clegg, M. T., Gaut, B. S., Learn, G. H. and Morton, B. R.**, 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, Vol. **91**, 6795-6801
- Coskun, F. and Parks, C.R.**, 2009. A molecular phylogeny of *Cercis* L. (Fabaceae) using the chloroplast trnL-F DNA sequences, *Pakistan Journal of Botany*, **41** (4), 1587-1592.
- Crockett, S.L. and Robson, K.B.N.**, 2011. Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*, *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, **5**, 1-13.

- Cömertpay, G.**, 2008. Yerel Mısır Populasyonlarının Morfolojik ve DNA Moleküler İşaretleyicilerinden SSR Tekniği İle Karakterizasyonu, *Doktora Tezi*, Ç.Ü. Fen Bilim. Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Adana.
- Crawford, D.J.**, 2000. Plant Macromolecular Systematics In The Past 50 Years: One View, *Taxon*, **49**, 81-103
- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K.**, 1967. *Flora Of Turkey and The East Aegean Island*, **2**.
- Davis, P.H., Milli, R.R. and Tan, K.**, 1988, *Flora of Turkey and The East Aegean Island* (Supplement) Edinburgh Univ. Press., **10**, Edinburgh.
- dePamphilis, C.W., Young, N.D. and Wolfe, A.D.**, 1997. Evolution of plastid gene rps2 in a lineage of hemiparasitic and holoparasitic plants: many losses of photosynthesis and complex patterns of rate variation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 7367–7372.
- Dilsiz, N.**, 2004. Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Dizkırıcı, A., Kaya, Z., Cabi, E. and Doğan, M.**, 2010. Phylogenetic relationships of *Elymus* L. and related genera (Poaceae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences, *Turk Journal Botanic*, **34**, 467-468.
- Djabou, N., Battesti, M.J, Allali, H., Desjobert, J.M., Varesi, L., Costa, J. and Muselli, A.**, 2011. Chemical and genetic differentiation of Corsican subspecies of *Teucrium flavum* L., *Phytochemistry*, **72**, 1390-1399.
- Doğan, B.**, 2007. Türkiye *Jurinea* Cass. (Asteraceae) cinsinin revizyonu, *Doktora Tezi*, Selçuk Üniv. Biyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- Donoghue, M.J.**, 2008. A phylogenetic perspective on the distribution of plant diversity *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 11549–11555.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.**, 1987. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bull.* **19**, 11-15.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.**, 1991. *DNA higher plants systematics: Principles and Results: Molecular technics in taxonomy*, Çevr ed: Hewitt et all., *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- Downie, S.R., Katz, D.S., and Watson, M.F.**, 2000. A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA rp116 and rpoC1 intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae, *American Journal of Botany*, **87**, 273-292.
- Drabkova, L.Z. and Vlcek, C.**, 2010. Molecular phylogeny of the genus *Luzula* D.C. (Juncaceae, Monocotyledones) based on plastome and nuclear ribosomal regions: A

