

**MİKROSATELLİT TEMELLİ MARKÖRLERLE
CENTAUREA NİVEA'DAKİ GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

Elif ÇAĞLAR
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak-2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elif ÇAĞLAR'ın '**Mikrosatellit Temelli Markörlerle *Centaurea nivea*'daki Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi**' başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 15.01.2010 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç. Dr. EMEL SÖZEN	
Üye	: Prof. Dr. ERSİN YÜCEL	
Üye	: Yard. Doç. Dr. EMEL USLU	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROSATELLİT TEMELLİ MARKÖRLERLE *CENTAUREA NİVEA*'DAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Elif ÇAĞLAR

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN
2010, 75 sayfa

Centaurea nivea Eskişehir bölgesinde dar yayılış alanına sahip nadir endemik bir tür olup sadece 5 popülasyonla temsil edilmektedir. Bu bitki türü “Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı”na göre CR (Critically endangered) “Çok tehlikede” kategorisinde yer almaktadır. Bu çalışmada *Compositae* familyası ve *Cheirolepis* seksiyonuna ait *Centaurea nivea*'nın sahip olduğu genetik çeşitlilik mikrosatellit markörleri kullanılarak incelenmiştir.

İlk olarak *C. corymbosa* ve *C. stoebe & diffusa* için geliştirilen 10 SSR markörünün *C. nivea*'da kullanılabilirliği test edilmiştir. Her bir SSR primeri için kalıp, Mg⁺² ve bağlanma sıcaklığı optimizasyonu yapılmış ve *C. nivea*'da çalışan primerler tespit edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları neticesinde toplam 3 SSR primerinin, 13D10, 13A9 ve CM15, *C. nivea*'da çalıştığı belirlenmiştir.

Bu primerler kullanılarak *Centaurea nivea*'nın popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik çeşitlilik seviyesi SSR-PCR yöntemi ile çalışılmıştır. Toplam 5 popülasyona ait 150 bireyin 3 SSR primeri ile çalışılması sonucu 21 allel tespit edilmiştir. Çalışılan tüm lokuslar %100 polimorfiktir. Beklenen heterozigotluk (*He*) değeri ortalaması 0.7298, popülasyonlar arası genetik farklılaşma derecesinin belirlenmesinde kullanılan *F_{ST}* değeri 0.1322 ve gen akışı değeri *N_m* 1.6411 olarak bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar popülasyon içi genetik çeşitlilik seviyesinin popülasyonlar arası genetik çeşitlilikten fazla olduğunu göstermiştir. Endemik *C. nivea* için uygun koruma yöntemleri önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Centaurea nivea*, Endemik, SSR-PCR, Genetik Çeşitlilik, Mikrosatellit, Koruma

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF *CENTAUREA NIVEA* BY USING MICROSATELLIT BASED MARKERS

Elif ÇAĞLAR

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emel SÖZEN
2010, 75 pages

Centaurea nivea is rare endemic species that have a narrow distribution area in Eskişehir region and represented by only five populations. According to Red Data Book of Turkish Plants, this species is categorised as critically endangered. In this study, genetic diversity of *Centaurea nivea* belonging to *Compositae* family and *Cheriolepis* section was analysed by using microsatellite markers.

Firstly, the usability of ten SSR markers developed for *C. corymbosa* and *C. stoebe* & *diffusa* was tested in *Centaurea nivea*. Template, Mg^{+2} and annealing SSR-PCR method. As a result of analysing 150 individuals belonging to total five populations with three SSR primers, temperature optimization were undertaken for each SSR primer and the primers worked in *C. nivea* were determined. At the end of optimization studies in total three of SSR primers, 13D10, 13A9 and CM15, worked in *C. nivea* were detected.

By using these primers, the intra and inter population genetic diversity levels of *Centaurea nivea* were studied with SSR-PCR method. As a result of studying 150 individuals belonging to total 5 population with 3 SSR primers, twenty-one alleles were detected. The all SSR loci were polymorphic. The average of expected heterozygosity (H_e) was found as 0.7298, F_{ST} value that is used to determine the level of genetic differentiation between populations as 0.1322 and the value of gene flow (Nm) as 1.6411. The results obtained from this study showed that the level of genetic diversity within subpopulations was higher than that of among populations. Suitable conservation strategies were suggested for endemic *C. nivea*.

Keywords: *Centaurea nivea*, Endemic, SSR-PCR, Genetic Diversity, Microsatellit, Conservation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her zaman yardım ve önerileri ile yol gösterici olan danışman hocam Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN’e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarım sırasında analiz çalışmalarımda her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Semra SOYDAM’a; çalışmam süresince yardımları ve arkadaşlığıyla beni yalnız bırakmayan sınıf arkadaşım Nurçin KÜÇÜKOĞLU’na teşekkür ederim.

Yaşamım ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın hazırlanmasında her daim yanımda olan ve özellikle tez materyallerimin düzenlenmesinde yardımcı olan ve manevi desteği ile beni hiç yalnız bırakmayan Elektronik ve Bilgisayar Sistemleri Öğretmeni nişanlım Ahmet Oğuzhan YANIK’a teşekkür ederim.

ELİF ÇAĞLAR

OCAK 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii

1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Centaurea</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	4
1.1.1. <i>C. nivea</i> 'nın Taksonomik Özellikleri.....	5
1.2. Genetik Çeşitlilik	7
1.2.1. Genetik Çeşitliliğin Tanımı.....	7
1.2.2. Genetik Çeşitliliğin Önemi	7
1.2.3. Genetik Çeşitliliğin Tanımlanması ve Ölçülmesi	10
1.3. Genetik Çeşitliliğin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Markörler	11
1.3.1. RFLP (Kesilmiş Parça Uzunlukları Polimorfizmi).....	11
1.3.2. AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)	13
1.3.3. RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA).....	14
1.3.4. ISSR (Basit Dizin Arası Tekrarları).....	16
1.3.5. SSR (Basit Dizin Tekrarları).....	17
1.4. Tehlike Altında Bulunan Türlerin Korunması.....	19
1.4.1 Koruma Stratejilerinin Geliştirilmesi.....	21
1.4.2. Koruma Yöntemleri	22
1.5. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar	24
1.6. Amaç	28
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
2.1. Materyal	30
2.2. DNA İzolasyonu	31

2.3. İzole DNA'ların Miktarlarının Belirlenmesi	32
2.4. SSR-PCR ile DNA'nın Çoğaltılması	33
2.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama	36
2.6. Jel Fotoğraflarının Analizi ve Genetik Çeşitliliğin Hesaplanması	37
3. BULGULAR.....	38
3.1. DNA İzolasyonu	38
3.1.1. DNA Miktar ve Saflık Tayini	38
3.2. SSR-PCR Optimizasyonu	45
3.2.1. Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu	45
3.2.2. MgCl ₂ konsantrasyonunun optimizasyonu.....	45
3.2.3. Kalıp DNA konsantrasyonunun optimizasyonu	46
3.2.4. Primer bağlanma ısısı optimizasyonu	47
3.3. <i>Centaurea nivea</i> 'nın Populasyon İçi ve Populasyonlar Arası Genetik Çeşitliliğin SSR Markörleri İle Belirlenmesi.....	48
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. <i>Centaurea nivea</i> 'nın (Dudaş Peygamber Çiçeği) genel görünümü	6
2.1. Çalışmada kullanılan bitkiye ait toplama lokalitelerinin harita üzerinde görünüşü.....	31
2.2. Fermentas GeneRuler 50 bp DNA Ladder.....	36
2.3. Fermentas GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus.....	36
3.1. Çalışmada kullanılan 1. popülasyona ait genomik DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü.....	39
3.2. 13D10 (S2) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 1. popülasyonunda oluşan bant profilleri	49
3.3. 13D10 (S2) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 2. popülasyonunda oluşan bant profilleri	49
3.4. 13D10 (S2) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 3. popülasyonunda oluşan bant profilleri	49
3.5. 13D10 (S2) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 4. popülasyonunda oluşan bant profilleri	50
3.6. 13D10 (S2) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 5. popülasyonunda oluşan bant profilleri	50
3.7. 13A9 (S7) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 1. popülasyonunda oluşan bant profilleri	51
3.8. 13A9 (S7) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 2. popülasyonunda oluşan bant profilleri	51
3.9. 13A9 (S7) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 3. popülasyonunda oluşan bant profilleri	51
3.10. 13A9 (S7) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 4. popülasyonunda oluşan bant profilleri	52
3.11. 13A9 (S7) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 5. popülasyonunda oluşan bant profilleri	52
3.12. CM15 (S8) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 1. popülasyonunda oluşan bant profilleri	53
3.13. CM15 (S8) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 2. popülasyonunda oluşan bant profilleri	53
3.14. CM15 (S8) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 3. popülasyonunda oluşan bant profilleri	53
3.15. CM15 (S8) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 4. popülasyonunda oluşan bant profilleri	54
3.16. CM15 (S8) no'lu primer ile <i>C. nivea</i> 'nın 5. popülasyonunda oluşan bant profilleri	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Kullanılan <i>C. nivea</i> bitkisine ait lokalite bilgileri ve örnek sayıları	30
2.2. SSR-PCR çalışmasında kullanılan primerlerin dizileri, tekrar motifleri ve bağlanma ısıları	34
3.1. Çalışmada kullanılan 1. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri	40
3.2. Çalışmada kullanılan 2. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri	41
3.3. Çalışmada kullanılan 3. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri	42
3.4. Çalışmada kullanılan 4. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri	43
3.5. Çalışmada kullanılan 5. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri	44
3.6. Çalışmada kullanılan primerlerin optimize edilen bağlanma sıcaklıkları ve oluşturdıkları bant büyüklükleri	48
3.7. <i>Centaurea nivea</i> 'a ait genetik parametre değerleri	55
3.8. <i>Centaurea nivea</i> için Nei (1978) genetik benzerlik ve genetik uzaklık ölçümleri	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	:	Adenin
AFLP	:	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
C	:	Sitozin
DNA	:	Deoksribonükleik asit
dNTP	:	Deoksribonükleosid trifosfat
G	:	Guanin
IUCN	:	Uluslar arası doğayı koruma birliği
ISSR	:	Basit dizin arası tekrarları
M	:	Molar
Mg ⁺²	:	Magnezyum
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
mg	:	Miligram
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
ng	:	Nanogram
nm	:	Nanometre
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	:	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	:	Kesilmiş parça uzunlukları polimorfizmi
SSR	:	Basit dizin tekrarları (mikrosatellitler)
T	:	Timin
TBE	:	Tris- borik asit- EDTA
U	:	Ultraviole

1. GİRİŞ

Biyolojik çeşitlilik ya da biyolojik zenginlik canlıların farklılığını ve değişkenliğini, içinde bulundukları karmaşık ekolojik yapılarla, birbirleriyle ve çevreleriyle karşılıklı etkileşimlerini ifade etmektedir. Biyoçeşitlilik esas itibariyle birbirine bağlı dört ana parçadan ibarettir. Bunlar ekosistem çeşitliliği, tür çeşitliliği, genetik çeşitlilik ve ekolojik olaylar çeşitliliğidir. Ekosistem çeşitliliği karşılıklı etkileşim halinde olan organizmalar topluluğu ile fiziksel çevrelerinin oluşturduğu bütün olarak tanımlanmaktadır. Ekosistem düzeyindeki biyolojik çeşitliliğin korunması besin zinciri ve beraberinde enerji akışının korunmasını kapsar. Bundan dolayı, yalnızca türlerin veya türlerin oluşturduğu grupların değil, bu gruplara ait özelliklerin ve süreçlerin de korunması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ülkemiz ekosistem çeşitliliği açısından oldukça zengindir. Bunun en önemli sebeplerinden biri ülkemizin coğrafik konumudur. Ülkemiz bulunduğu konum itibariyle eski dünya karalarının (Asya ve Avrupa) birbirlerine yaklaştıkları noktada bulunmaktadır. Bir anlamda geçiş bölgesi olarak da düşünülmektedir. Bu özelliğinden dolayı birbirinden önemli farklılıklar ile ayrılan değişik ekosistemleri içinde barındırmaktadır. Bir diğer sebep ise ülkemizin sahip olduğu topoğrafik yapısıdır. Topoğrafik yapısı bakımından Türkiye, yüksek yayla karakterinde, çok değişken engebeli ve dağlık arazi durumundadır. Ülkemizde ortalama yükselti 1.130m civarındadır. Ayrıca Türkiye fazla eğime sahip oluşu ile de karakteristiktir. Ülkemiz arazisinin %20 kadarı %15 ve daha az eğimde, geriye kalan %80'i ise %15'ten yukarı eğimli arazi karakterindedir. Ekosistem çeşitliliğine neden olan önemli bir faktör de ülkemizin üç tarafının denizlerle çevrili oluşudur. Etrafımızı kuşatan denizlerimiz (Akdeniz, Karadeniz ve Ege) fiziksel ve kimyasal özellikler bakımından birbirinden farklıdır. Bu farklılık elbette farklı habitat oluşumlarını, farklı ekosistemleri doğuracaktır.

Tür çeşitliliği belli bir bölgedeki, alandaki ya da tüm dünyadaki türlerin farklılığını ifade eder. Bir bölgedeki türlerin sayısı bu konuda en sık kullanılan ölçüttür. Türkiye, Avrupa kıtasında bulunan bitki türlerinin %75'ini barındırmaktadır ve bunun üçte birini endemik bitkiler oluşturur. Türkiye'deki

yayılış gösteren bitki türlerinin %33'ü endemiktir. Yaklaşık 3.000'i endemik olmak üzere, 9.000'den fazla bitki türü ile Türkiye florası oldukça zengindir.

Genetik çeşitlilik bir bireyin sahip olduğu genler tarafından belirlenen genetik bilgilerin toplamıdır. Ayrıca, genetik çeşitlilik çalışılan grup (populasyon, tür ya da türler topluluğu) içinde var olan allel ve genotip çeşitliliğidir. Genetik çeşitlilik belli bir tür, populasyon, çeşit, alt-tür ya da ırk içindeki gen farklılığıyla ölçülür. Bir populasyonun tüm ya da neredeyse tüme yakın üyeleri bir gende aynı allele sahip ise, populasyonun bu gen için düşük genetik çeşitliliğe sahip olduğu söylenir. Eğer bir gen dizisi için pek çok farklılıklar söz konusu ise, bu populasyon bu gen için yüksek genetik çeşitliliğe sahiptir. Doğal olarak dış döllenme yapan türlere ait geniş populasyonlar genellikle yüksek genetik çeşitliliğe sahiptirler, fakat bu durum nesli tehlike altında olan türlerde oldukça indirgenmiştir. Aynı türün farklı ekolojik bölgelerde yaşayan farklı populasyonları, farklı genlere ve gen kombinasyonlarına sahiptir. Bu genlerin ve gen kombinasyonlarının bazısı, önemli ekonomik ve evrimsel değere sahiptir. Bu nedenle, bir türün farklı ırklarının yok olması türün genetik erozyona uğraması ve genetik çeşitliliğin kaybolması demektir.

Ülkemizin 7 coğrafi bölgesinin her biri ayrı iklim, flora ve fauna özellikleri gösterir. Türkiye florası açısından değerlendirildiğinde ise, Türkiye'nin floristik yapısının farklı nedenlerden dolayı oldukça zengin olduğunu görmekteyiz. Bu nedenler arasında çok çeşitli makro ve mikro iklim alanları, engebeli topoğrafya ve bundan ortaya çıkan habitat farklılıkları, edafik etmenlerin farklı oluşu, zengin su kaynakları, büyük yükseklik farkları, üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bir bölgede yer alması, Anadolu'nun doğusu ve batısı arasında ekolojik farklılıkların oluşu ve bunun floristik farklılıklara yansımaları sayılabilir. Türkiye Florasında yer alan toplam tür sayısı 9.221'dir. Endemizm bakımından, Floradaki endemik tür sayısı 2.891'dir. Bu sayı endemik 497 alttür ve 390 varyete ile birlikte 3778'e ulaşmaktadır. Türkiye içinde barındırdığı endemik bitkilerin zenginliği ve bununla beraber endemizm oranının yüksekliği açısından dünyanın önemli ülkelerinden birisidir. Türkiye'deki endemik bitki sayısının Avrupa ülkelerine kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. Özellikle topoğrafik yapı sebebiyle izole edilmiş bölge ve habitatların oluşması, buna bağlı olarak ekstrem

evre koşullarının meydana gelmesi, edafik (toprak) etmenlerin çeşitliliği ülkemizde endemizm oranını artıran etmenler arasında yer alır. Türkiye’de ve dünyada yayılış gösteren endemik bitkilere ait populasyonlar ya nesli tükenen ya da tükenme tehdidi altında olan populasyonlardır. Genel itibariyle habitat tahribi ya da diğer çevresel faktörler ve populasyon büyüklüğünde meydana gelen değişiklikler bir populasyonun yok olma riskini artırıcı yönde etki yapar. Yok olmanın önüne geçilebilmesi amacıyla nesli tükenme tehdidi altında bulunan populasyonlar için koruma genetikçileri tarafından çeşitli teknikler kullanılarak koruma programları geliştirilmektedir. Korumadaki temel amaç, yok olmayı önlemek için yaşayabilir organizmalardaki evrimsel sürecin ve genetik çeşitliliğin belirlenmesidir (Falk ve Holsinger, 1991; Godt ve Hamrick, 1995). Frankel (1974)’ e göre genetik çeşitlilik kritik bir özelliktir; çünkü bu özellik doğrudan ekolojik başarıyı etkilemektedir. Bu hedef doğrultusunda populasyonlara ait genetik çeşitlilik tespit edilir. Çünkü nadir ve tehlike altında bulunan tür populasyonlarına ait genetik varyasyonun dağılımı uygun koruma stratejisinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Falk ve Holsinger, 1991; Francisco & Ortega ve ark. 2000).

Koruma alışmaları ekoloji, moleküler biyoloji, populasyon genetiği ve sistematik gibi farklı disiplinlerin bir arada kullanılması ile gerçekleştirilir. Bu tip çalışmalardan elde edilecek veriler ışıkında populasyonlar için uygun koruma stratejileri belirlenir. Bu amaç doğrultusunda yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; Sardinya adasına endemik olan ve 7 populasyon ile temsil edilen *Centaurea horrida*’nın genetik yapısı moleküler markörler kullanılarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre koruma planları geliştirilmiştir (Mameli ve ark. 2008). *Populus nigra* L.’nin genetik eşitliliği AFLP ve SSR markörleri kullanarak araştırılmıştır (Smulders ve ark. 2008). Analiz sonuçları gen akışı ve dağılımın karşılıklı uzun mesafeler ve nehir kaynakları arasında meydana geldiğini göstermiştir. Sonuç olarak, yeterli büyüklüğe sahip ve ayrılmış doğal populasyonların habitatlarının restorasyonu, sel havzasındaki doğal dinamiklerin yeniden oluşturulması gibi oluşumlar için geliştirilecek koruma stratejilerinin en önemli tedbirler olacağı vurgulanmıştır. in’e endemik ve tehlike altında olan *Heptacodium miconioides* Rehd.’nin dokuz

populasyonu içinde ve populasyonlar arasındaki genetik çeşitlilik ve farklılaşma ISSR markörleri kullanılarak belirlenmiştir (Jim ve Li, 2007). Yapılan çalışma sonucunda türlerde yüksek seviyede genetik çeşitlilik olduğu tespit edilmiştir. Fakat populasyon seviyesindeki genetik çeşitliliğin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca populasyonlar arasındaki genetik ve coğrafik uzaklık ilişkisi de aydınlatılmıştır. Genetik veriler temel alınarak tehlike altındaki bu türü korumak için etkili ve pratik koruma stratejileri önerilmiştir. Tehlike altındaki türlerin korunmasına yönelik yapılan çalışmalarda AFLP, SSR, ISSR ve RAPD gibi çeşitli genetik markörler kullanılmaktadır. Bu markörlerin kullanılmasıyla çalışılan türe ait genetik çeşitlilik tespit edilir ve elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak tükenme tehdidi ile karşı karşıya olan türün koruma altına alınması için gerekli stratejiler belirlenir.

1.1. *Centaurea* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Türkiye Florası'nda Wagenitz (1975) tarafından hazırlanmış olan *Centaurea* cinsinin özellikleri aşağıdaki gibidir:

Tek, iki veya çok yıllık otsu, dalları nadiren dikenli, çalimsı, bazen herdemyeşil bitkilerdir. Nadiren tüysüz; genellikle keçemsi tüylü (tomentoz) veya pürüzlüden (skarbit) çok hücreli kaba tüylüye (hirsut) kadar değişir. Sıklıkla sapsız salgı tüylüdürler. Yapraklar almaşık dizilişlidir, bazen tamamen tabanda bulunurlar. Morfolojileri çok değişken olup, Türkiye'de türler *C. odyssei*'deki spinulose hariç, dikensizdir. Genellikle loplari ayanın yarısının ortasına kadar (pinnatifit) veya ayanın yarısının 2/3'sine kadar (pinnatipartit) derin, bazen aşağı doğru ilerler (dekurrent).

Kapituladaki çiçekler eşeyce farklı (heterogam), tabla şeklinde (diskoit), merkezinde tüpsü ya da tüm çiçekler tüpsü ancak kenardakiler daha büyük ve yayıktır (radyant). Brakte topluluğu (involukrum) yumurtamsı, yarıküresimsi, silindirik, dikdörtgeni veya iğ şeklinde; involukrum brakteleri (fillari) çok serili, kiremitsi, az çok sert, hemen her zaman zarımsı, saman yapılı veya değişken formlar gösteren derimsi ek yapı (appendage) içerirler. Ek yapılar tam veya kirpiksiye varan saçaklı, dairemsi, mızraksı veya üçgen, küt veya küçük sivri sert

bir uç (mukro) ile biten, kısa dikencikli veya sert dikenli; bazen sadece mukrodan ibaret veya kısa dikencikli; nadiren de hiçbirini bulunmamaktadır. Çiçek tablası düz kılıdır. Çiçekleri pembe, mor (siyamsı mora kadar), mavi, sarı veya beyazımsıdır. Kenardakiler eşeysiz/nötr (bazen verimsiz stamenli), 5-8 veya daha fazla segmentli huni veya hemen hemen iplik şeklinde ve oldukça belirsiz 4-5 şeritsi segmentlidir. Merkezdeki çiçekler ise erdişidir (hermafrodit).

Akenler olgunken tüsüz, az çok yanal olarak yassılaştırmış, tepe kısmı yuvarlak veya kesik, hilum lateralde tabana yakın, sıklıkla elaiosomludur. Tüy demeti (papus) düzensiz pürüzlü, kısa sakalsı tüylü veya kuş tüyü gibi yumuşak kıllı, kademe kademe merkeze doğru uzamış fakat en iç sıra genellikle kısa ve daha ziyade pulumsu, sürekli ve nadiren erken düşer veya bazen bulunmaz.

Cinsin taksonomik anlamda en önemli karakterleri fillarilerin ucunda değişik şekillerdeki çıkıntılar ve papus morfolojisidir. Ayrıca kök yapısı, gövde dallanması gibi vejetatif karakterler de önemlidir.

Türkiye Florası'nda (Davis, 1965-1985) belirtildiğine göre, bu cins taksonomik olarak birçok problem içermektedir. Tür açılımının birçok seksiyonda uyumsuz olması, geçişlilik gösteren türler nedeniyle ekstrem karakterlerin bir tür içerisinde birleştirilme zorunluluğu, yakın akrabası olmayan çok izole endemiklerin bulunuşu taksonomik sorun yaratan başlıca özellikler olarak sıralanmaktadır. Bu nedenle üzerinde detaylı şekilde çalışılması gerekmektedir.

1.1.1. *Centaurea nivea*'nın (Dudaş Peygamber Çiçeği) Taksonomik Özellikleri

Bu tür Türkiye Florası revizyonunda 177 tür içinde 58.sırada *Cheirolepis* seksiyonunda yer almaktadır. Bu seksiyon 7 tür içermektedir (Wagenitz, 1975).

C.nivea (Bornm.) Wagenitz türünün taksonomik durumu aşağıdaki gibidir:

Familia: *Compositae*

Subfamilia: *Asterideae*

Tribus: *Cardueae*

Subtribus: *Centaureinae*

Genus: *Centaurea*

Section: *Cheirolepis*

- 54. *C.drabifolia*
- 55. *C. kotschy*
- 56. *C. derderiifolia*
- 57. *C. deflexa*
- 58. ***C. nivea***
- 59. *C.sericea*
- 60. *C. saligna*

Cheirolepis seksiyonunda bulunan türler çok yıllık bitkilerdir. Gövdeleri basit veya üste dallanmış, birkaç orta boylu kapitulalı, dik veya yatıktır. Yapraklar parçalanmamış, düze, birkaç dişli veya lopludur. İnvolukrum yumurtamsıdan hemen hemen silindirik şekline kadar değişir. Ek yapıları (appendage) küçük, sert yapılı, 2-4 yan sili üçgen şeklinde, uçta küçük veya büyük bir diken ve kenarda düzensiz bir şekilde saçaklı zarımsıdır. Çiçekler sarı, kenardakiler radyant değildir. Akenler büyük; pappus aknden uzun, kuş tüyümsü (plumose), nadiren dikencikli (barbellate), iç sıradakiler farklılaşmamıştır.



Şekil 1.1. *Centaurea nivea*'nın (Dudaş Peygamber Çiçeği) genel görünümü

C. nivea, Ekim ve ark. (2000)'nın hazırladığı 'Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre CR (Critically endangered) 'Çok tehlikede' kategorisinde yer almaktadır. Yakın zamanda yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olanlar ve popülasyonlarının zarar görebileceği düşünülenler bu grup altında toplanmıştır. Bitkiler bu kategori altında toplanırken göz önünde bulundurulacak ek kriterler ise

habitat özelliği değişimi, türün kaplama derecesinin azalması, toplama, başka takson istilasđ, melezleme, hastalık, tohum bağlamama, kirlenme gibi tehditler sonucu popülasyonda 10 yıl içinde %80 kaybolma olasılığı bulunması; bitki toplam yayılış alanının 10 km² den az olması; çok parçalanmış veya tek lokasyondan bilinmesidir.

1.2. Genetik Çeşitlilik

1.2.1. Genetik Çeşitliliğin Tanımı

Genetik çeşitlilik bir türün genetik donanımındaki genetik karakterlerin tümüne karşılık gelen bir biyoçeşitlilik seviyesidir. Genetik çeşitlilik, bir türün sahip olduğu bir genin değişkenliği yani farklılığıdır. Örneğin; bir bitkinin çiçek rengini belirleyen bir gen için farklı alleller ortaya çıkabilir (Örneğin; pembe, mor, beyaz allel). Her bir durumda, aynı gen çiçek rengini belirler, fakat gene ait allellerinin DNA dizisi farklıdır. Bireylerin belirli bir karakter için aynı genin farklı çeşitline (allele) ya da değişik gen kombinasyonlarına sahip olmaları bireyler arası genetik çeşitliliğine neden olur. Popülasyon açısından ele alındığında da bir genin farklı popülasyonlarda farklı sıklıkta ya da farklı kombinasyonlarda oluşu popülasyonlararası genetik çeşitliliği ortaya çıkaracaktır. Genetik çeşitlilik, bir popülasyondaki heterozigotluk seviyesi, her bir lokustaki allel sayısı ya da polimorfik lokus yüzdesi ile tahmin edilebilir.

1.2.2. Genetik Çeşitliliğin Önemi

IUCN (uluslararası doğayı koruma birliği) genetik çeşitliliğin korunmasının önemini vurgulamaktadır. Çevresel değişiklik devamlı bir süreçtir ve dolayısıyla genetik çeşitlilik popülasyonların değişen çevre koşullarına karşı uyumu için gereklidir. Genetik çeşitlilik genellikle soy içi döllenme ve çoğalmada gözlemlenen kapsamlı düşüş ile azalma göstermektedir.

Genetik çeşitlilik bir tür için düşük ise, bu tür gittikçe artan oranda risk altına girmektedir. Örneğin çevresel afetler meydana gelirse, yüksek genetik

çeşitliliğe sahip bir populasyonun en azından bazı bireyleri sahip oldukları genetik donanımları sayesinde hayatta kalmak için büyük bir şansa sahiptir. Eğer ki genetik çeşitlilik çok düşük ise, bir populasyondaki bireylerin hiçbiri yeni çevresel şartlarla başa çıkmak için gerekli olan özelliklere sahip olamayabilir. Bu tip bir populasyonun nesli tükenebilir yani ortadan kalkabilir. Bir türün genetik çeşitliliği daima değişime açıktır. Bir populasyonda var olan bir genin ne kadar farklılığa sahip olduğu önemli değildir, sadece yeni nesilde hayatta kalabilen değişiklikler gelecekte tür çeşitliliğine katkıda bulunabilecektir.

Doğal populasyonlardaki genetik çeşitlilik biyologların temel endişesidir, çünkü genetik çeşitlilik miktarı ve dağılımı türlerin ve populasyonların evrimsel potansiyelini muhtemelen etkileyecektir (Futuyma, 1986). Genetik yapının analizi sadece populasyonun genetik çeşitliliği üzerindeki tehlikeli durum etkisinin değerlendirilmesinde değil aynı zamanda türlerin genetik yapısına ait bilginin onların evrimsel potansiyellerinin korunmasında başvurulabilmesi için de gereklidir.

Belirli bölgelerdeki birey kaybı, genetik çeşitlilikte hemen kayba neden olmayabilir, fakat daha fazla zarar, küçük populasyon büyüklüğü ve azalmış birey sayısından dolayı uzun süreli genetik sonuçlar doğurabilir. Genetik çeşitlilik kaybı, hem kısa hem de uzun vadede demografik dalgalanmalarla ve değişen çevre koşullarıyla başa çıkabilmek için türlerin yeteneklerinde bir azalmaya neden olabilir (Ellstrand ve Elam 1993; Milligan ve ark. 1994; Reisch ve ark. 2003).

Küçük populasyon büyüklüğünün iki genetik sonucu vardır: artan sürüklenme (sapma) ve artan soy içi çiftleşme (Ellstrand ve Elam, 1993). Genetik sürüklenme ya da sapma genetik varyasyon dağılımını iki yolla değiştirir: 1) populasyon içindeki varyasyonun azalması, 2) populasyonlar arasındaki farklılaşmanın artması (Ellstrand ve Elam, 1993). Küçük populasyon büyüklüğünün genetik polimorfizm kaybı (Raijmann ve ark. 1993), tozlaşmayı sağlayıcı böcekleri cezbetmede yetersizlik (Kearns ve Inouye, 1997), aynı soy içi çiftleşmede artış (Ellstrand ve Elam, 1993) gibi negatif sonuçları çeşitli türlerde gözlemlenmiştir.

Küçük ve izole populasyonlar genetik sapmalara maruz kalır ve bundan dolayı genetik varyasyonlarının geniş populasyonlara oranla düşmesi beklenir.

Benzer şekilde, nadir ve endemik türler de düşük genetik varyasyon sergilerler. Dahası, türler arasında düşük ya da yüksek genetik çeşitliliği neyin meydana getirdiği hala kesin değildir. Tam ve kesin bir genetik varyasyon seviyesi için genelde bir taksonun uzun süreli korunmasının gerekli olduğu düşünülmektedir (Frankel ve Soule, 1981; Simberlo, 1988). Nadir taksonların korunması ideal olarak onların biyolojilerinin ve hayatta kalmasında etken olan genetik değişikliklerinin anlaşılmasını gerektirir. Ayrıca, dış çaprazlanan türlerin popülasyon seviyesinde daha fazla genetik varyasyon göstermesi beklenmektedir. Genetik varyasyonun popülasyon büyüklüğündeki azalma ile birlikte azaldığı görülmüştür (Mosseler ve ark. 1992; Baskauf ve ark. 1994; Gray, 1995; Kappe ve ark. 1995; Frankham, 1997; Palacios ve Gonzales-Candelas, 1997).

Nesli tehlike altında olan bitki türlerinin genetiğinin korunmasına yönelik yapılan çalışmalar biyoçeşitliliğin korunması için koruma planlarının belirlenmesini gerekli kılmaktadır. Bitki türlerinin popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik çeşitliliğinin belirlenmesi uzun süreli koruma programları için önemli bir konudur (Oyama, 1993; Haig, 1998; Bowen, 1999). Bir bitki türünde belirlenen yüksek genetik çeşitlilik seviyesi onun çevresel değişikliklere daha iyi adapte olmasını sağlar ve evrimsel kapasitesini belirler (Hamrick ve ark. 1991; Frankham, 1995; Hamrick ve Godt, 1996). Teorik ve saha çalışmaları bitkilerde genetik çeşitlilik seviyesi ve yeteneği arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (Barret ve Kohn, 1991; Oostermeijer ve ark. 1995; Sun, 1996; Fischer ve Matthies, 1998; Groom, 1998; Schmidt ve Jensen, 2000). Nesli tehlike altında olan türler için nadir genotiplerin tanımlanması koruma birimlerinin ve evrimsel önemin belirlenmesi için önemli bir basamaktır (Qamaruz-Zaman ve ark. 1998).

Genetik sapma yeni bir jenerasyondaki allel çeşitliliğinin önceki jenerasyondakinden farklı olma sürecidir. Sadece birkaç bireyden yeni bir popülasyonun kurulması, coğrafik izolasyon, seçici baskılar ve göç mekanizmasındaki değişiklikler genetik sapma ile sonuçlanır. Bu faktörlerin her biri yeni neslin bir parçası olacak bireyleri etkiler ve dolayısıyla allel örnekleri bu türlerin geleceğini belirleyecektir. Eğer bir popülasyondaki birey sayısı azalıyorsa, bu popülasyon genetik sapmaya karşı daha hassas demektir.

1.2.3. Genetik Çeşitliliğin Tanımlanması ve Ölçülmesi

Genetik çeşitlilik tipik olarak polimorfizm, ortalama heterozigotluk ve allelik çeşitlilik kullanılarak tanımlanır.

Bir populasyonun genetik kompizasyonu genellikle allel sıklığı, allel sayısı ve heterozigotluk bakımından değerlendirilir. Allel sıklığı gen sıklığı olarak da tanımlanabilir. Allel sıklığı, bir populyasyondaki belirli bir allele ilişkin sıklıktır. Heterozigotluk ise genellikle tek bir lokus için genetik çeşitliliğin tanımlanmasında kullanılan bir ölçüdür. Bir lokustaki genetik çeşitliliğin kapsamı ‘heterozigotluk’ olarak ifade edilir. ‘Gözlemlenen heterozigotluk’ basit olarak heterozigot olan örneklenmiş bireylerin oranıdır. Populasyonlar ya da bireyler arası genetik çeşitliliğin kapsamı karşılaştırıldığında genellikle ortalama heterozigotluk kavramı kullanılır. Ortalama heterozigotluk tüm lokuslardaki heterozigotluk oranları toplamının toplam lokus sayısına oranıdır. Tipik olarak ‘beklenen heterozigotluk’, ‘gözlemlenen heterozigotluğa’ göre tercih edilir. Çünkü ‘gözlemlenen heterozigotluk’ örnek büyüklüğüne karşı daha hassastır. Tek bir lokustaki genetik çeşitlilik ‘beklenen heterozigotluk’, ‘gözlemlenen heterozigotluk’ ve allelik çeşitlilik ile tanımlanır. Sıklıkları ‘p’ ve ‘q’ olan bir lokustaki iki allel için beklenen heterozigotluk değeri (H_e) $2pq$ ’dur. Bu değer aynı zamanda gen çeşitliliği olarak da tanımlanabilir. Bir lokusta bulunan allel sayısı iki allelden fazla ise beklenen heterozigotluk değeri allel sıklıklarının karesinin toplamının 1’den çıkarılmasıyla belirlenir.

Genetik çeşitliliğin tanımlanmasında kullanılan diğer bir kavram ise allelik çeşitliliğidir. Allelik çeşitliliği her bir lokusta yer alan allellerin ortalama sayısı olarak tanımlanır. Eğer birden fazla lokus çalışılıyorsa, allelik çeşitlilik lokuslar arası ortalama allel sayısıdır.