- case of incongruence, incomplete lineage sorting and hybridisation, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **57**, 536-551.
- Draper, S.R. and Cooke, R.J.**, 1983. Biochemical Tests for Cultivar Identification, ISBN:0-7923-6881-9, ISTA/Switzerland.
- Elektroforez Teknikleri ve Uygulamaları Çalıştayı**, 2009. Afyon.
- Esposito, M.A., Martin, E.A., Cravero, V.P. and Cointry, E.**, 2007. Characterization of pea accessions by SRAP's markers, *Scientia Horticulturae*, **113**, 329–335.
- Fenart, S., Arnaud, J.F., Cauwer, I. and Cuguen, J.**, 2008. Nuclear and cytoplasmic genetic diversity in weed beet and sugar beet accessions compared to wild relatives: new insights into the genetic relationships within the *Beta vulgaris* complex species, *Theoretical and Applied Genetics*, **116**, 1063–1077.
- Ferriol, M., Pico, B. and Nuez, F.**, 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers, *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 271–282.
- Ferriol, M., Pico', B., Co'rdova, P.F. and Nuez, F.**, 2004. Molecular Diversity of a Germplasm Collection of Squash (*Cucurbita moschata*) Determined by SRAP and AFLP Markers, *Crop Science*, **44**, 653–664.
- Freyer, R., Neckermann, K., Maier, R.M. and Kossel, H.**, 1995. Structural and functional analysis of plastid genomes from parasitic plants: loss of an intron within the genus *Cuscuta*, *Current Genetics*, **27**, 580–586.
- Gavrilets, S.**, 2003. Perspective: Models of Speciation: What have we learned in 40 years, *Evolution*, **57 (10)**, 2197-2215.
- Gibbons, S., Moser, E., Hausmann, S., Stavri, M., Smith, E. and Clennett, C.**, 2005. An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*, *Phytochemistry*, **66**, 1472–1475.
- Glick, B.R. and Pasternak, J.J.**, 1998. Molecular Biotechnology (Principles and Applications of Recombinant DNA), ASM Press., Washington, D.C.
- Griffiths A.J.F., Miller, J.H. and Suzuki, D.T.**, 2000. The structure and replication of DNA-Mechanism of DNA replication, **8**.
- Guetat, A., Vilatersana, R., Neffati, M. and Boussaid, M.**, 2010. Genetic diversity in Tunisian rosy garlic populations (*Allium roseum* L.) as evidenced by chloroplastic DNA analysis: Sequence variation of non-coding region and intergenic spacer, *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**, 502-509.

- Gülşen, O. ve Mutlu, N.,** 2005. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları, *Alatarım*, **4 (2)**, 2737.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Başer, K.H.C.,** 2000. *Flora Of Turkey and The East Aegean*, **11**.
- Güzeldağ, G.,** 2007. Polyporaceae Türlerinin Üretim ve Biyoteknolojik Optimizasyon Olanaklarının Araştırılması, *Doktora Tezi*, Ç.Ü. Fen Bilim. Enst., Biyoloji Ana Bilim Dalı, Adana.
- Halldén, C., Nilsson, N.O, Rading, I.M and Sall, T.,** 1994. Evaluation of RFLP and RAPD Markers In A Comparison Of Brassica Napus Breeding Lines, *Theor Appl Genet* **88**, 123-128.
- Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.O, Hjerdin, A. and Sall T.,** 1996. Competition as a of Errors in RAPD analysis, *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 1185-1192.
- Halldén, C.,** 1998. Characterization and Use of a Multiplex PCR based System: Random Amplified Polymorphic DNA, *Ph.D. Thesis*, Department of Genetics Lund University, Lund.
- Hillis, D.M. and Moritz, C.,** 1990. *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA.
- Hoisington, D.,** 1992. Laboratory protocols, CIMMYT. *Applied Molecular Genetics Laboratory*, Mexico DF.
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G.R. and Rakhshanizadeh, M.,** 2005. Anticonvulsant effect of *Hypericum perforatum*: role of nitric oxide, *J. Ethnopharmacol.*, **98**, 207–208.
- Howard, C., Bremner, P.D., Fowler, M.R., Isodo, B., Scott, N.W. and Slater, A.,** 2009. Molecular identification of *Hypericum perforatum* by PCR amplification of the ITS and 5.8S rDNA region, *Planta Medica*, **75 (8)**, 864-869.
- <http://www.bitkisel-tedavi.com>**
- Hu, D., Zhang, Q. and Luo, Z.,** 2008. Phylogenetic analysis in some *Diospyros* spp. (*Ebenaceae*) and Japanese persimmon using chloroplast DNA PCR-RFLP markers, *Scientia Horticulturae*, **117**, 32–38.
- Işık, Z., Parmaksız, I., Çoruh, C., Geylan-Su, Y.S., Cebeci, O., Beecher, B. and Budak, H.,** 2007. Organellar genome analysis of rye (*Secale cereale*) representing diverse geographic regions, *Genome*, **50**, 724-734.