Bireyler ya da populasyonlar arası genetik çeşitlilik birbirinden farklı pek çok seviyede ölçülebilir. Bu seviyeler ise ölçülebilir karakterlerdeki çeşitliliğin, zararlı allellerin görülebilir etkilerinin, proteinlerdeki değişikliklerinin ve DNA dizilerindeki değişikliklerin direkt ölçümleri ile belirlenir.

1.3. Genetik Çeşitliliğin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Markörler

Genetik çeşitlilik tespitinde ve pek çok bitki türünün tanımlanmasında moleküler markörler kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda gelişen moleküler markör teknolojisi diğer tekniklerin sahip olduğu pek çok dezavantajı ortadan kaldırması nedeniyle tercih edilir bir duruma gelmiştir. Moleküler markörlerin en önemli avantajları çevresel faktörlerden etkilenmemeleri ve polimorfizm oranlarının yüksek oluşudur. Aynı zamanda pleiotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermezler (Soller ve Beckmann, 1983; Tanksley, 1983; Avise 1994; Bretting ve Widrlechner, 1995). Genetik markörler laboratuvarlarda hücreleri, bireyleri, popülasyonları ya da türleri ayırmak için kullanılabilir. Genetik markörlerin kullanımı bitki dokularından örneğin, çekirdek, yapraklar, polen, bazen de odunsu dokulardan DNA'nın izole edilmesi ile başlar. Ardından laboratuvar protokolleri uygulanır. Bu prosedürler tipik olarak boyama ya da etiketleme teknikleri ile görülebilir bir şekilde sonuçlanır. Sonra bu bilgiler veri haline dönüştürülür. Dolayısıyla genetik markörler genetik çeşitliliği tanımlamamıza izin verirler. Bir çalışma için en uygun genetik markör seçimi, markörün karakteristiğine, tür karakteristiğine ve genom karakteristiğine bağlı olacaktır. DNA markörleri, DNA melezleme (hibridizasyon) markörleri (RFLP) ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı DNA çoğaltım markörleri (AFLP, ISSR ve SSR) olmak üzere iki grup altında incelemek mümkündür.

1.3.1. RFLP (Kesilmiş Parça Uzunlukları Polimorfizmi)

DNA melezleme (hibridizasyon) markörleri çeşitli şekilde etiketlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA) araştırılan bir DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA'ya melezlenebilmesini temel almaktadır. Bu teknik restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi ile çok yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. RFLP tekniği ile kompleks organizmaların genomlarının haritalanması ilk olarak Botstein ve arkadaşları tarafından 1980 yılında geliştirilmiştir. RFLP

analizi, dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması esasına dayanır. RFLP tekniği, kesim enziminin tanıdığı bölgedeki tek nükleik asit baz değişikliğini dahi tanır. Tanıma yerinin baz dizilişi değişikliği farklı genotipler arasındaki polimorfizmin bir sebebidir. Ancak bu polimorfizm daha yaygın olarak kesim enziminin tanıdığı iki kesim bölgesi arasında parça eklenmesi (insersiyon) veya çıkmasından (delesyon) kaynaklanır.

RFLP tekniği temel olarak 4 aşamadan oluşur. Bunlar;

- DNA'nın izolasyonu,
- DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi,
- Kesilen DNA'nın elektroforezi,
- Jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesidir.

İzolasyonu takiben elde edilen DNA, rekombinant DNA teknolojisinde önemli bir yere sahip, spesifik bir DNA dizisini tanıyan ve buna göre kesim yapan restriksiyon enzimleri ile kesilir. Restriksiyon enzimlerinin sayıları yaklaşık olarak 1200 civarındadır ve bu enzimleri tip I, II, III olmak üzere üç farklı grupta toplamak mümkündür. Restriksiyon enzimlerinin kesim sonucunda oluşturduğu parçalara restriksiyon parçaları denir. DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabilir. Değişik enzimlerle muamele sonucunda farklı uzunluklarda restriksiyon parçaları oluşur ve bu parçalar jel elektroforezi yoluyla birbirlerinden ayrılabilirler.

RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA'daki kesim noktalarındaki değişimlerden faydalanılır. Bundan dolayı RFLP kolaylıkla uygulanabilen duyarlı bir yöntemdir. Bunun yanı sıra enzim seçimi oldukça önemlidir çünkü çok sayıda ya da çok yakın bantları değerlendirmek mümkün olmayabilir. Bu amaçla kullanılan temel yöntem Southern Blot Hibridizasyon yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle enzimlerle kesilen DNA jelde yürütülür. Ardından jelin üzerine aynı boyutta bir membran konulur. Böylece vakumla jeldeki DNA parçalarının membrana geçmesi sağlanır. Bunu takiben gelen son basamak ise hibridizasyon basamağıdır. Hibridizasyonda DNA'daki zincirlerden birinin tamamlayıcısı olan tek sarmallı DNA ya da RNA problemleri kullanılır.

Hibridizasyonu görebilmek için probun radyoaktif maddeler ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretlenmesi gerekir. Dolayısıyla sadece proba hibridize olan DNA parçaları gözlemlenebilir.

RFLP yöntemi genetik haritalama (Young ve ark. 1989), kültür bitkilerinin genetik çeşitlilik analizinde (Havey ve Bark, 1995) ve türlerin tanımlanmasında, ebeveyn analizinde ve adli tıpta kullanılmaktadır. Kodominant olması, yüksek seviyede polimorfizm göstermesi, güvenilir olması, laboratuvarlar arasında transfer edilebilir olması, dizi bilgisine ihtiyaç duymaması, tekniğin belli başlı avantajları arasındadır. Radyoaktivite kullanılması, pahalı bir yöntem olması, yüksek miktarda DNA'ya gereksinim duyması ve teknik olarak uzmanlık gerektirmesi bu tekniğin dezavantajlarını oluşturur (Tingey ve ark. 2003).

1.3.2. AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

AFLP ya da çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi PCR temelli bir markör sistemidir (Vos ve ark. 1995). PCR amplifikasyonu ile çoklu DNA restriksiyon fragmentlerini ortaya çıkaran bir DNA parmak izi yöntemidir. AFLP tekniği temel olarak şu basamakları içerir:

- DNA'nın iki restriksiyon enzimi ile kesimi,
- Restriksiyon fragmentlerinin uçlarına çift zincirli adaptörlerin ligasyonu,
- Birleştirilen bu adaptörlere uygun primer ile restriksiyon fragmentlerinin preamplifikasyonu,
- Çoğaltılmış restriksiyon fragmentlerinin denatüre tabaka jel ya da tüplerde jel elektroforezi,
- DNA parmakizi'nin otoradyografi ya da diğer metotlarla gözlemlenmesi.

AFLP primerleri olarak bilinen amplifikasyon primerleri, genellikle 17-21 nükleotit uzunluğundadır ve hedef dizilere kusursuzca uyum sağlarlar. Bu AFLP'nin güçlü ve güvenilir bir teknik olduğunu göstermektedir. Bu teknik amplifikasyon parametrelerindeki küçük varyasyonlardan etkilenmez. Bu teknolojinin en büyük avantajı, elde edilebilen yüksek markör sayısıdır. Tipik bir

AFLP parmakizi 50 ve 100 arasında çoğaltılmış fragment içerir. AFLP markörleri ile tespit edilen markör sayısı sıklığı, test edilen DNA örnekleri arasındaki polimorfizm seviyesine bağlıdır. AFLP analizi ile elde edilen polimorfizm, genelde restriksiyon bölgelerinde ya da restriksiyon bölgelerine bitişik seçici nükleotitlerdeki tek nükleotit değişikliğini yansıtmaktadır. Ayrıca, restriksiyon fragmentlerinin varlığını ya da büyüklüğünü etkileyen diğer etmenler de delesyon, insersiyon gibi kromozomal değişikliklerdir.

Mueller ve Wolfenbarger (1999)'a göre AFLP markörlerinin bireyler, populasyonlar ve bağımsız gelişen soylar örneğin türler arasındaki genetik varyasyonun tayin edilmesinde kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Yüksek derecede tekrarlanabilirliği ve kullanım kolaylığından dolayı AFLP markörleri sistematik, populasyon genetiği, DNA parmak izi, kantitatif özellik lokus haritalaması, gen akışı ve dağılımı, dış çaprazlama, introgresyon ve hibridizasyon durumlarını değerlendirmek için uygulanır. AFLP markörlerinin kapasitesinin son derece küçük genetik farklılıkları çözdüğü çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, Maughan ve ark. (1996) AFLP'nin tüm genomda sadece tek bir küçük bölgede farklılaşan soya fasülyesinin yakın izogenik ırklarını ayırt etmek için kullanılabildiğini göstermişlerdir.

AFLP ile tespit edilen lokus sayısının fazla olması, polimorfizm oranındaki yükseklik, tekrarlanabilirliği ve kararlılığından dolayı diğer tekniklere göre önemli avantajlara sahiptir. Ayrıca Vos ve ark. (1995) AFLP tekniğinin herhangi bir DNA bölgesine çalışılacak organizmanın genomik donanımı hakkında ön bir dizi bilgisine gereksinim duymadan uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir. Bu da AFLP tekniğinin önemli avantajları arasında yer alır. İş gücü ve masraf açısından değerlendirildiğinde ise orta seviyede olduğu söylenebilir.

1.3.3. RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

Bu teknikte seçilen primerlerle genomik DNA'nın çeşitli bölgeleri rasgele çoğaltılır. Bu yöntemin uygulanması için genomik DNA'ya ait dizin bilgisine veya seçilen primerlerin dizin bilgisine gerek yoktur. RAPD'in temelindeki teknik

PCR metodudur. Her PCR reaksiyonu istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılması ve bu iki primer ile sınırlandırılmış bölgenin sentezlenmesine dayanır (Williams ve ark. 1990).

Artyukova ve ark. (2004) RAPD analizinin tüm genom içindeki polimorfik durumları tespit ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca RAPD analizinin bitkilerde türler ve populasyonlar arasındaki akrabalığın aydınlatılmasında ve özellikle nadir türlerde son derece önemli bir durum olan az miktarda DNA ile bu yöntemin gerçekleşebildiğini ifade etmişlerdir. Fischer ve Matthies (1998); Fischer ve ark. (2000); Huff ve ark. (1993) moleküler markörlerin özellikle RAPD tekniğinin bitkilerde populasyon genetiği çalışmalarında geniş ölçüde kullanıldığı ifade etmişlerdir. Ge ve ark. (1999); Heum ve ark. (1994); Huff ve ark. (1993)'na göre bu teknik bitki populasyonlarındaki genetik çeşitlilik ve akrabalığın belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte RAPD tekniği DNA parmak izi analizinde, genetik haritalamada ve bitki ve hayvan ıslahı çalışmalarında tercih edilen bir yöntem durumundadır.

RAPD-PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. RAPD tekniği izoenzim ve diğer DNA markörlerinden de fazla avantajlara sahiptir. Bunlar hızlı bir teknik olması, maliyetinin oldukça düşük olması ve çok düşük miktarda bitki materyalinin kullanılması olarak sayılabilir. Cardoso ve ark (1998); Wen and Hsiao (2001); Wroblewska ve ark. (2003); Zhang ve ark. (2005) RAPD markörlerinin daha az örnek büyüklüğüne gereksinim duyan özellikle dış çaprazlanan türlerle yapılmış çalışmalar için uygun olduğunu tespit etmişlerdir. Çünkü çok fazla miktarda polimorfik lokus üretilebilir. Bu durum çok az bireyle temsil edilebilen nadir ve tehlike altındaki taksonların genetik durumları belirleyen koruma çalışmaları ile ilişkilendirilmektedir (Li ve ark. 2002; Shah ve ark. 2008).

1.3.4. ISSR (Basit Dizin Arası Tekrarları)

ISSR polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı bir markör sistemidir. ISSR tekniği iki mikrosatellit arasındaki DNA bölgesini çoğaltmak için belirli bir SSR'ye spesifik uç bağlantılı bir primer kullanır (Shi ve ark. 2006). Prevost ve Wilkinson (1999); Qian ve ark. (2001); Zietkiewicz ve ark. (1994), çok sayıda amplifikasyon ürününün komşu ve ters çevrilmiş SSR'ler arasındaki bölgeden üretilbileceğini kaydetmişlerdir

Mikrosatellitler AA, AG, CAG gibi mono-nükleotid, di-nükleotid, tri-nükleotid tekrarlardır ve bunlar 4 ila 10 tekrar halinde bulunurlar. ISSR tekniğinde di-nükleotid ve tri-nükleotid tekrarları primer olarak kullanılır. Çünkü bunlar nüklear genomlar için karakteristiktir. Mono-nükleotidler ise kloroplast DNA'sında bulunurlar ve bu nedenle bu teknik için pek tercih edilmezler. Tri-nükleotid ve tetra-nükleotidler ISSR'lerde di-nükleotitlerden daha az kullanılır. ISSR primerleri çok değişken mikrosatellitlerin bulunduğu DNA parçasına 3' ucundan bağlanır. Dejenere olmuş dizilerde ise 5' ucundan bağlanır. RAPD primerlerine göre ISSR'ler 45-60°C'de çalışan, uzun, daha hassas ve daha yüksek eşleşebilme kapasitesine sahip primerlerdir. ISSR primerleri genellikle 200-2000 bp uzunluğundadır. ISSR'ler primer olarak kullanıldığında primer tekrar bölgesine bağlanır ve temiz bantlar oluşur. 5'-bağlantılı primerler kullanıldığında ürünler mikrosatellit dizilerini içerir ve genomdaki varyasyon uzunlukları ve bantların sayısı yüksek derecede polimorfizm gösterir. Genellikle di-nükleotid tekrarları 3' ucundan 5' ucuna doğru bağlanır. 3' ucuna bağlanan primerler 5' ucuna bağlananla karşılaştırıldığında daha belirgin bantlaşma gösterirler. ISSR'lerin yüksek çoğalma yeteneği vardır. Hem agaroz hem de poliakrilamid jel elektroforezinde tespiti yapılabilmektedir.

AFLP ve RAPD'e göre ISSR birçok avantaja sahip basit ve çabuk bir metottur. ISSR analizleri yüksek sıklıkta PCR amplifikasyonu sağlayan (Wolfe ve ark. 1998) ve yüksek ölçüde çoğalabilirliği garanti eden (Yang ve ark. 1996) daha uzun diziye sahip primerlerden dolayı RAPD analizlerinden daha güvenilirlerdir. Buna ek olarak Reddy ve ark. (2002) ISSR markörlerinin AFLP'nin yüksek maliyetinin, SSR'nin karmaşıklığının ve RAPD tekniğinin düşük düzeyde

çoğalabilirliğinin üstesinden gelip, hızlı ve ekonomik bir teknik sunduğunu ortaya koymuşlardır.

ISSR markörleri yüksek derecede polimorfizm göstermelerinden dolayı genetik çalışmalarda, filogenetik analizlerde, gen tespitinde, genom haritalamalarında ve evrimsel biyolojide kullanışlı bir yöntemdir (Iwata ve ark. 2008). Zietkiewicz ve ark. (1994); Wolfe ve ark. (1998 a,b) ISSR markörlerinin interspesifik akrabalıkların ve hibridizasyon orjinlerinin belirlenmesinde daha uygun olduğunu göstermişlerdir.

1.3.5. SSR (Basit Dizin Tekrarları)

Ökaryotik genomlarda bulunan ardışık tekrarlanan 2-6 nükleotitli gruplara mikrosatellit denir. (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n ve (GACA)_n gibi. Burada 'n' ardışık tekrar sayısıdır. Tekrar üniteleri genellikle iki, üç, dört ya da beşli nükleotitlerdir. Mikrosatellit tekrarlarının sayısı DNA replikasyonundaki kaymadan dolayı yüksek derecede değişkendir. Mikrosatellit çeşitliliği PCR kullanılarak elde edilen DNA amplifikasyonu ile tespit edilir. Nadir korunmuş diziler olarak bilinen yan mikrosatellitler çoğaltılabilen DNA bölgesini belirtmek için kullanılır. Elde edilen DNA fragmentleri büyüklüklerine göre akrilamid ya da agaroz jelde elektroforez kullanılarak ayrılır. Ayrılmanın ardından fragmentler jel etidyum bromür ile boyanarak, radyoaktif işaretli primerlerin kullanımı ve otoradyografi ile gözlemlenerek, floresan işaretli primerlerin kullanımı ve dizi analizi cihazında PCR ürünlerinin yürütülmesi yöntemleri ile tespit edilir. Eğer ki bir birey farklı sayıdaki tekrarları ile iki mikrosatellit alleli için heterozigot ise, iki farklı büyüklükte bant tespit edilecektir (Frankham ve ark. 2004).

Biyolojik/evrimsel içerikte mikrosatellitler evebeyn analizleri için kullanışlı markörlerdir. Onlar bireyler ya da grupların akrabalık derecesi ile ilgili soruların cevaplanmasında da kullanılabilir. Zong-Yun ve ark. (2006) mikrosatellitlerin hem türler hem de populasyonlar içi ve arasındaki filogenetik akrabalığın, evrimin, genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi ve tanımlanmasında kullanılan güçlü markörler olduğu ortaya koymuşlardır. Mikrosatellitler tipik olarak doğal seleksiyona maruz kalmış lokuslar için genetik varyasyonun

tespitinde kullanılır. Çünkü arka arkaya olan tekrarlar genellikle DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerinde yer almaktadır (Frankham ve ark. 2004). Joshi ve ark. (2000) mikrosatellitlerin moleküler seviyedeki değişkenlik ve çeşitliliğin değerlendirilmesinde kullanıldığını ifade etmişlerdir. Ayrıca mikrosatellitler rutin olarak birçoğu tehlike altında olan türler olmak üzere çeşitli türlerde genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılmaktadır. Mameli ve ark. (2008). *Centaurea* cinsine ait endemik bir tür olan *Centaurea horrida*'da genetik çeşitlilik seviyesinin mikrosatellit markörleri kullanılarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Goldstein ve Schlötterer (1999)'a göre mikrosatellitler özellikle koruma biyolojisi çalışmalarında daha fazla dikkate alınmaktadır. Bunun yanı sıra mikrosatellitler filocoğrafik çalışmalar için de uygun veri sağlamaktadır. Bu çalışmalar geniş ölçekli bölgelerin fauna ve floralarının genetik tarihlerinin ve biyocoğrafyalarının açıklanması için yapılan araştırmalardır. Bu markörler yakın akraba türler arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesinde kullanışlı markörlerdir.

Mikrosatellitler genom haritalamalarında ve biyomedikal tanılarda da geniş ölçüde tercih edilen bir markör konumundadır. Zhebentyayeva ve ark. (2003)'na göre ise mikrosatellitler grupların genetik değişkenliklerinin araştırılmasında kullanılan en iyi moleküler markörlerdir. Mikrosatellit markörleri yakın akraba türlerde de başarılı biçimde kullanılmaktadır. Hughes ve ark. (2003) mikrosatellit lokuslarının türler arasında transfer edilebilir olmasına yönelik bir eğilimin var olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla mikrosatellit markörlerinin transfer edilebilirliğinin test edildiği pek çok araştırma mevcuttur (Wang ve ark. 2005; Dillon ve ark. 2005; Kindiger, 2006).

Mikrosatellitler özellikle DNA varyasyonunu ölçmek için diğer metotlardan daha fazla avantaja sahiptir. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz: minisatellit ya da RAPD gibi çoklu lokus markörlerinin aksine lokus-spesifik olması, RAPD ve AFLP'ye zıt olarak kodominant olması, PCR-temelli bir teknik olması, yüksek derecede polimorfik olması, bireylerin kimlik saptamasından yakın türler arasındaki akrabalık seviyelerinin belirlenmesine kadar çok farklı seviyelerde kullanışlı olmasıdır. Saghai-Maroofo ve ark. (1994) mikrosatellitlerin genomda çokça bulunmaları, düzenli dağılışı, yüksek polimorfizm, kodominantlık, PCR ile hızlı amplifikasyon, göstermeleri, oldukça basit bir biçimde

değerlendirilmeleri ve yayınlanmış primer dizileri ile kolayca diğer laboratuvarlar tarafından ulaşılabilir olmalarından dolayı kullanışlı markörler olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Vos ve ark. (1995), Senior ve Heun (1993) mikrosatellitleri RFLP ve RAPD'in getirdiği sınırlamaların üstesinden gelmek için önermişlerdir. Sahip olduğu bu avantajlara rağmen mikrosatellitler dezavantajlara da sahiptir. Örneğin, mikrosatellit markörleri çalışacak her bir tür için yeniden geliştirilmelidir. Bu işlem ise yüksek ölçüde iş gücü gerektiren ve pahalı bir işlemdir.

Mikrosatellitler geniş ölçüde aşağıda adı geçen bitkilerdeki genetik analizlerde kullanılmaktadır: arpa (Russell ve ark. 1997; Struss ve Plieske, 1998; Macaulay ve ark. 2001), buğday (Bryan ve ark. 1997; Stephenson ve ark. 1998; Prasad ve ark. 2000; Stachel ve ark. 2000; Song ve ark. 2002; Huang ve ark. 2002), kızıl buğday (Bertin ve ark. 2001), yabani buğday (Li ve ark. 2000; Fahima ve ark. 2002), pirinç (Panaud ve ark. 1996; Davierwala ve ark. 2000), *Elymus caninus* (Sun ve ark. 1998) ve karaçayır (Jones ve ark. 2001), soya (Akkaya ve ark. 1992; Powell ve ark. 1996), mısır (Taramino ve Tingey, 1996), patates (Provan ve ark. 1996a). Ayrıca mikrosatellitler pek çok endemik ve nesli tehlike altında bulunan bitki türlerinin analizinde de tercih edilen bir markör durumundadır. Endemik *Centaurea corymbosa* (Freville ve ark. 2001), *Centaurea tenorei* (Palermo ve ark. 2002), *Begonia socotrana* & *Begonia samhaensis* (Hughes ve ark. 2003), *Centaurea corymbosa* (Hardy ve ark. 2004), *Psathyrostachys huashanica* (Wang ve ark. 2006), *Metrosideros boninensis* (Kaneko ve ark. 2007), *Centaurea horrida* (Mameli ve ark. 2008), *Brassica oleracea* (Vischi ve ark. 2008), *Rheum tanguticum* (Chen ve ark. 2009) türlerinde mikrosatellitler başarı ile kullanılmıştır.

1.4. Tehlike Altında Bulunan Türlerin Korunması

Tehlike altında bulunan türler genellikle tehlike altında olmayan türlerden daha düşük seviyede genetik çeşitliliğe sahiptir (Swensen ve ark. 1995). Diğer bir ifade ile tehlike altındaki türlerin popülasyon büyüklüklerindeki azalma direk olarak genetik çeşitlilik kaybı ile sonuçlanır. Küçük ve izole popülasyonların artan

soy içi dölleme ve genetik çeşitlilik kaybına maruz kalmaları indirgenmiş üreme başarısı ve çevresel değişikliklere cevap oluşturma yeteneğinde azalmaya neden olur (Frankham ve ark. 2004).

Genel olarak bir populasyonun tehlike altında oluşu ya da korumaya gereksinim duyması iki faktör izlenerek anlaşılabilir. Bunlardan birisi habitat tahribidir. Eğer habitat tahribi bir populasyonu riske sokuyorsa, bilim adamları araştırma için bu populasyonu hedef alırlar. Örneğin, bir alışveriş merkezi tarafından habitatı yıkılacağı bilinen bir bitki populasyonu çalışılabilir.

Diğeri ise populasyon büyüklüğünde gözlemlenen değişiktir. Populasyonlar doğal ya da bilinmeyen sebeplerden dolayı gittikçe küçülebilir. Eğer bir türün tüm populasyonları küçük ise, bu türün gözetim altında bulundurulması gerekmektedir. Küçük bir populasyon rastgele ya da önceden tahmin edilmeyen olaylara karşı daha fazla hassastır. Bu tür olaylar doğal afetler, çevresel değişiklikler ya da mutasyonlar olabilir. Bu tipteki olaylar populasyon büyüklüğünde ansızın küçülmelere sebep olabilir (Ellstrand ve Elam, 1993). Bir türün populasyonu küçülmeye başlarsa, geriye kalan üyelerde gözlemlenen daha fazla düşüş genetik çeşitliliği şiddetli bir biçimde azaltabilir. Bu faktörler dışında bir populusyona ait türlerin tükenmesine ya da yok olmaya eğilim kazanmasına neden olabilecek diğeri sebepler artan soy içi çiftleşme zararlı mutasyon birikimi, bir populusyondaki heterozigotların sıklığında ya da heterozigotlukta azalma, parçalanmış populasyonlar, dış dölleme daralması, genetik sapma şeklinde sıralanabilir (Ellstrand ve Elam, 1993).

Tehlike altında bulunan türlerin korunmasında önemli karakterlerin çoğu nicel karakterlerdir. Korumada önemli olan karakterler organizmaların sağlık ve çoğalma eğilimlerini belirlemektedir. Bunlar bitkiler için tohum verimi, üretilen döl sayısı gibi nitelikleri içerir. Tüm bu nitelikler ‘nicel karakterler’ olarak tanımlanır. Dış dölleme yapan türlerdeki nicel karakterin hemen hemen tümü genetik çeşitlilik sergilemektedir. Nicel karakterler bitkilerde üreme karakterleri, büyüme oranı, kimyasal kompozisyon, davranış ve hastalıklara karşı direnç şeklinde karşımıza çıkar (Frankham ve ark. 2004).

1.4.1. Koruma Stratejilerinin Geliştirilmesi

Koruma genetikçileri bir organizmanın nasıl yönetilmesi gerektiği hakkında öneriler elde edebilmek için o organizmaya ait DNA izini kullanırlar. Araştırmacılar koruma çalışmalarında öncelikle ilgili türe ait tanımlama, envanter ve analiz çalışmalarını gerçekleştirirler. Bu amaçla,

- Populasyonları ve etkili alanlarını tanımlanır. (Carson, 1990). Çünkü organizmaların pek çok türü vardır; nesli tükenen ya da tükenme tehdidi altında olan türler genellikle önceliğe sahiptir.
- Populasyon gözlemlenir. Türlerin bilinen formları, farklı türleri sınıflandırmak için kullanılan morfolojik özellikler, türlerin bilinen ya da şüphelenilen akrabaları tespit edilmeye çalışılır.
- Populasyonlar ya da türler arasındaki akrabalık hakkında hipotezler oluşturulur ve genetik karakterleri (DNA ya da protein) kullanılarak bu hipotezler test edilir.
- Bilim adamı bu bilgileri toplar ve verileri analiz etmek için matematiksel modeller kullanır. Bilim adamı aynı organizmanın aynı populasyonlarının ne kadar çeşitliliğe sahip olduğunu ve populasyonlar arasında meydana gelen genetik bilgi (gen akışının) değişikliğinin oranını belirler.

Koruma çalışmalarının sonraki adımı ise verilerin yorumlanması ve koruma stratejilerinin geliştirilmesidir. Bilim adamları organizmanın tehlike altında olup olmadığına karar vermek amacıyla çalışmalarını sürdürürler. Bir yönetim stratejisi geliştirmeye başlamak için, organizmanın habitatı araştırılır (Jin ve ark. 2007). Organizmanın değişik sıcaklık, toprak ve su şartlarına olan adaptasyon derecesi test edilir. Genetik çeşitliliğin muhafaza edilmesinde önemli faktörler rol oynar, örneğin bitki tozlaştırıcılarının özellikleri ve kimliği test edilir. Tozlaşan türlerin sağlık ve refahı nesli tükenen bitki türlerinin hayatta kalması için kritik olabilir. İnsan, iklimatik ya da diğer faktörlerden dolayı türlerin habitat bütünlüğüne yönelik tehditler araştırılır. Tüm bu adımların başarıyla tamamlanmasının ardından tehdit altındaki tür için uygun bir koruma stratejisi

geliştirilmiş olur. Böylelikle ekolojik dengenin ve genetik çeşitliliğin devamı mümkün olabilecektir.

1.4.2. Koruma Yöntemleri

Bir ülkedeki bitkisel genetik zenginliğin veya dünyadaki belirli bir bitki türüne ait genetik kaynakların korunması için amaca uygun yöntemlere gereksinim vardır. Tohumların, bitkinin tamamının, bitki kısımlarının, doku veya hücrelerin korunmasını amaçlayan bu yöntemler üzerinde, özellikle 1970’li yıllardan itibaren yoğun çalışmalar yapılmaktadır. İnsanlığın geleceği açısından arz ettiği önem dikkate alınarak, bitki genetik kaynaklarının korunması konusu, Birleşmiş Milletler tarafından da ele alınmış ve son on yıl içinde bu alanda önemli adımlar atılarak belirli aşamalara gelinmiştir (Dokuzoğuz, 2005).

Bitki genetik kaynakları üç yöntem esas alınarak korunabilir:

Bütün Canlı Varlığın (Biyom) Korunması: Bu yöntem, tabiatta geniş alanlarda, bitki ve hayvanlardan meydana gelen bütün canlı varlığın korunması yöntemidir. Bu koruma yöntemi, mevcut türlerin erozyona uğrama hızını minimuma indirmesi bakımından olağanüstü önem taşımaktadır. Bununla beraber, faydalı bitkilere ait genetik kaynakların korunması açısından ise sınırlı bir öneme sahiptir (Dokuzoğuz, 2005).

‘In situ’ (yaşam ortamında) Koruma Sistemi: Bitkileri kendi doğal yetişme alanlarında korumayı amaçlayan yöntemdir. Böylece genetik materyalin bulunduğu sınırlı bir alan, insan veya evcil hayvanlar tarafından hiçbir şekilde kullanılmadan, olduğu gibi korunmaktadır (Dokuzoğuz, 2005). Bir canlı türünü ‘in situ’ korumaya almaya karar verince yapılacak ilk iş, hedef türün yayılış alanı, yayılış yerleri, populasyon sayıları, populasyon büyüklükleri, çeşitlilik dereceleri ve genetik yapıları ile ilgili tüm bilgileri toplamaktır. (Wallace, 2002). Nadir ve dar yayılış gösteren bitkilerin özellikle nesli tükenme tehdidi altında bulunan türlerin ‘in situ’ koruma yöntemi ile korunması gerekmektedir (Jin ve ark. 2007). Kültür bitkileri için bu yöntemin uygulanması söz konusu değildir. Yabani bitkiler

için ise, bu yöntem dışında bir koruma şeklinin uygulanması neredeyse imkansızdır (Dokuzoğuz, 2005). Türlerin kendi doğal yaşam alanlarında korunmaları, yaşamımızı devam ettirebilmek için doğal çevreye bağımlı olduğumuzu gösterir. Orman Bakanlığı'nın kurulmasından sonra, '*in situ*' koruma için gerekli kanun ve yönetmelikler tamamlanmıştır. Çevre ve Orman Bakanlığı '*in situ*' koruma ile ilgili ülkemizde yer alan önemli ve korunma gereksinimine sahip alanlarımız için değişik statülerde koruma alanları oluşturmuştur. Bunlar Milli Parklar, Tabiat Parkları, Doğayı Koruma Alanları, Doğa Anıtları, Yaban Hayatı Koruma Sahaları, Orman içi Dinlenme Alanları, Habitat/Tür Yönetim ve İşletme Alanları, Gen Yönetim Zonları, Gen Koruma Ormanları, Özel Çevre Koruma Alanları, gibi yerler, başlıca '*in situ*' koruma alanlarıdır. '*In situ*' korumaya katkıda bulunan bu alanların yönetiminden Milli Parklar, Av-Yaban Hayatı Genel Müdürlüğü sorumludur. Ulusal bir '*in situ*' koruma planının hazırlanışı, Çevre ve Orman Bakanlığı'nın koordinasyonu altında yürütülmektedir.

'Ex situ' (ortam dışında) Koruma Sistemi: Bu yöntemin temeli belirli bir bölgeye özgü bitki ya da bitki türlerine ait genetik çeşitliliği o türe ait materyaller toplayarak, koruma parsellerinde periyodik olarak yetiştirmektir. Çoğu bitkilerde, tohumların korunması yöntemi uygulanmaktadır. Tohumlar, soğuk depolarda uzun yıllar canlılıklarını yitirmeden muhafaza edilebilmektedir (Dokuzoğuz, 2005). Ex situ yöntemi; 1) inceleme, 2) toplama, 3) saklama-üretme ve yenileme, 4) değerlendirme-evalüasyon, 5) dökümantasyon, 6) dağıtım ve materyal değişimi, 7) muhafaza, 8) eğitim ve 9) işbirliği- örgütlenme aşamalarından meydana gelmektedir (Chang, 1985).

'Ex situ' korumada genetik malzemeler denetimli koşullarda korunmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda nesli tükenen türlerin koruma altına alınabilmesi için en iyi çarenin habitat koruması olduğu fikrinde görüş birliğine varılmıştır. Fakat ne yazık ki, habitat koruması pek çok durum için bir seçenek değildir. Pek çok türün doğal habitatı zaten tamamen imha edilmiştir ve diğerlerinin de büyüklükleri oldukça azalmıştır. Dolayısıyla pek çok tür için yok olma tehlikesi yakındır. Bazı durumlarda '*ex situ*' koruma, doğada yok olmaya doğru giden türlerin korunması için gereklidir (Maxted ve ark. 1997). Eğer doğal

populasyonların nesli tükenirse, ‘*ex situ*’ koruma populasyonu tehlike altındaki türlerin evrimsel sürecini belirler. Sonuç olarak, sınırlı populasyon içinde tutulan genetik varyasyon miktarı, ‘*ex situ*’ koruma başarısını sağlamak için oldukça kritiktir.

‘*Ex situ*’ koruma; koleksiyon bahçeleri, gen bankaları, tohum bankaları, hayvanat bahçeleri ve botanik bahçeleri kurulması ve bu kuruluşların uzun süre yaşayabilmesi için gerekli önlemlerin alınmasıyla gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda, botanik bahçeleri nadir ve tehlike altında olan bitkilerin ‘*ex situ*’ korumasında önemli bir rol oynamaktadır (Maunder, 1994a,b). Türkiye’de bitki genetik kaynaklarının korunmasına yönelik, sistemli ve nitelikteki projeli çalışmalar, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından, 1963 yılında Menemen/İzmir’de “Bitki Araştırma ve İntrodüksiyon Merkezi”nin kurulmasıyla başlamıştır. Bitki genetik kaynaklarıyla ilgili çalışmalar, hububat, yem bitkileri, yemelik baklagiller, sebzeler, sanayi bitkileri, süs bitkileri, aromatik ve tıbbi bitkiler, meyveler ile endemik bitki türlerinde karantina, giriş/belgeleme, saklama ve tohum fizyolojisi disiplinlerinde yürütülmektedir. İzmir’de Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde 1972’de kurulan Ulusal Gen Bankası’nda, 1964’ten beri toplanan bitki genetik kaynakları malzemesi saklanmaktadır. İzmir’de bütün bitki gruplarından toplam 50 bin dolayında, Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Gen Bankası’nda ise, ağırlıklı hububat olmak üzere, baklagiller ve yem bitkileri ile bazı endemik bitkilerden oluşan 6 bin dolayında malzeme korumaya alınmıştır (Anonim, 2002).

1.5. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar

Endemik bitkilerin korunmasına yönelik genetik temelli çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Bu tip çalışmalarda çok çeşitli moleküler markör sistemleri kullanılmaktadır. Bunların arasında başlıcaları RAPD, AFLP, ISSR, izozimler, allozimler ve SSR’lerdir. Bu markör çeşitliliğine karşın koruma stratejileri geliştirirken RAPD, ISSR, AFLP gibi dominant markörler yerine SSR, izozim, allozim gibi kodominant markörler tercih edilmektedir. Ayrıca *Centaurea*

cinsi içinde endemik bazı türlerin genetik çeşitliliği SSR ve izozim markörleri ile belirlenmeye çalışılmıştır.