- Jena, S.N., Kumar, S. and Nair, N.K.**, 2009. Molecular phylogeny in Indian *Citrus* L. (*Rutaceae*) inferred through PCR-RFLP and trnL-trnF sequence data of chloroplast DNA, *Scientia Horticulturae*, **119**, 403-416.
- Jones, N., Ougham, H. and Thomas, H.**, 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now, *New Phytologist*, **137**, 165-177.
- Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J.N. and Lang, D.J.**, 2002. Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon spp.*): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting, *CROP Science*, **42 (6)**, 2118-2127.
- Karlı, T., Karabağ, K. ve Şahin, E.**, 2006. DNA Marker Yöntemleri ve Hayvancılıkta Kullanımı, 100. Yıl Üniv. II. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi, Van.
- Kellogg, E. and Bennetzen, J.L.**, 2004. The evolution of nuclear genome structure in seed Plants, *American Journal of Botany*, **91**, 1709–1725
- Kelchner, S.A.**, 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **87**, 482-498.
- Korotkova, N., Schneider, J.V., Ouadant, D., Worberg, A., Zizka, G. and Borsch, T.**, 2009. Phylogeny of the eudicot order Malpighiales: analysis of arecalcitrant clade with sequences of the petD group II intron. *Plant Systematics and Evolution*, **282**, 201-228.
- Kounam, S.F., Ngadjui, B.T., Krohn, K., Wafo, P., Ajaz, A. and Choudhary, M.I.**, 2005. Prenylated anthronoid antioxidants from the stem bark of *Harungana madagascariensis*, *Phytochemistry*, **66**, 1174-1179.
- Langström, E. and Chase, M.W.**, 2002. Tribes of Boraginoideae (Boraginaceae) and placement of Antiphytum, Echiochilon, Orgastemma and Sericostoma: a phylogenetic analysis based on atpB plastid DNA sequence data, *Plant Systematics and Evolution*, **234**, 137–153.
- Learn, G.H., Shore, Jr, J.S., Furnier, G.R., Zurawski, G. and Clegg, M.T.**, 1992. Constraints on the evolution of chloroplast introns: the intron in the gene encoding *trnA*-Val(UAC). *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 856-871.
- Li, G. and Quiros, C.F.**, 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*, *Theoretical and Applied Genetics*, **103**, 455–461.
- Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T. and Benito, M.I.**, 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, **402**, 761– 767.
- Linuma, M., Tosa, H., Ito, T., Tanaka, T. and Aquil, M.**, 1995. Two prenylated anthrones in *Harungana madagascariensis*, *Phytochemistry*, **40**, 267-270.