Mikrosatellit (SSR) makörleri kullanarak genetik çeşitliliğin belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların bazıları kültüre alınmış türlerin ebeveyn analizi (Zoghلامي ve ark. 2009; Eiadthong ve ark. 1999; McGregor ve ark. 2000; Poljuha ve ark. 2008), genetik akrabalık (Doldi ve ark. 1997; Sun ve ark. 2001; Garcia ve ark. 2004; Sanchez-Perez ve ark. 2005; Bancheva ve ark. 2006; Chakravarthi & Naravaneni 2006; Zong-Yun ve ark. 2006; Baranek ve ark. 2006; Liu ve ark. 2006; Yong ve ark. 2006; Smulders ve ark. 2008; Brini ve ark. 2008; Korkovelos ve ark. 2008; Lorenzo ve ark. 2008; Xu-xiao ve ark. 2009), populasyon yapısı analizi (Belaj ve ark. 2007) gibi çalışmaları kapsamaktadır. Diğer taraftan birçok endemik tür için genetik çeşitlilik seviyesi SSR primerleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalara ait bazı örnekler şu şekildedir:

Freville ve ark. (2001) dar endemik bir bitki olan *Centaurea corymbosa*'nın genetik yapısını altı mikrosatellit lokusu kullanarak araştırmışlardır ve elde ettikleri sonuçları allozim analizi ile karşılaştırmışlardır. Mikrosatellit analizi populasyonlar arasında geniş bir farklılaşma olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca allozim lokuslarının gen akışı kapsamının tespitinde mikrosatellitlere göre daha güçsüz olduğu belirtilmiştir.

Dirlewanger ve ark. (2002) *Prunus persica* L.'da geliştirilmiş olan mikrosatellit markörlerini *Prunus avium* L.'daki genetik çeşitliliğin analizi için kullanmışlardır. Buna ilaveten elde ettikleri 41 mikrosatellit lokusunun pek çoğunun diğer *Prunus* türlerinde, Rosaceae familyasının diğer üyelerinde ve hatta diğer familyalarda dahi uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir.

Palermo ve ark. (2002) İtalya'ya endemik olan *Centaurea tenorei*'de hem populasyon içi hem de populasyonlar arası genetik varyasyon seviyesini allozim polimorfizmi kullanılarak değerlendirmişlerdir. *Centaurea tenorei*'a ait üç form arasındaki değişikliklerin populasyon büyüklüğü, çiftleşme sistemi ve farklı poliploidi seviyesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Hughes ve ark. (2003) Socotra adasına endemik *Begonia socotrana* ve Samha adasına endemik *Begonia samhaensis*'daki populasyon yapısını

mikrosatellit markörlerini aracılığıyla analiz etmişlerdir. *B. socotrana*'ya ait iki SSR primeri *B. samhaensis*'deki ürünleri çoğaltmıştır, fakat hiçbir varyasyon gözlemlenmemiştir. Bu türlerin korunma durumları değerlendirilmiş ve *B. samhaensis*'da gözlemlenen sınırlı populasyon büyüklüğünün yok olmaya karşı onu savunmasız bıraktığı tespit edilmiştir. Bu sebeple bu türlerin aktif bir şekilde korumaya ihtiyaç duydukları belirtilmiştir.

Hardy ve ark. (2004) çok yıllık ve nadir endemik bir bitki olan *Centaurea corymbosa* populasyonu içindeki polen dağılımını mikrosatellit verileri ile incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar, populasyon içinde lokal adaptasyon ile farklılaşmanın sağlanabilmesi için polen dağılımının oldukça geniş olduğunu göstermiştir.

Bancheva ve ark. (2006) Sicilya bölgesine endemik olan *Centaurea* cinsine ait toplam 7 taksondaki (*C. cineraria*, *C. busambarensis*, *C. ucrae subsp. ucrae*, *C. ucrae subsp. umbrosa*, *C. todari*, *C. erycina* and *C. saccensis*) genetik çeşitliliği izoenzimler kullanarak tespit etmeye çalışmışlardır. Bu çalışma kapsamında her bir populasyona ait allel sıklıkları ve genetik çeşitlilik değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre en yüksek genetik çeşitliliğe sahip olan *C. todari* taksonu olarak bulunmuştur. Ayrıca sadece Sicilya bölgesine endemik 5 taksona ait –*C. busambarensis*, *C. ucrae subsp. ucrae*, *C. ucrae subsp. umbrosa*, *C. erycina* and *C. saccensis*–populasyonlar arasında çok yüksek genetik benzerlik tespit etmişlerdir. *C. todari* taksonu ise en yüksek genetik benzerliği *C. cineraria* 'nın populasyonları ile göstermektedir.

Marrs ve ark. (2006) *Centaurea stoebe*'den 7 ve *Centaurea diffusa*'dan ise 2 mikrosatellit lokusunu izole etmişler ve tanımlanan her lokusun her iki türde de çoğaltıldığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri bu markörlerin populasyon yapısının belirlenmesinde kullanışlı olabileceğini bulmuşlardır.

Wang ve ark. (2006) endemik ve tehlike altında bir tür olan *Psathyrostachys huashanica*'nın genetik çeşitliliğini SSR markörleri kullanarak tespit etmişlerdir. Araştırmalara göre farklılaşma büyük ölçüde coğrafik olarak daha yüksek ve daha alçak alt populasyonlar arasında gerçekleşmiştir. Elde edilen bu veri, yüksekliğin farklı yükseltilerde bulunan alt populasyonlar arasındaki sınırlandırılmış gen akışının belirlenmesinde temel faktör olabileceğini

desteklemektedir ve aynı zamanda alt populasyonların farklılaşmasıyla sonuçlanmaktadır.

Kaneko ve ark. (2007) nesli tehlike altında olan endemik bitki *Metrosideros boninensis*'den 9 mikrosatellit lokusu izole etmişler ve tanımlamışlardır. Tanımlanan bu markörler genetik çeşitliliğin, genetik yapının ve gen akışının araştırılmasında ve *M. boninensis*' in korunmasının planlanmasında kullanışlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Marrs ve ark. (2008) Kuzey Amerika'da yayılış gösteren *Centaurea diffusa*'daki genetik çeşitlilik ve populasyon yapısını 5 polimorfik mikrosatellit lokusu kullanılarak araştırmışlardır. Yapılan analiz sonucunda sonradan doğaya tanıtılan populasyonların yapısının doğal populasyonlardan daha güçlü olduğu bulunmuştur.

Mameli ve ark. (2008) Sardinya adasına endemik olan *Centaurea horrida*'nın genetik yapısını incelemişlerdir. Bu çalışmada toplam 7 populasyon 4 SSR markörü ile incelenmiş ve *C. horrida*'nın yüksek düzeyde genetik çeşitliliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, elde edilen veriler ışığında koruma programları geliştirilmiştir. Türlerin koruma altına alınmasının o türlere ait genetik kaynakların verimsizleşmesinin önlenmesi için yeterli olabileceğini vurgulamışlardır.

Vischi ve ark. (2008) İtalya'da yetişen ve nesli tehlike altında olan *Brassica oleracea*'nın genetik yapısını SSR markörlerini kullanarak araştırmışlardır. 4 seleksiyon mikrosatellit markörleri ile tanımlanmış ve populasyon içi ve arasındaki benzerlik derecesinin değerlendirilmesi, genetik yapının yeniden yapılandırılması için diğer farklı 5 varyete ile karşılaştırılmıştır. 12 SSR polimorfik lokusunun analizi 4 seleksiyon arasında düşük genetik çeşitlilik varlığını göstermiştir.

Chen ve ark. (2009) nesli tükenme tehdidi altına olan ve tıbben önemi bulunan endemik *Rheum tanguticum*'nin populasyon yapısını ve genetik çeşitliliğini SSR markörleri kullanarak ortaya çıkarmışlardır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hem populasyon içinde hem de populasyonlar arasında yüksek genetik çeşitlilik gözlemlenmiştir. Ayrıca antropolojik etkilerin ve diğer faktörlerin bu türün genetik yapısını şekillendirebileceğini kaydetmişlerdir.

Setoguchi ve ark. (2009) Japonya’da yerel endemik olan ve nesli tükenme tehdidi ile karşı karşıya olan *Tricyrtis ishiana* için 9 mikrosatellit lokusu izole etmiş ve tanımlamışlardır. Tespit edilen allel sayısı 2-33 arasında değişiklik göstermektedir. Buna ilaveten araştırmacılar bu tür için geliştirilen primerlerin koruma stratejileri geliştirebilmesi amacıyla populasyon genetik çalışmalarında kullanışlı olabileceğini ifade etmişlerdir.

1.6. Amaç

Centaurea nivea sadece 5 lokalitede yayılış gösteren, yok olma tehlikesi bulunan nadir endemik bir türdür. Bu bitkiye yönelik ilk genetik amaçlı çalışma, bir ön çalışma kapsamında, laboratuvarımızda RAPD markörler kullanılarak yapılmıştır (Sözen ve Özaydın, 2009). Bu çalışmanın sonucunda çalışılan populasyonlarda yüksek genetik çeşitlilik ve populasyonlar arasında da orta derecede farklılaşma tespit edilmiştir. Fakat yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan bu bitki türü için koruma stratejileri geliştirirken salt RAPD markörlerinden elde edilen sonuçlardan yola çıkılması sağlıklı değildir. Çünkü RAPD markörler dominant markör olduğu için çalışılan bireyde homozigot veya heterozigotluk durumunu ayırt edemez. Ayrıca, RAPD markörlerinin güvenilirliğinin sınırlı olması, farklı laboratuvarlarda farklı sonuç vermesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda endemik bitkilerin korunmasına yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda genelde SSR ve allozimler gibi kodominant markörler tercih edilmektedir.

SSR markörleri kodominant markörlerdir ve RAPD, AFLP gibi dominant markörlere göre populasyon genetiği çalışmalarında daha sağlıklı sonuçlar verirler. SSR markörleri yüksek seviyede polimorfizm göstermeleri, lokus spesifik olmaları, kodominant olarak kalıtılmaları, genomdaki geniş dağılımları ve dolayısıyla nesiller ve hatta bireyler arasında yüksek seviyede polimorfizm sergilemeleri gibi özelliklerinden dolayı diğer markörlere göre daha avantajlıdır (Saghai-Maroofo ve ark. 1994; Feng ve ark. 2002). Bundan dolayı mikrosatellit markörleri populasyon genetik çalışmaları için favori markörlerdendir. Hatta son yıllarda bazı endemik bitki türleri için SSR markörleri geliştirilmiş ve bu

markörler yardımıyla yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar bitki türlerinin populasyon yapıları, genetik çeşitlilik seviyeleri hakkında bilgiler vermiş ve bu bilgiler koruma stratejileri geliştirmede kullanılmıştır.

Bu çalışma kapsamında ulaşılmak istenen amaç *Centaurea nivea*'ya ait genetik çeşitliliğin tespit edilmesinde kullanılabilecek yakın akraba türlerde izole edilen SSR markörlerinin belirlenmesi, *C. nivea*'da çalışan SSR primerleri ile genetik çeşitlilik değerlerinin bulunması ve elde edilen sonuçların RAPD markörlerle karşılaştırılması ve sonrasında elde edilen bilgiler ışığında bu bitkiye ait uygun koruma stratejilerinin geliştirilmesidir.

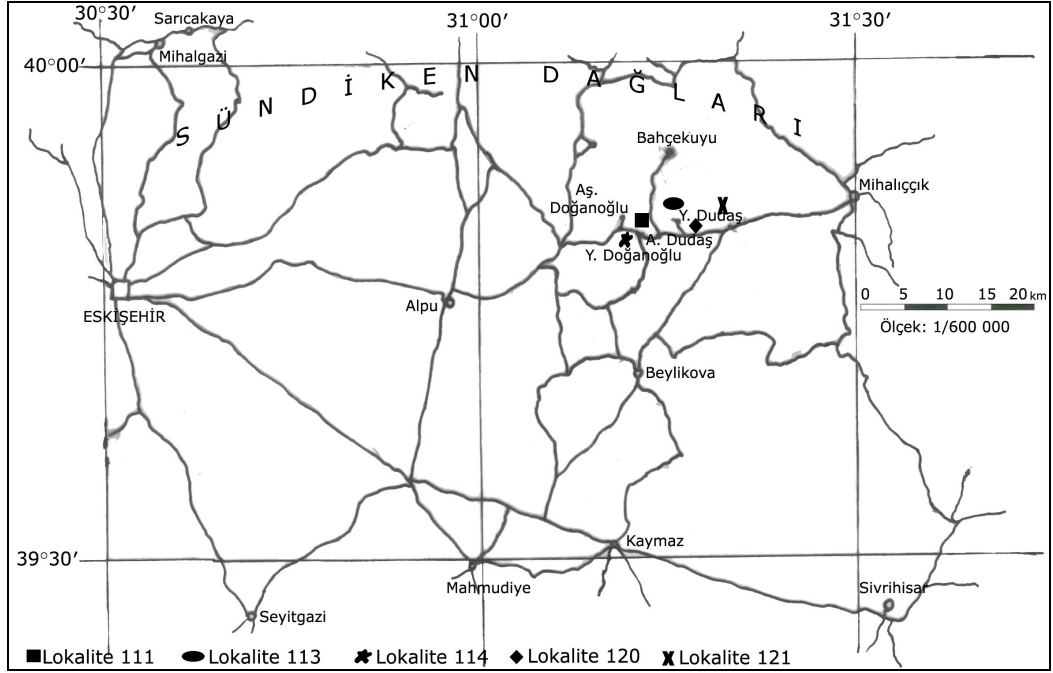
2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu tez kapsamında *Compositae* familyası ve *Cheirolepis* seksiyonuna ait *Centaurea nivea* türü materyal olarak seçilmiştir. Bu tür Eskişehir ilinden 2005-2006 yılları arasında yapılan arazi çalışmalarında 5 lokaliteden toplanmıştır. Bitki örnekleri her lokaliteden 30 örnek olacak şekilde ve birbirinden en az 10m uzaklıktaki bireylerden toplanmıştır. Her lokaliteden ayrıca tüm bitki örneği alınarak tayini yapılmış ve toplanan bitki örneklerinin *C. nivea*'ya ait olduğundan emin olunmuştur. Bu örnekler Anadolu Üniversitesi Herbaryumunda (ANES) saklanmaktadır. Toplanan yaprak örnekleri kilitli buzdolabı poşetlerinde, etiketli olarak - 20°C'de muhafaza edilmektedir.

Çizelge 2.1. Kullanılan *C. nivea* bitkisine ait lokalite bilgileri ve örnek sayıları

Populasyon kodu	Lokaliteler	Yükseklik(m)	Enlem(N) Boylam(E)	Örnek sayısı
1	Eskişehir; Mihalıççık-Alpu 24. km	940	N 39°50'43.9" E 31°13'47.0"	30
2	Eskişehir; Aşağı Dudaş- Bahçekuyu	949	N 39°50'48.8" E 31°13'47.5"	30
3	Eskişehir; Doğanoğlu	920	N 39°51'15.4" E 31°14'02.0"	30
4	Eskişehir; Eskişehir- Mihalıççık 60. km	930-950	N 39°50'11.2" E 31°15'51.1"	30
5	Eskişehir; Mihalıççık- Eskişehir 20. km	955	N 39°49'58.5" E 31°16'54.4"	30



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan bitkiye ait toplama lokalitelerinin harita üzerinde görünüşü

2.2. DNA İzolasyonu

Bitki örneklerine ait DNA'nın izolasyonu için Promega Wizard Genomik DNA Saflaştırma Kiti kullanılmıştır. Bu kitte belirtilen protokole göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

-20°C'de saklanan yaprak örnekleri öncelikle sıvı azot yardımıyla porselen havan ve tokmak kullanılarak öğütülmüş ve pudra haline getirilmiştir. Böylece var olan hücre duvarının mekanik olarak parçalanması sağlanmıştır.

Bu aşamadan sonra pudra haline getirilmiş olan materyalden 40 mg alınarak ependorf tüpüne aktarılmıştır. Ardından üzerine 600 µl hücre zarı parçalama solüsyonu (nuclei-lysis solution) eklenmiş ve 1-3 saniye kadar vorteksenerek hücrelerin bu solüsyonla muamele edilmesi sağlanmıştır. Karıştırılan örnekler 65°C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun bitiminden sonra tüpe 3 µl RNA_{az} solüsyonu eklenmiş, 2-5 kez ters-düz edilmek suretiyle örnek karıştırılmıştır. Ardından 37°C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek soğuması sağlanmıştır.

Bu işlemi takiben tüpe 200 µl protein çöktürme solüsyonu (protein precipitation solution) eklenmiş ve yüksek hızda 20 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra 13000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek tespit edilen proteinlerin ependorfun dip kısmında toplanması sağlanmıştır.

Ependorfun dip kısmında biriken proteinin üzerinde toplanmış DNA içeren süpernatant kısmı dikkatlice yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır. Bu basamakta süpernatant kısmı aktarılırken dip kısımda toplanmış proteinler ile DNA’nın kontamine edilmesinden kaçınılmıştır.

Alınan DNA solüsyonu üzerine oda sıcaklığında bulunan izopropanolden 600 µl eklenmiştir. Daha sonra solüsyon nazik bir şekilde ters-düz edilerek izopropanol ile iyice karışması sağlanmış ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Ardından oda sıcaklığında bulunan %70’lik etanolden 600 µl ilave edilmiş ve nazik bir şekilde tüp birkaç defa ters-düz edilerek DNA’nın etanol ile yıkanması sağlanmıştır. Bu işlemi takiben 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası tüpün içindeki etanol tamamen boşaltılmış ve tüpün ağzı 30-40 dakika açık bırakılarak DNA pelletinin kuruması sağlanmıştır. Elde edilen DNA pelleti 100 µl DNA rehidrasyon solüsyonu içinde çözündürülmüştür. Rehidrasyon süreci +4°C’de bir gece boyunca solüsyonun inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından elde edilen DNA 2-8°C arasında muhafaza edilmiştir.