- Linuma, M., Tosa, H., Ito, T., Tanaka, T., Yonemori, S., Chelladurai, V., Aquil, M., Takahasi, Y. and Naganawa, H.,** 1996. Occurrence of xanthonolignoids in guttiferaceous plants, *Heterocycles*, **43**, 1521-1527.
- Lohan, A.J. and Wolfe, K.H.,** 1998. A subset of conserved *trnA* genes in plastid DNA of nongreen plants, *Genetics*, **150**, 425–433.
- Mansion, G. and Struwe, L.,** 2004. Generic delimitation and phylogenetic relationships within the subtribe Chironiinae (Chironieae: Gentianaceae), with special reference to Centaurium: evidence from nrDNA and cpDNA sequences, *Molecular phylogenetics and morphological evolution*, **32**, 951–977.
- Mathieu-Daudé, F., Ralph, D. and McClelland, M.,** 1997. Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, ed. *CRS Press*, Boca Raton.
- Mayo, G.M. and Langridge, P.,** 2003. Modes of reproduction in Australian populations of *Hypericum perforatum* L. revealed by DNA fingerprinting and cytological methods, *Genome*, **46 (4)**, 573-579.
- Mendel, G.J.,** 1866. Versuche über Pflanzen- Hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereins Brunn*, **4**, 3-47.
- Merck Index,** 2003. 13th Edition. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ.
- Moore, J.A.,** 1983. Thomas Hunt Morgan- The Geneticist, *American Zoologist*, **23 (4)**, 855-865.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.,** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in-vitro: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.*, **51**, 263-273.
- Nürk, N.M.,** 2011. Phylogenetic Analyse in St.Jhons wort(*Hypericum*) Inferring character evolution and Historical biogeography, *Phd Thesis*, der Freien Universitat, Berlin.
- Özhüner, E.,** 2011. Türkiye *Echinops* L. (Asterceae) cinsi *Oligolepis* seksiyonuna ait taksonların cpDNA sekans analizi ile incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi* , Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Palmer, J.D., Jansen, R.K., Michaels, H., Manhart, J. and Chase, M.,** 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **75**, 1180-1206.
- Park, S.J. and Kim, K.J.,** 2004. Molecular phylogeny of the genus *Hypericum* (Hypericaceae) from Korea and Japan: Evidence from nuclear rDNA ITS sequence data, *Journal of Plant Biology*, **47 (4)**, 366-374.

- Paton, A.J., Springate, D., Suddee, S., Otieno, D., Grayer, R.J., Harley, M.M., Willis, F., Simmonds, M.S.J., Powell, M.P. and Savolainen V.,** 2004. Phylogeny and evolution of basils and allies (Ocimeae, Labiatae) based on three plastid DNA regions, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**, 277-299.
- Percifield, R.J., Hawkins, J.S., McCoyz, J.A., Widrlechnerz, M.P. and Wendel, J.F.,** 2007. Genetic diversity in *Hypericum* and AFLP markers for species-specific identification of *H. perforatum* L, *Planta Medica*, **73 (15)**, 1614-1621.
- Po Shiu, W.K. and Gibbons, S.,** 2006. Anti-staphylococcal acylphloroglucinols from *Hypericum beanie*, *Phytochemistry*, **67**, 2568–2572.
- Rafalski, A., Tingey, S.V. and Williams, J.G.K.,** 1994. RAPD markers, *Plant Molecular Biology Mannual*, **114**, 1-8.
- Robson, N.K.B.,** 1977. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 1. Infrageneric classification, *Bulletin of the British Museum of Natural History (Botany)*, **5**, 291-355.
- Robson, N.K.B.,** 1981, Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 2. Characters of the genus. *Bulletin of the British Museum. (Natural History), Botanical*. **8 (2)**, 55–226.
- Robson, N.K.B.,** 2010. Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 5(2). Sections 17. *Hirtella* to 19. *Coridium*, *Phytotaxa*, **4**, 127-258.
- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M.A.C., Stoeckli-Evans, H. and Hostettmann, K.,** 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*, *Phytochemistry*, **40**, 1447–1452.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.,** 1985. Enzymatic Amplification of β -globin Genomic Sequences and restriction Site Analysis for Diagnosis of Sick Cell Anemia, *Science*, **230**, 1350-1354.
- Sanchez-Mateo, C.C., Prado, B. and Rabanal, R.M.,** 2002. Antidepressant effects of the methanol extract of several *Hypericum* species from the Canary Islands, *J. Ethnopharmacol.*, **79**, 119–127.
- Sanchez-Jimenez, I.,** 2010. Molecular systematics of *Echinops* L. (Asteraceae, Cynareae), A phylogeny based on ITS and *trnL-trnF* sequences with emphasis on sectional delimitation, *International Association for Plant Taxonomy*, **59 (3)**, 698-708(11).
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.,** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Nature*, **74 (12)**, 5463-5467.
- Satub, J.E., Sequen, F.C. and Gupta, M.,** 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding, *Hort Science*, **31 (5)**, 729-741.

- Sax, K.**, 1923. The Association of Size Differences With Seed-Coat Pattern And Pigmentation In *Phaseolus Vulgaris*, *Genetics*, **8**, 552-560.
- Senni, K., Fujii, N., Takahashi, H., Suwagara, T. and Wakabayashi, M.**, 2005. Intraspecific Chloroplast DNA Variations of the Alpine Plants in Japan, *Acta Phytotax. Geobot.*, **56** (3), 265-275.
- Smelcerovic, A., Verma, V., Spiteller, M., Ahmad, S.M., Puri, S.C. and Qazi, G.H.**, 2006. Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia, *Phytochemistry*, **67**, 171-177.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Doyle, J.F.**, 1992. Molecular Systematics of Plants, Springer, ISBN 0412022419.
- Stam, M., Belete, C., Ramakrishna, W., Dorweiler, J. and Benentzen, L.**, 2002. The regulatory regions required for *B'* paramutation and expression are located far upstream of the maize *bl* transcribed sequences, *Genetics*, **162**, 917– 930.
- Stevens, P.F.**, 2007. Clusiaceae-Guttiferae .In: Kubitzki K(Ed) *The Families and Genera of Vascular Plants*, Springer, **IX**, 48-66, Berlin, Germany.
- Taberlet, P., Gielly, L., Patou, G. and Bouvet, J.**, 1991. Universal Primers amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Mol. Biol. Int. J. Mol. Biol. Biochem. Genet. Eng.*, **17**, 1105-1109.
- Tarıkahya, B.**, 2009. Türkiye *Symphytum* L. (Boraginaceae) cinsinin revizyonu, *Doktora Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Ankara.
- Tingey, S.V. and Del Tufa, J.P.**, 1993. Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers, *Plant Physiol.*, **101**, 349-352
- Türkan, İ.**, 2007. Post genomik çağda biyolojide gelişmeler, PPT sunusu, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Unsel, M., Marienfeld, J.R. and Petra, B.P.**, 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides, *Nature Genetics*, **15**, 57-61.
- Ünlü, S. and Sümer, S.**, 2005. PCR- based RFLP analysis of an intergenic spacer region in cpDNA of some wild wheat species, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **148**, 305-310.
- Vamosi, J. and Vamosi, S.**, 2011. Factors influencing diversification in angiosperms: at the crossroads of intrinsic and extrinsic traits, *American Journal of Botany*, **98**, 460–471.
- Van den Berg B.M, Wijsman H.J.W. and Bianchi F.**, 1983. Genetics of the peroxidase isoenzymes in *Petunia*, *Theor. Appl. Genet.*, **88**, 355-361.

- Vandenbogaerde, A., Zanolli, P., Puia, G., Truzzi, C., Kamuhabwa, A., De Witte, P., Merlevede, W. and Barald, M.,** 2000. Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats, *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, **65**, 627–633.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C.,** 1953. Genetical Implication of the Structure of DNA, *Nature*, **171**, 964-967.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hermmat, M., Hneen, B.E. and Lodhi, M.A.,** 1992. Inheritance and Reliability of RAPD markers, Proceedings of the symposium: Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series. Madison, WI: *Crop Science Society of America*, **12**, 17.
- Wei, W., Youliang, Z., Li, C., Yuming, W., Zehong, Y. and Ruiwu, Y.,** 2005. PCR-RFLP analysis of cpDNA and mtDNA in the genus *Houttuynia* in some areas of China, *Hereditas*, **142**, 24-32.
- Weiling, F.,** 1991. Historical study: Johann Gregor Mendel 1822-1884, *American Journal of Medicinal Genetics*, **40 (1)**, 1-25.
- Welsh, J. and McClelland, M.,** 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers, *Nucleic Acids Research*, **18**, 7213-7218.
- Wendel, J.F.,** 2000. Genome evolution in polyploids, *Plant Molecular Biology*, **42**, 225–249.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.,** 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.,** 1993. Genetic Analysis Using RAPD Markers, *Methods Enzymol*, **218**, 704-740.
- Wolfe, K.H., Li, W.H. and Sharp, P.M.,** 1987 Rates of nucleotide substitutions vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**, 9054-9058.
- Wolstenholme, D.R. and Fauron, C.R.,** 1995. Mitochondrial genome organization, In The Molecular Biology of Plant Mitochondria, Dordrecht, *The Netherlands*: Kluwer Academic Publishers, **3**, 1–60.
- Wurdack, K.J. and Davis, C.C.,** 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life, *American Journal Botany*, **96**, 1551-1570.