2.3. İzole DNA’ların Miktarlarının Belirlenmesi

Bitki örneklerinden elde edilen DNA’ların miktar ve saflık dereceleri Nanodrop Spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okunarak tespit edilmiştir. Ayrıca DNA örneklerinin kalitesi %0,8’lik agaroz jelde yürütülerek de belirlenmiştir. Elde edilen miktarlar kullanılarak DNA’lar µl’inde 2.5 ng olacak şekilde seyreltilmiş ve çalışma solüsyonu olarak kullanılmıştır.

2.4. SSR-PCR ile DNA'nın oğaltılması

Bitki örneklerinden izole edilmiş DNA'lar ile Biogen firmasına sentezlettirilen primerler kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'nın amplifikasyonu PCR metodu ile yapılmıştır. Amplifikasyonda *C. corymbosa* (Freville ve ark. 2000) ve *C. stoebe* & *C. diffusa* (Marrs ve ark.2006) için geliştirilen 10 SSR markörü kullanılmıştır. Bu primerlerle ilgili ayrıntılı bilgiler çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. SSR-PCR çalışmasında kullanılan primerlerin dizileri, tekrar motifleri ve bağlanma ısıları

Primerin Adı	Primerin dizisi (5'.....3')	Tekrar motifleri	Bağlanma ısısı (°C)
12B1	F:CACACTCACGCTCAGCATTC R:CATCGTTTCCAAACTTCC	$(TA)_{27}$ $(GA)_{22}$	56°C
13D10	F:GGAGGCATGCGAACTAAAAG R:CCGGTCTCATGAAAACAAC	$(AC)_7$ $ATAC(AT)_{10}$	59°C
21D9	F:CATATACACCCACGCACAGC R:GGTGCAGCAAGGAGAGGAC	$(CA)_{20}$	60°C
28A7	F:TTTCTATGCTGTTTGTGTTTGG R:CCCATACGTCGTCTTCCC	$(CA)_{16}$	57°C
13A9	F: CCTGCGAGATGGCTAT R:TATCCCTACACCTCACTAACCC	$T_5(CT)_4T_2$ $(GT)_4$ $(CT)_2T_2$ $(CA)_{12}$	55°C
35C3	F: CCCTTCCACTTCTGATTTGAA R: TGTTTCTTCCCGTTAACCTCA	$(CA)_{16}$	55°C
37F7_AC	F: CTCGTAAATAATTAGCATTCT R: TTGCTTGAACCTAATTCTAT	$(AC)_{12}$	49.5°C
CM26	F:GAAGGGCTACGAGGGTGTTTC R:GAAGTGTTGTGCATTTCATCTATT	$(TG)_9T(TA)_2$	55°C
42CM27	F:TGGGATATTCGTTGGTTTAGTTTT R:CCTCCCCTCCCGTTTGAC	$(TG)_{14}$	58°C
CM15	F:GGAGGGCATGGGATTAAAGAGAT R:TGGATGCATCGGTCTGGAAATA	$(GT)_9$	55°C

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan formüller mevcuttur. Bu çalışmadaki primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesinde şu formül kullanılmıştır:

$$(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2\text{ }^{\circ}\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4\text{ }^{\circ}\text{C}$$

Bu formülden yardımıyla ileri ve geri primerlerin bağlanma sıcaklıkları tespit edilmiştir. İleri ve geri primerlerin sıcaklıklarının ortalaması alınmış ve o primer için bir bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir. Bu işlemin ardından primer bağlanma sıcaklıklarının optimizasyonu BioRAD gradient termal döngü aleti ile kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada her bir primer için belirlenmiş olan bağlanma sıcaklıklarının -4 ve +4 aralıkları denenerek en ideal bağlanma (annealing) sıcaklıkları tespit edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda denenen 10 SSR primerinden 3 tanesi *Centaurea nivea*'da çalışmış ve başarılı amplifikasyon göstermiştir.

PCR amplifikasyonları 12.5 µl'lik volümlerde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan reaksiyon volümlerinin her birinde yaklaşık 10 ng kalıp DNA, 2 mM dNTP karışımı (MBI Fermentas), 10 picomol ileri ve geri primer, 2,5 mM MgCl₂ (MBI Fermentas), 1U Taq DNA polimeraz enzimi (Sigma) ve 1X tampon solüsyonu içermektedir.

PCR reaksiyonları Techgene (Techne Ltd.) ve BioRAD gradient termal döngü aleti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR döngü koşulları ise;

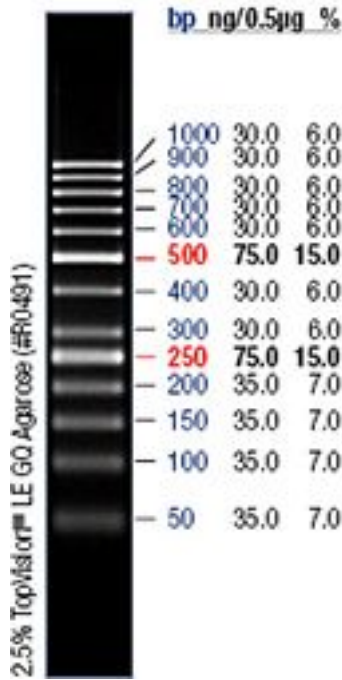
- 94°C'de ---5dk (denatürasyon) 1 döngü
- 94°C'de---45 sn (denatürasyon)
- 55-62°C'de ---45 sn (primer bağlanma) } 30 döngü
- 72°C'de ---1 dk (primer uzama)
- 72°C'de ---5 dk (son uzama basamağı) 1 döngü
- 4°C'de bekleme sıcaklığı olacak şekilde belirlenmiştir

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama

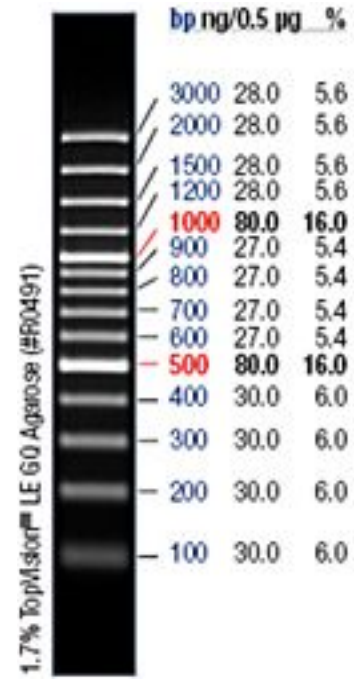
DNA ve PCR ürünleri yatay jel elektroforez kiti (Thermo Ltd.) kullanılarak agaroz jel üzerinde ayrıştırılmıştır. İzole ettiğimiz DNA'ların ayrımı için %0,8'lik, PCR ürünlerimizin ayrımı için %3'lük agaroz jeller kullanılmıştır. Agaroz jeller 5X TBE tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. 0.5X TBE tamponu içinde kaynatılan agaroz katılaştıktan önce 3 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırılmış ve jel tablasına dökülmüştür. Ayrıca 0.5X TBE tamponu elektroforez tankında tampon solüsyonu olarak kullanılmıştır.

PCR ürünlerini jelde yürütmek için her bir örnekten 5 µl alınmış ve 1 µl yükleme tamponu ilave edilerek kuyucuklara yüklenmiştir. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla jele 50 bp ve 100 bp markörleri de yüklenmiştir (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3). Yükleme işlemi tamamlanan %3'lük jel 90V'da 45-50 dakika yürütülmüştür.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra oluşan bant profilleri UV transilüminatörü altında gözlemlenmiş ve Uvitec marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır.



Şekil 2.2. Fermentas GeneRuler 50 bp DNA Ladder



Şekil 2.3. Fermentas GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus

2.6. Jel Fotoğraflarının Analizi ve Genetik Çeşitliliğin Hesaplanması

SSR-PCR çalışmaları sonucunda elde edilen bantlar sayesinde bireyler homozigot ve heterozigot olarak belirlenmiştir. Homozigot bireyler ‘AA’ ya da ‘BB’ ; heterozigot bireyler ise ‘AB’ şeklinde ifade edilmiştir. Bireyler arası genetik çeşitlilik POPGENE32 versiyon 1.32 (Population Genetic Analysis) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu

Doğadaki canlıların tümüne yakın kısmında genetik materyal DNA'dır. Bu nedenle genetik materyalle yapılacak çeşitli çalışmalarda moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanabilmesi için öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. Yaptığımız bu çalışmada *Centaurea nivea*'ya ait 5 popülasyondan toplanmış toplam 150 bireye ait yaprak örnekleri sıvı azot içinde, porselen havan ve tokmak yardımıyla pudra haline getirilmiştir. Daha sonra öğütülen bu materyalden Promega Wizard Genomik DNA Saflaştırma kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.1.1. DNA Miktar ve Saflık Tayini

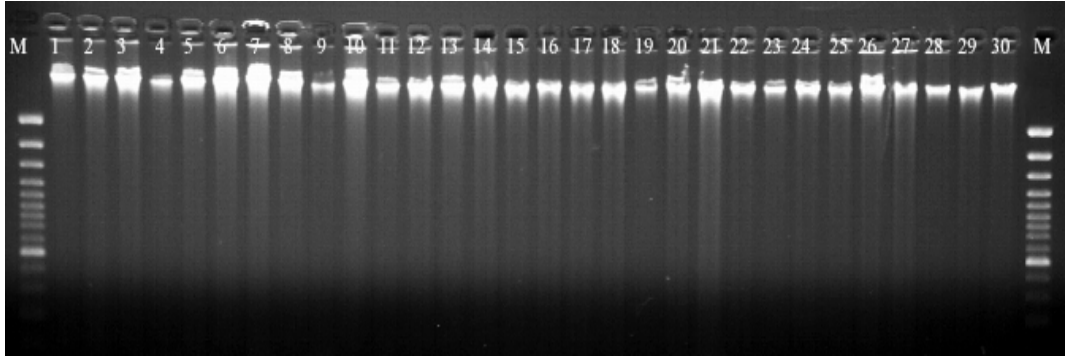
Nükleik asitlerin nanogram veya mikrogram düzeyindeki miktarlarının belirlenmesi, moleküler biyoloji alanında çalışan araştırmacılar için temel noktalardan biridir. Genellikle izole edilen kromozomal ve/veya kromozom dışı DNA'ların miktar tayininde absorpsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılır.

Toplam 150 bitki örneğinden izole edilmiş DNA'ların miktarları Nanodrop Spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre Promega Wizard Genomik DNA Saflaştırma kiti kullanılarak 40 mg öğütülmüş materyalden ortalama 134 ng/µl ve toplamda 6.7 ng genomik DNA elde edilmiştir.

260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri DNA ve RNA'yı birbirinden tam olarak ayırt edememektedir. Bununla beraber 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı (temizliği) hakkında bilgi vermektedir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık olarak 1.75-1.8'in üzerinde olmalıdır. Eğer ortamdan fenol ya da protein gibi kirleticiler yeterli düzeyde uzaklaştırılamamışsa bu değer beklenenden daha düşük olarak gözlemlenecektir. Bu çalışma kapsamında elde edilen her bir popülasyona ait 30

bireyin saflık değerleri 1.54-2.4 arasında değişmektedir. 1.75'in altında olan saflık değeri ilgili DNA örneklerinde fenol ve kloroform varlığını işaret etmektedir. Fakat elde edilen DNA'lar PCR analizinde başarı ile çalıştıklarından o örneklerden yeniden DNA izolasyonu yapmaya gerek kalmamıştır. *Centaurea nivea*'nın 5 popülasyonuna ait toplam 150 bireyin DNA miktar ve saflık değerleri çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5'de verilmiştir.

DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber tüm laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir. İzole edilen genomik DNA'ların saptabilmesi amacıyla %0.8'lik agaroz jeller yapılmış ve DNA'lar görüntülenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1.Çalışmada kullanılan 1. popülasyona ait genomik DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan 1. populasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri

1. lokaliteye ait bireyler	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
1	124,8	2.0
2	112,3	1.8
3	151,5	2.0
4	118,9	2.4
5	77,8	1.8
6	80,9	2.0
7	99,6	1.8
8	164,1	1.7
9	91,7	1.9
10	185,8	1.9
11	75,7	2.0
12	54,7	2.0
13	37,7	2.0
14	167,7	2.0
15	48,6	2.0
16	64,4	2.4
17	72,4	2.0
18	89,9	1.9
19	98,7	2.1
20	132,5	1.9
21	107,3	2.0
22	88,8	2.2
23	70,1	2.2
24	53,0	2.1
25	64,3	2.3
26	43,8	1.8
27	50,5	2.2
28	52,2	2.2
29	56,2	2.2
30	59,5	2.0

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan 2. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri

2. lokaliteye ait bireyler	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
1	85.7	2.0
2	175	2.0
3	82.6	1.72
4	90.5	1.62
5	118.3	1.74
6	69.7	1.66
7	158	1.90
8	121.6	1.72
9	138.3	1.82
10	109.4	1.63
11	126.5	1.62
12	66.6	1.63
13	101.3	1.59
14	253.1	1.64
15	117.8	1.61
16	59.8	1.70
17	118.5	1.68
18	115.8	1.60
19	69.4	1.79
20	67.4	1.75
21	141.4	1.70
22	85.2	1.72
23	95.2	1.58
24	148.6	1.53
25	212.6	1.56
26	285.3	1.56
27	174.1	1.61
28	72.7	1.81
29	96.6	1.75
30	64.1	1.74

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan 3. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri

3. lokaliteye ait bireyler	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
1	88.4	1.63
2	97.9	1.65
3	155	1.64
4	131.3	1.72
5	82.5	1.63
6	165	1.72
7	112	1.62
8	148	1.71
9	176.3	1.81
10	184	1.72
11	105.2	1.73
12	212.5	1.64
13	145.3	1.71
14	89.7	1.62
15	170.4	1.63
16	252.5	1.72
17	321.3	1.50
18	180	1.68
19	117.5	1.60
20	178.8	1.70
21	143.4	1.64
22	125.7	1.72
23	119.3	1.64
24	105.3	1.72
25	88.7	1.70
26	101.5	1.75
27	88.7	1.57
28	91.3	1.67
29	129.3	1.70
30	167	1.81

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan 4. popülasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri

4. lokaliteye ait bireyler	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
1	134	1.67
2	100.7	1.72
3	99.3	1.71
4	156.2	1.70
5	182	1.67
6	115.6	1.82
7	123.2	1.72
8	216.3	1.74
9	187.3	1.64
10	238.2	1.69
11	124.8	1.73
12	100.5	1.74
13	102.1	1.66
14	192.7	1.81
15	89.5	1.78
16	212.8	1.54
17	216.1	1.82
18	111.1	1.69
19	107.2	1.67
20	157.5	1.71
21	125	1.89
22	191.7	1.82
23	131.9	1.79
24	189.9	1.75
25	298.3	1.73
26	146.3	1.76
27	193.5	1.69
28	132.7	1.66
29	228.6	1.74
30	114	1.67

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan 5.populasyona ait bireylerin DNA miktar ve saflık değerleri

5. lokaliteye ait bireyler	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
1	163,7	1.69
2	136,3	1.67
3	77,5	1.62
4	61,6	1.72
5	108,6	1.75
6	81,8	1.54
7	82,7	1.58
8	64,5	1.73
9	114,4	1.61
10	146,7	1.72
11	72,4	1.66
12	61,3	1.82
13	133,4	1.76
14	109,8	1.71
15	170,8	1.81
16	77,5	1.69
17	73,9	1.67
18	207,8	1.78
19	68,1	1.61
20	57,7	1.67
21	65,4	1.82
22	105,2	1.72
23	120,4	1.75
24	73,4	1.67
25	67,3	1.75
26	98,3	1.62
27	132,4	1.74
28	156,6	1.78
29	124,6	1.82
30	88,2	1.79

3.2. SSR-PCR Optimizasyonu

Elde edilen genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan parametreler reaksiyon koşullarına karşı duyarlı olduğundan her bir parametrenin miktar ya da sıcaklığının optimize edilmiş olması gerekmektedir. Kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, primer, MgCl₂ konsantrasyonu, bağlanma (annealing) sıcaklığı ve çevresel faktörler DNA amplifikasyonunu etkilemektedir. Reaksiyon bileşeni olan her bir parametre için çeşitli reaksiyonlar kurularak optimum miktarlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu sayede optimum protokol elde edilmiştir.

3.2.1. Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu

Bu çalışmada *C. corymbosa* (Freville ve ark. 2000) ve *C. stoebe* & *C. diffusa* (Marrs ve ark. 2006) için geliştirilen 10 SSR markörü test edilmiştir. Her bir markör için 100 µM 'lık stok solüsyondan 2.5 µM'lık çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan çalışma solüsyonlarından 1, 1.5 ve 2 µl kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler agaroz jel ile kontrol edilmiş ve çalışan primerlerde en iyi sonuç 1 ve 1.5 µl'de alınmıştır. Primer konsantrasyonu uygulanan tüm protokollerde 1µl/12.5µl (5µM) olarak kullanılmıştır.

3.2.2. MgCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu

Magnezyum, Taq DNA polimeraz enziminin etkinliğini belirleyen önemli bir reaksiyon bileşenidir. Eğer reaksiyon karışımı içerisinde yeterli oranda magnezyum olmadığında Taq DNA polimeraz enziminin etkinliği azalır ve buna bağlı olarak amplifikasyon ya gerçekleşmez ya da çok zayıf sonuç verir. Tam tersi durumda yani ortamda fazla magnezyum varlığında ise enzimin spesifikliğı azalır ve istenmeyen ürün oluşumu söz konusu olur. Genellikle optimum Mg⁺² konsantrasyonu 0.5-5.0 mM'lık değerler arasındadır.

Mg konsantrasyonunu reaksiyonun spesifikliğini ve özellikle ürün kalitesini etkileyen bir faktördür. Bundan dolayı her bir primer için optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyonda 1, 1.5, 2 ve 2.5 µl olacak şekilde Mg^{+2} kullanılmış ve en iyi sonuçlar 1.5 ve 2 µl'lik konsantrasyonlardan elde edilmiştir. Sonuç olarak yapılan tüm protokollerde Mg^{+2} 1.5 µl konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Yapılan optimizasyon çalışmalarında Mg^{+2} konsantrasyonunun elde edilen bantların parlaklığını ve sayısını etkilediği sonucuna varılmıştır. Yüksek Mg^{+2} konsantrasyonunda elde edilen bantlar daha parlak olmasına karşın, spesifik olmayan amplifikasyon ürünü oluşumu meydana gelmiştir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonunda ise bant oluşumu daha silik ve zayıf olurken, ürün oluşumu da nispeten daha azdır.