- Yıldırım, A. ve Kandemir, N.,** 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları
- Yüce, E.,** 2009. *Hypericum* L. (Hypericaceae) cinsine ait *Drosanthe* (Spach) Endl. seksiyonunun biyosistematigi, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D.,** 1994. Genomw Fingerprinting by Simple sequence Repeat (SSR)- Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification, *Genomics*, **20**, 176-183.
- Xu, D.H., Abe, J., Sakai, M., Kanazawa, A. and Shimamoto, Y.,** 2000. Sequence varition of noncoding regions of chloroplast DNA of soybean and related wild species and its implications for the evolution of different chloroplast haplotypes, *Theoretcial and Applied Genetics*, **101**, 724-732.

EKLER

Ek-1: Çalışmada kullanılan 58 bireyin kloroplast DNA'sının *trnL-trnF* bölgesinin sekans dizilimi

Birey No	Sekans Dizilimi
1a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGACCCCTTGAAAAGGGTCGGGATAGC
1b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGACCCCTTGAAAAGGGTCGGGATAGC
1c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTATGAAAGTGA GAAAGACGACCCCTTGAAAAGGGTCGGGATAGC
2a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAAC GTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGTG AGAAAGACGACCCCTTGAAAAGGGTCGGGATAGCT
2b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAAC GTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGTG AGAAAGACGACCCCTTGAAAAGGGCCGGAATAGCTCAGCCCGGTAGAGAAAAGAACG
2c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGAATAGCTCAGCCCGGTAGAGCAGAGAACTGA
3a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGACCCCTTGAAAAGGGTCGGGATAGCTCAGCCGG
3b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCCGGTAGAGCAGAGGAC
3c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGTCGGG
4a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCC
4b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAA AGTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCCCGG
4c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAAC GTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCCG
5a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAG TGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCCGG
5b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAAC GTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGTG AGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCCGG
5c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCCGG

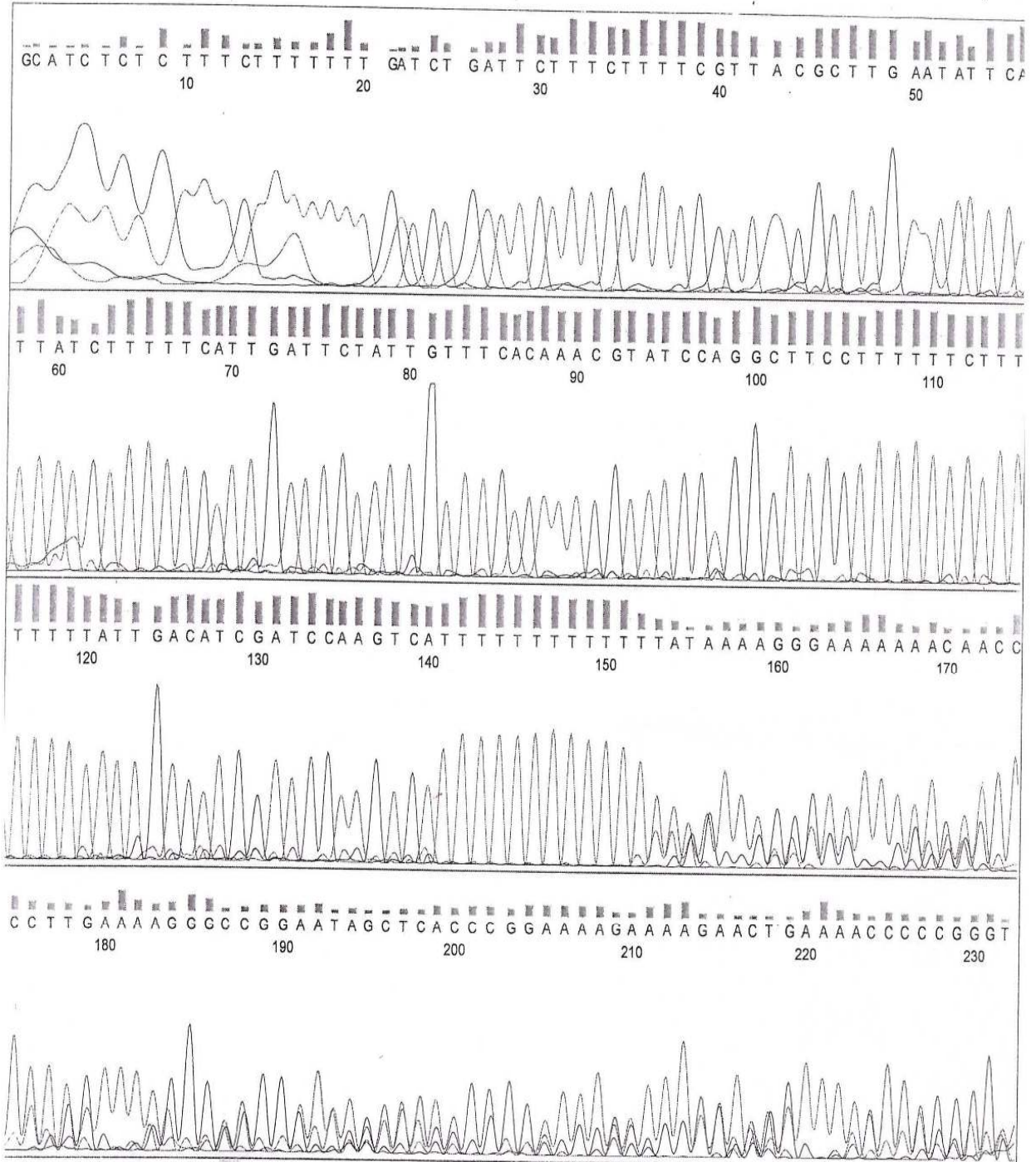
6a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATA GCTCAGCCGGTAGAGCAGAG
6b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATA GCTCAGCCGGTAGAGCAGAG
6c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATA GCTCAGCCGGTAGAGCAGAG
7a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA TGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTTAATGA AAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCCGG
7b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA TGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTTAATGA AAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCCGG
7c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA TGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTTAATGA AAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCCGG
8a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCCCGG
8b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGG
8c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCCCGG
9a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGG
9b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGT
9c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGT
10a	GATCTGATTCTTTATTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG CTCAGCCGGTAGAGCAGAG
10b	GATCTGATTCTTTATTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG CTCAGCCGGTAGAGCAGAG
10c	GATCTGATTCTTTATTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG CTCAGCCGGTAGAGCAGAG
11a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA GTATCCAGGCTTCCTTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCACCTTGAAAATGGTCGGGGTA

11b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA GTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCACCTTGAAAATGGTCGGGG
11c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA GTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCACCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCA
12a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGTGA GAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCGGTAGAGCAGA
12b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGTGA GAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCGGTAGAGCAGA
12c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGTGA GAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG
13a	GATCTGATTCTTTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCA CAAACGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGA AAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGG
13b	GATCTGATTCTTTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCA CAAACGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGA AAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCGGTAGAGCAGAG
13c	GATCTGATTCTTTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCA CAAACGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGA AAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCAGCCGG
14a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTAATGAAA GTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCA
14b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATATATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAA ACGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTAATGAA AGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCA
14c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATATATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAA ACGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTAATGAA AGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAGCTCA
15a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCTTTTTTTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGTG AGAAAGATGGTCGGGATAGCTCAGCGG
15b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCTTTTTTTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGTG AGAAAGATGGTCGGGATAGCTCAGCGG
15c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCTTTTTTTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGTG AGAAAGATGGTCGGGATAGCTCAGCGG
16a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCCGG
16b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCC

16c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTATGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAAGT GAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTC
17a	GATCTGATTCTTTATTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG CTCAGCCCGGTAGAGCAGAGGAC
17b	GATCTGATTCTTTATTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG CTCAGCCCGGTAGAGCAGAGGAC
17c	GATCTGATTCTTTATTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG CTCAGCCCGGTAGAGCAGAGGAC
18a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAA
18b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAA
18c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAA
19a	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCCCGG
19b	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGCTCAGCCCGG
19c	GATCTGATTCTTTCTTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTCTTTTTTTTATTGACATCGATCCAAGTCATTTTTTTTTTTTATGAAA GTGAGAAAGACGCCCCCTTGAAAATGGTCGGGGTAGC
20a	GATCTGATTCTTTATTTTCGTTAACGCTTGAATATTCATTATCTTTTTCATTGATTCTATTGTTTCACAAA CGTATCCAGGCTTCCTTTTTTTTTTTTATGAAAGTGAGAAAGACGACCCCTTGAAAATGGTCGGGATAG CTCAGCCCGGTAGAGCAGAGGAC

1. *H. thymbrifolium*, 2. *H. olivieri*, 3. *H. lydium*, 4. *H. scabrum*, 5. *H. elongatum* var. *elongatum*, 6. *H. spectabile*, 7. *H. thymopsis*, 8. *H. pseudolaeva*, 9. *H. salsolifolium*, 10. *H. amblysepalum*, 11. *H. helianthemoides*, 12. *H. uniglandulosum*, 13. *H. retusum*, 14. *H. capitatum* var. *capitatum*, 15. *H. lysimachioides* var. *lysimachioides*, 16. *H. scabroides*, 17. *H. lysimachioides* var. *spathulatum*, 18. *H. capitatum* var. *luteum*, 19. *H. microcalycinum*, 20. *H. sorgerae*

Ek-2: Kromotogram Verilerinden Bir Örnek



ÖZGEÇMİŞ
Gülden DOĞAN

Doğum Yeri : Adana
Doğum Tarihi : 03.01.1978
Görevi : Araştırma Görevlisi
İş Adresi : Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı
Tel : 0 424 237 00 00/3611
Fax : 0 424 233 00 62
e-posta : gdogan@firat.edu.tr
gdogan17@gmail.com
2009-2013 : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Botanik Anabilim Dalı'nda
Doktora Eğitimi.
Tez Konusu : *Hypericum* L. (Hypericaceae) Cinsine Ait *Drosanthe* (Spach) Endl.
Seksiyonunun Kloroplast Genomunun Kodlanmayan "trn" Bölgelerine
Göre Karşılaştırmalı Filogenetik Analizi
2007-2009 : Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Botanik Anabilim Dalı'nda
Yüksek Lisans Eğitimi.
Tez Konusu : Elazığ Cip Baraj Gölü-Arındık Köyü Arası Sahanın Florası
Danışman : Prof. Dr. Eyüp BAĞCI
1995-2000 : Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Bölümü,
Biyoloji Öğretmenliği Eğitimi.
1989-1994 : Orta ve Lise Eğitimi
1984-1989 : İlkokul Eğitimi