3.2.3. Kalıp DNA konsantrasyonunun optimizasyonu

Kullanılan kalıp DNA polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) en kritik parametrelerinden birisidir. Reaksiyon koşullarının optimizasyonunda kalıp DNA miktarının da mutlaka optimize edilmesi gerekmektedir. İzole edilen DNA'nın saflığı ve kalitesi amplifikasyonun başarısını belirler. İzolasyon sırasında yeteri kadar ortamdan uzaklaştırılmayan fenol, protein, tuz gibi inhibitörler DNA'nın saflığını olumsuz yönde etkilemektedir. Kalıp DNA miktarının fazla olması amplifikasyonun başarısız olmasına yani hedef DNA'ya primerin bağlanmasına engel olabilir. Ayrıca reaksiyon içindeki kalıp DNA'nın azlığı ya da fazlalığı elde edilen amplifikasyon ürün sayısını, netliğini etkilemektedir.

İzole ettiğimiz DNA'lardan µl'de 2.5 ng olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Bu solüsyonlardan 2, 3, 4, 5 ve 6 µl DNA kullanılarak reaksiyonlar yapılmıştır. En iyi sonuçlar 4 ve 5 µl'de elde edilmiş ve gerçekleştirilen tüm reaksiyonlarda 4 µl yani 10 ng kalıp DNA kullanılmıştır.

3.2.4. Primer bağlanma ısısı optimizasyonu

Bu tez kapsamında *C. corymbosa* (Freville ve ark. 2000) ve *C. stoebe* & *C. diffusa* (Marrs ve ark. 2006) için daha önceden geliştirilmiş olan 10 SSR markörü tercih edilmiştir. Amplifikasyona başlamadan önce 10 primerin her birinin bağlanma (annealing) sıcaklığı belirlenmiştir. Bunun için öncelikle her bir primerin ileri ve geri dizilerinin bağlanma sıcaklıkları aşağıda verilen formül yardımıyla tespit edilmiştir:

$$[(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2\text{ }^{\circ}\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4\text{ }^{\circ}\text{C}].$$

İleri ve geri dizilerin belirlenen bağlanma sıcaklıklarının ortalaması alınarak bir optimum bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir. Belirlenen bu değerin -4 ve +4 °C aralıkları BioRAD gradient termal döngü aleti kullanılarak denenmiş ve primerin en iyi çalıştığı bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir.

Test edilen 10 SSR primer setinden sadece 3'ü 13D10, 13A9 ve CM15 *Centaurea nivea*'da güvenilir ve beklenen büyüklüklerde bant oluşturmuştur. Buna göre 13D10'dan elde edilen bantların büyüklüğü 170-200 bp, 13A9'dan elde edilen bant büyüklüğü 125-225 bp, CM15'ten elde edilen bantların büyüklüğü 170-220 bp'dir. *Centaurea nivea*'da çalışan 3 SSR primerinin optimize edilen bağlanma sıcaklıkları ve oluşturdukları ürünlerin moleküler ağırlık aralıkları çizelge 3.6'da verilmiştir.

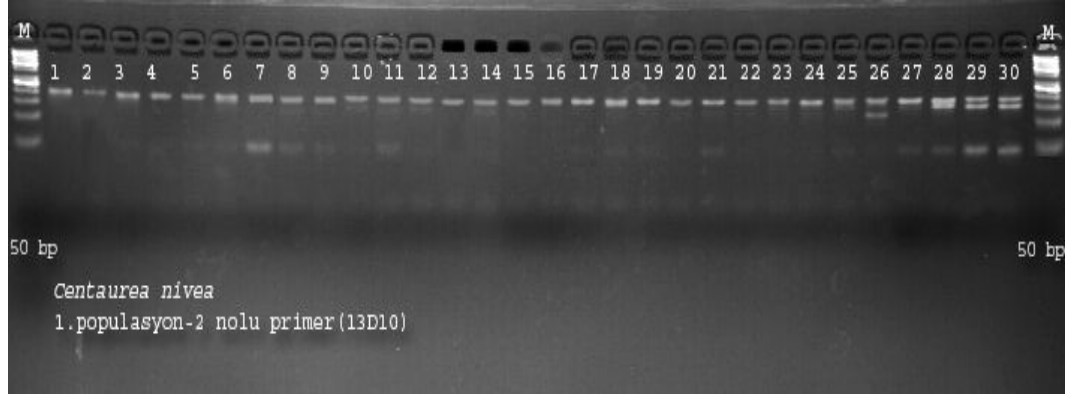
Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan primerlerin optimize edilen bağlanma sıcaklıkları ve oluşturdukları bant büyüklükleri

Çalışan Primerler	Optimize edilen sıcaklık değerleri (°C)	SSR primerlerinin <i>C. nivea</i> 'da oluşturduğu ürün büyüklükleri (bç)*	SSR primerlerinin diğer <i>Centaurea L.</i> 'larda oluşturduğu ürün büyüklükleri (bç)*
13D10	56°C	170-200 bç (<i>C.nivea</i> 'da)	178 bç (<i>C. corymbosa</i>), 167-207 bç (<i>C. horrida</i>)
13A9	55°C	125-225 bç (<i>C.nivea</i> 'da)	125 bç (<i>C. corymbosa</i>)
CM15	55°C	170-220 bç (<i>C.nivea</i> 'da)	185-220 bç (<i>C .stoebe</i> & <i>C. diffusa</i>)

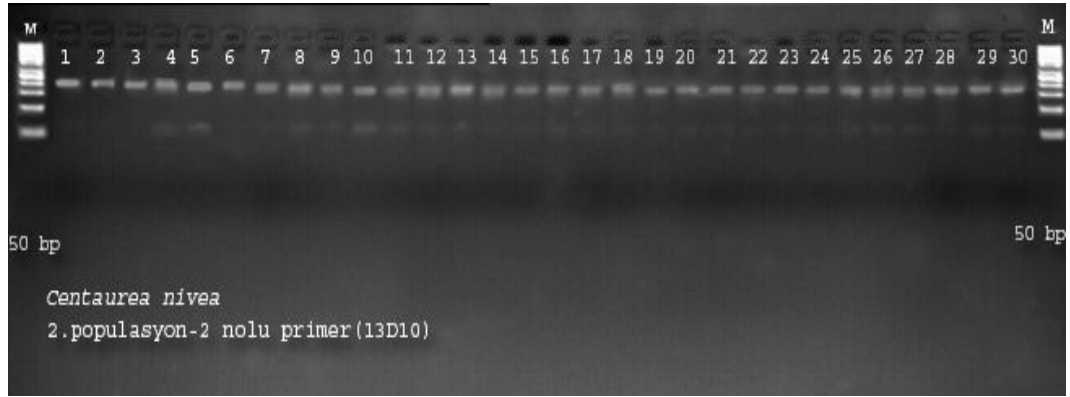
*:baz çifti

3.3. *Centaurea nivea*'nın Populasyon İçi ve Populasyonlar Arası Genetik Çeşitliliğin SSR Markörleri İle Belirlenmesi

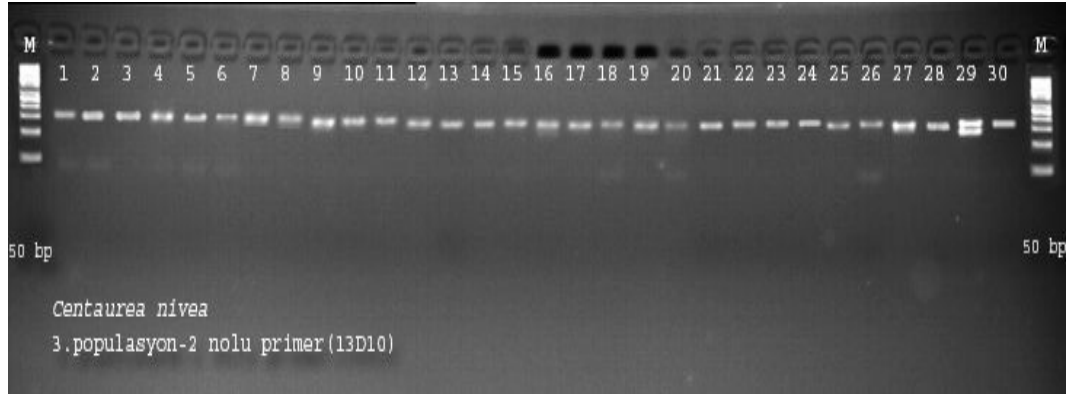
Centaurea nivea'nın populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğinin belirlenebilmesi amacıyla her bir populasyona ait birey sayısı 30 olmak üzere 5 populasyondan toplam 150 bitki örneği ile çalışılmıştır. 150 bitki örneğinden izole edilen DNA ile 3 SSR primeri kullanılarak PCR yapılmış ve PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ile elde edilen bantlar Şekil 3.2-3.16'da gösterilmiştir.



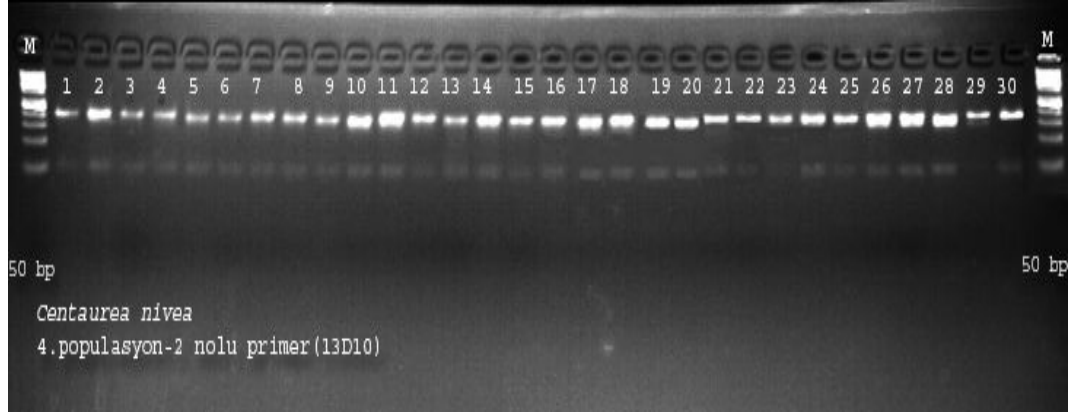
Şekil 3.2. 13D10 (S2) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 1. populasyonunda oluşan bant profilleri



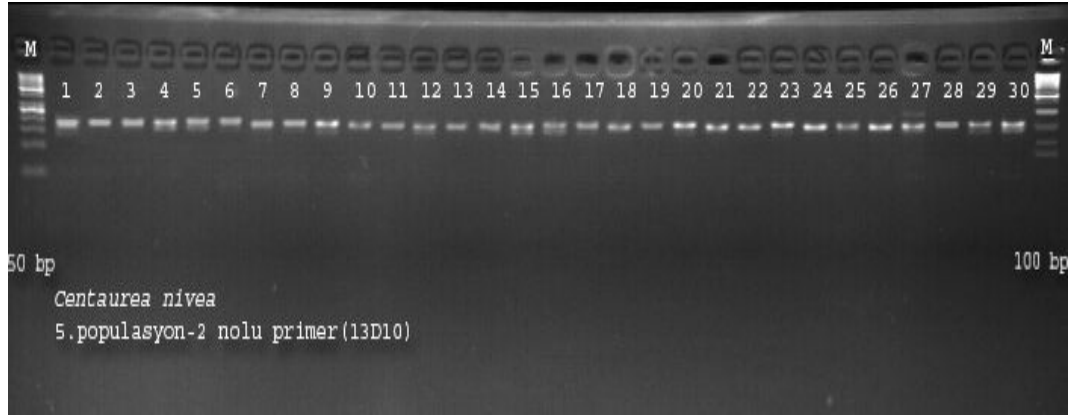
Şekil 3.3. 13D10 (S2) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 2. populasyonunda oluşan bant profilleri



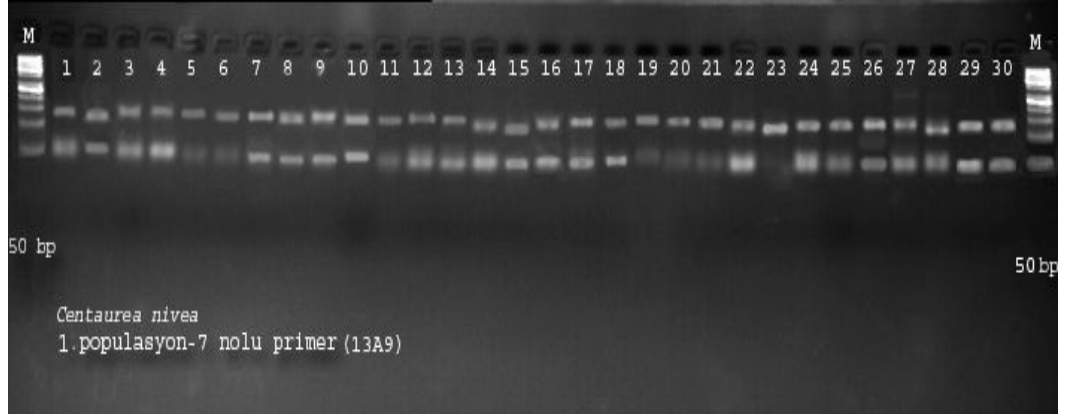
Şekil 3.4. 13D10 (S2) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 3. populasyonunda oluşan bant profilleri



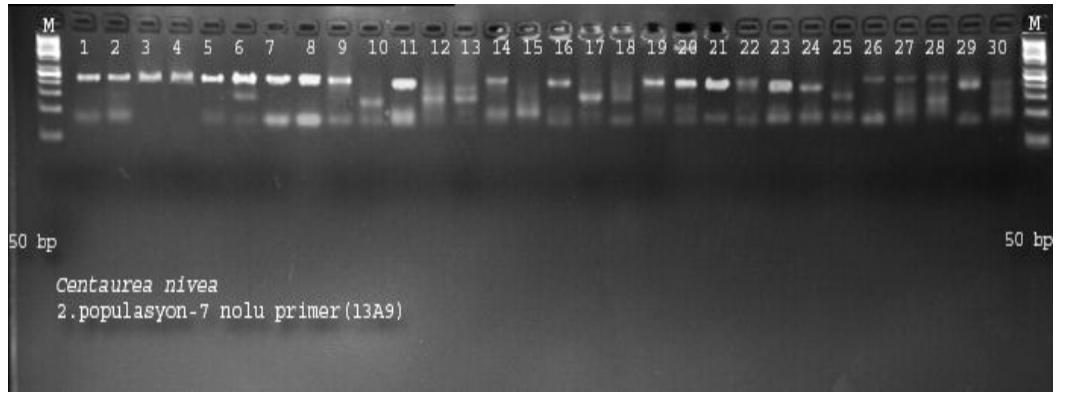
Şekil 3.5. 13D10 (S2) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 4. populasyonunda oluşan bant profilleri



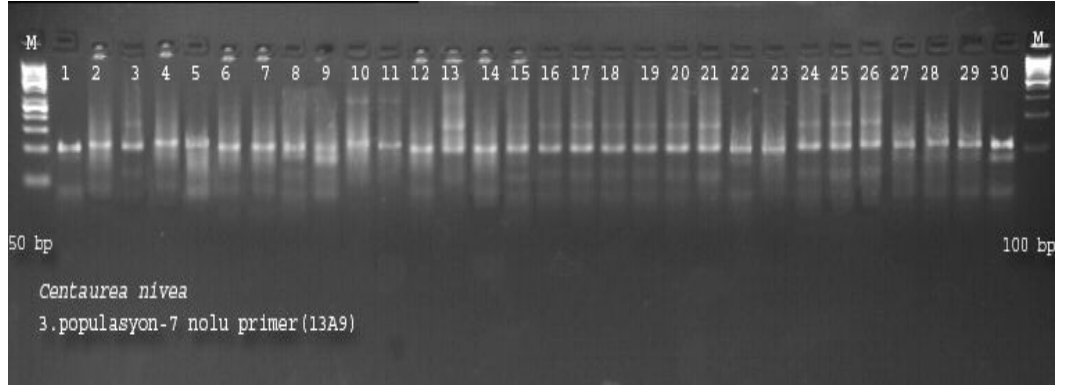
Şekil 3.6. 13D10 (S2) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 5. populasyonunda oluşan bant profilleri



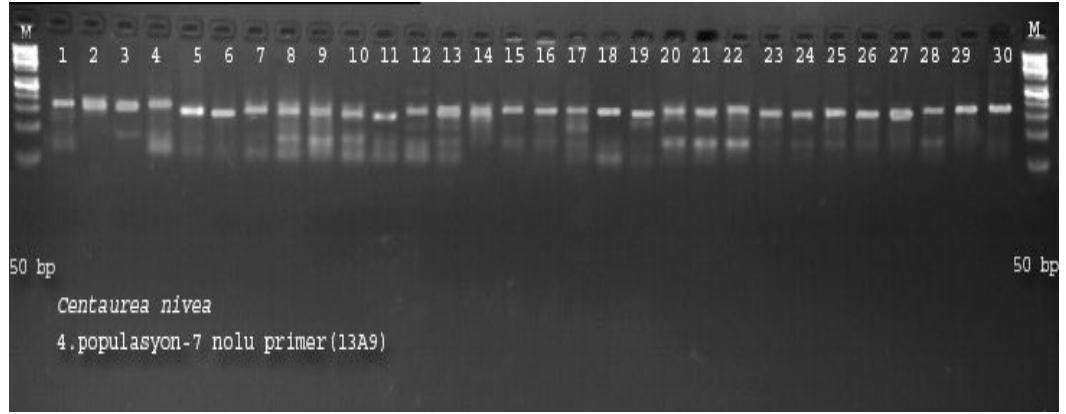
Şekil 3.7. 13A9 (S7) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 1. populasyonunda oluşan bant profilleri



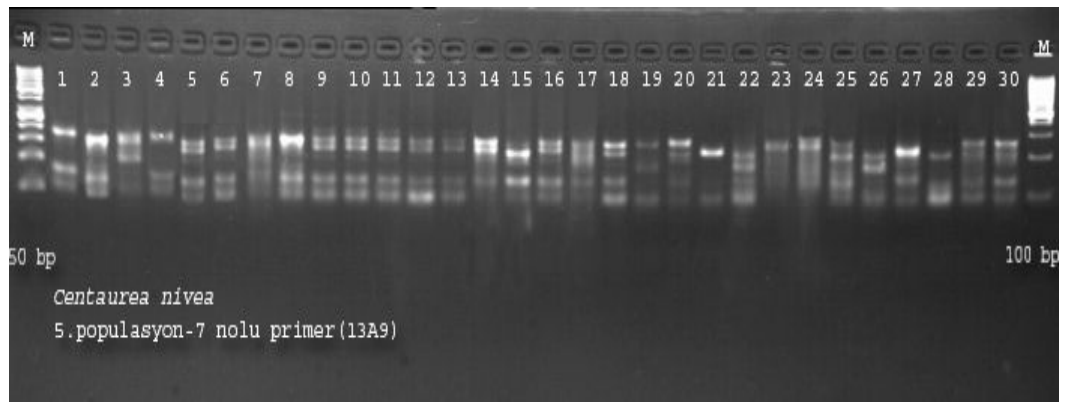
Şekil 3.8. 13A9 (S7) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 2. populasyonunda oluşan bant profilleri



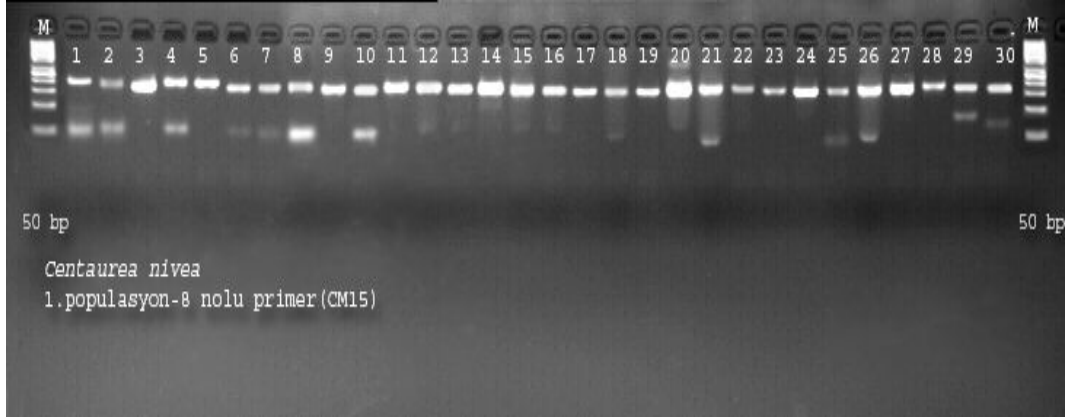
Şekil 3.9. 13A9 (S7) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 3. populasyonunda oluşan bant profilleri



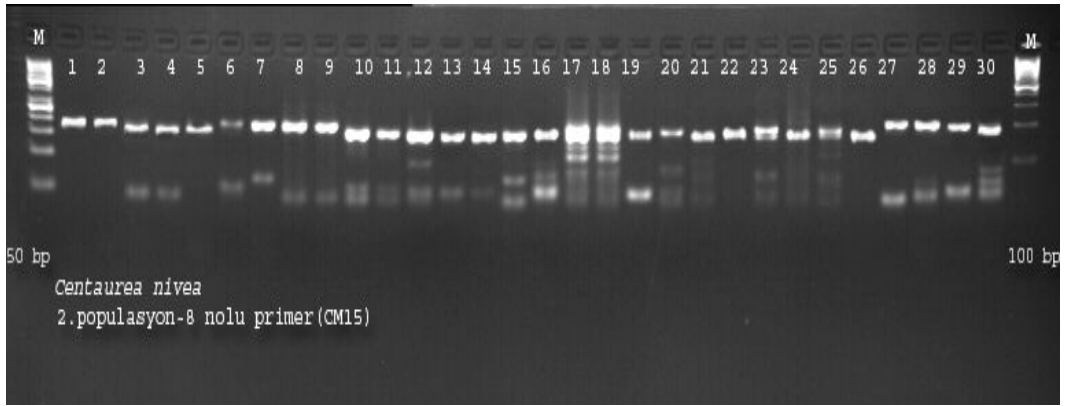
Şekil 3.10. 13A9 (S7) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 4. populasyonunda oluşan bant profilleri



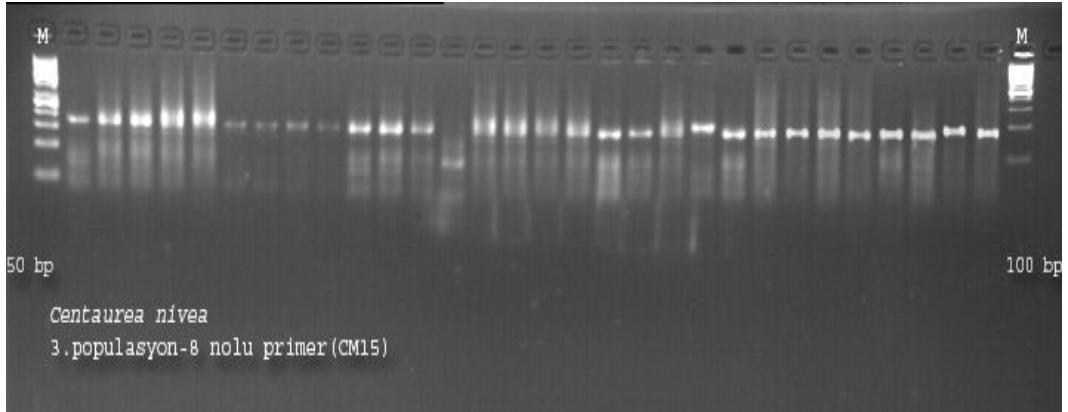
Şekil 3.11. 13A9 (S7) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 5. populasyonunda oluşan bant profilleri



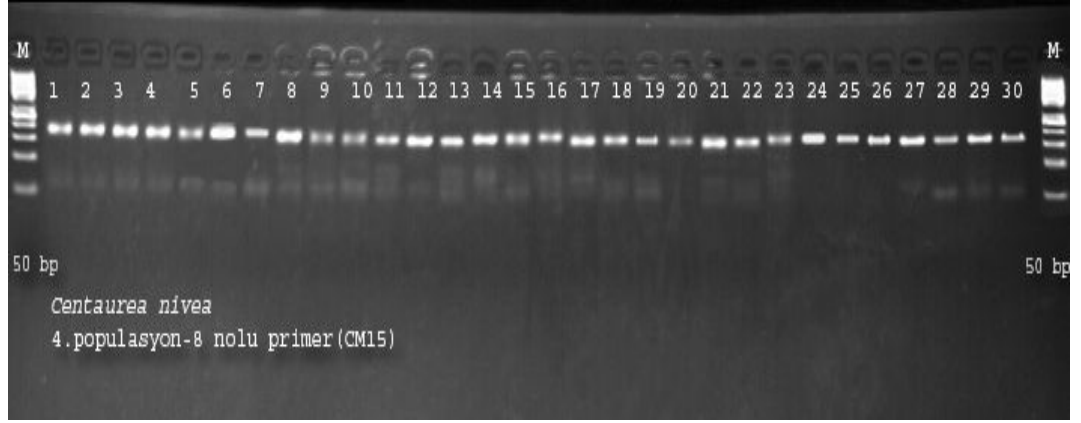
Şekil 3.12. CM15 (S8) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 1. populasyonunda oluşan bant profilleri



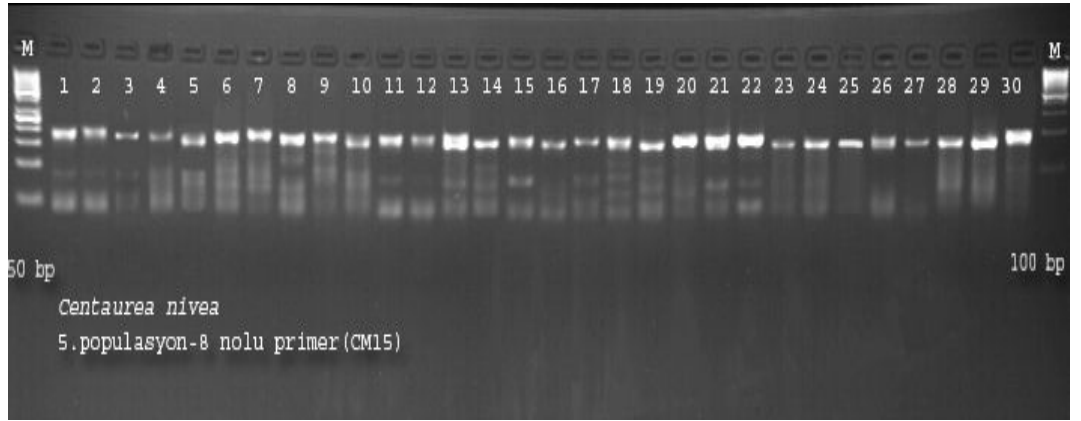
Şekil 3.13. CM15 (S8) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 2. populasyonunda oluşan bant profilleri



Şekil 3.14. CM15 (S8) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 3. populasyonunda oluşan bant profilleri



Şekil 3.15. CM15 (S8) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 4. populasyonunda oluşan bant profilleri



Şekil 3.16. CM15 (S8) no'lu primer ile *C. nivea*'nın 5. populasyonunda oluşan bant profilleri

Centaurea nivea'ya ait toplam 150 bitki 3 SSR markörü ile analiz edilmiş ve analiz sonucunda toplam 21 allel tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan tüm lokuslar yüksek düzeyde polimorfiktir. Her bir lokus için tespit edilen allel sayısı 5 ile 10 arasında değişmektedir. 13A9 lokusunda tespit edilen allel sayısı 10, 13D10 lokusunda tespit edilen allel sayısı 6, CM15 lokusunda tespit edilen allel sayısı 5'tir. En çok allel sayısına sahip lokus 13A9'dur.

Populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik analizi POPGENE 1.32 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gözlemlenen allel sayısı (n_a), etkili allel sayısı (n_e), Shannon'un indeks değerleri (I), beklenen heterozigotluk (H_e), gözlemlenen heterozigotluk (H_o), Nei beklenen heterozigotluğu (H_e), Wright'ın fiksasyon indeksi (F_{IS}) parametreleri genetik çeşitlilik seviyesinin tahmin edilebilmesi için POPGENE 1.32 (Yeh ve Yang, 1999) ile hesaplanmıştır. Ayrıca genetik farklılaşma derecesinin belirlenebilmesi amacıyla heterozigotların gen çeşitliliği oranı (F_{ST}) da hesaplanmıştır. Tüm bu genetik parametre değerleri çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. *Centaurea nivea*'a ait genetik parametre değerleri

Lokus	n_a	n_e	I	F_{ST}	N_m	F_{IS}	H_e	H_o	Nei (H_e)
13D10	6	2.5875	1.1481	0.0881	2.5893	0.3655	0.6156	0.3893	0.6135
13A9	10	7.7409	2.1515	0.1292	1.6851	0.4759	0.8737	0.4564	0.8708
CM15	5	3.3074	1.3595	0.1748	1.1803	0.4613	0.7000	0.3758	0.6976
Genel Ortalama	7	4.5453	1.5531	0.1322	1.6411	0.4342	0.7298	0.4072	0.7273

Yukarıda belirtildiği gibi gözlemlenen allel sayısı 13D10 lokusu için 6, 13A9 lokusu için 10 ve CM15 lokusu için 5 olarak bulunmuştur. 3 SSR lokusu için ortalama allel sayısı ise 7'dir. Etkili allel sayısı 13D10 lokusu için 2.5875, 13A9 lokusu için 7.7409 ve CM15 lokusu için 3.3074'tür. Toplam 3 SSR lokusu için hesaplanan ortalama etkili allel sayısının ise 4.5453 olduğu belirlenmiştir.

Shannon'un indeks değerleri 13A9 lokusu için en yüksek (I : 2.1515), 13D10 lokusu için ise en düşük (I : 1.1481) olarak bulunmuştur. Gözlemlenen heterozigotluk (H_o) değerleri lokuslar arasında 0.3758 ile 0.4564 arasında değişiklik gösterirken ortalama olarak 0.4072 olarak hesaplanmıştır. Beklenen heterozigotluk (H_e) değerleri lokuslar arasında 0.6156 ile 0.8737 arasında değişiklik göstermekte olup, ortalama değeri 0.7298 olarak tespit edilmiştir.

Nei beklenen heterozigotluk (H_e) değerleri 0.6135 ile 0.8708 arasında değişiklik gösterirken ortalama olarak 0.7273 olduğu grlmştir. Wright'ın fiksasyon indeksi (F_{IS}) ise lokuslar arasında 0.3655 ile 0.4759 arasında değişmektedir. Heterozigotların gen çeşitliliği oranı (F_{ST}) lokuslar arasında 0.0881 ile 0.1748 değişenlik gösterirken ortalama değeri 0.1322 olarak bulunmuştur.

Nei (1978)'yi temel alan genetik benzerlik ile genetik uzaklık matrisi izelge 3.8'de verilmiştir. Buna göre populasyonlar arası genetik uzaklık değerleri 0.2696-0.7640 arasında değişmektedir. Buna göre birbirine genetik olarak en yakın populasyonlar populasyon 3 ve populasyon 4, birbirine en uzak populasyonlarda populasyon 1 ve populasyon 2'dir.

Çizelge 3.8. *Centaurea nivea* için Nei (1978) genetik benzerlik ve genetik uzaklık lmleri

Pop. No	1	2	3	4	5
1	****	0.4658	0.6866	0.7509	0.7388
2	0.7640	****	0.5223	0.6246	0.7487
3	0.3760	0.6496	****	0.7637	0.7152
4	0.2865	0.4707	0.2696	****	0.7507
5	0.3027	0.2895	0.3352	0.2868	****

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Centaurea nivea (Dudaş Peygamber Çiçeği), *Compositae* familyasına ait bir bitkidir. *Compositae* familyasının en büyük cinsi olan *Centaurea* L. tür sayısı bakımından Türkiye florasında en çok tür içeren *Astragalus* ve *Verbascum* cinslerinin ardından 3. sırayı almaktadır. Bu cinsin dünyada Asya, Kuzey Afrika ve Amerika'da yaklaşık 600, Avrupa kıtasında 221 kadar türü yayılış göstermektedir (Tutin ve ark. 1976; Heywood, 1979; Brummitt, 2004). Türkiye'de yayılış gösteren *Centaurea* L. cinsi 185 türe ulaşmıştır. Bunlardan 116'sı endemik olup, endemizm oranı %62,7'dir. *Cheirolepis* seksiyonuna ait *Centaurea nivea* Eskişehir ilinde sadece 5 lokalite ile temsil edilen dar yayılış alanına sahip nadir endemik bir türdür. *C. nivea* Ekim ve ark. (2000)'nın hazırladığı "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı"na göre CR (Critically endangered) "Çok tehlikede" kategorisinde bulunmaktadır. Yakın zamanda yok olma tehlikesi riski altında bulunanlar ve populasyonları zarar görebileceği düşünülenler bu grup altında toplanmıştır. Bitkiler bu kategori altında toplanırken göz önünde bulundurulacak kriterler ise habitat özelliği değişimi, türün kaplama derecesinin azalması, toplama, başka takson istilası, melezleme, hastalık, tohum bağlamama, kirlenme gibi tehditler sonucu populasyonda 10 yıl içinde %80 kaybolma olasılığı bulunması; bitki toplam yayılış alanının 10 km² den az olması; çok parçalanmış veya tek lokasyondan bilinmesidir. *C. nivea*'nın bu kategoride yer alması bu türün incelenmesi, üzerinde durulması ve yapılan çalışmalar neticesinde uygun koruma programlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Yapılan literatür çalışmaları sırasında *Centaurea nivea* türüne ait yapılmış ayrıntılı ve özellikle moleküler düzeyde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *C. nivea*'nın morfolojik, anatomik ve ekolojik özellikleri ile birlikte genetik çeşitlilik düzeyinin araştırıldığı bir doktora tezi mevcuttur (Özaydın, 2007).

Bilindiği üzere rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA yani RAPD tekniğinin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü ve bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primerin kullanılması ve bu iki primer ile sınırlandırılmış bölgenin PCR ile çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bu yöntem bitkilerde türler ya da populasyonlar

arası genetik çeşitliliğin aydınlatılmasında (Artyukova ve ark. 2004), DNA parmak izi analizinde, genetik haritalamada ve bitki ve hayvan ıslahı çalışmalarında tercih edilen bir yöntem durumundadır (Fischer ve ark. 2000). RAPD tekniğinin diğer markörlerden belirli şekilde ayrılan avantaj ve dezavantajları vardır. Hızlı ve kolaylıkla sonuç vermesi, maliyetinin düşük olması, az miktarda DNA'ya gereksinim duyması ve primer tasarımı için dizi bilgisine ihtiyaç duymaması sahip olduğu avantajları arasında sayılmaktadır. Bununla birlikte, reaksiyon koşullarındaki değişikliklere aşırı duyarlı olmaları, çoğaltılabilirlik oranlarının düşük olması ve dominant markörler olmaları dolayısıyla güvenilirliklerinin sınırlı olması, homozigot ve heterozigot bireylerin ayırt edilememesi gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle RAPD çalışmalarının tamamlanabilmesi daha güvenilir moleküler markörlerin kullanılmasına bağlıdır (Schweder ve ark. 1995).

Centaurea nivea'da populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla RAPD markörleri kullanılmış ve bu türün populasyonlarının yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğu ve birbirine çok yakın lokalize olmuş populasyonların orta derecede genetik farklılaşma gösterdikleri belirlenmiştir (Sözen ve Özaydın, 2009). Bu veriler bu türe ait ilk genetik veriler olmakla beraber RAPD markörlerin doğası ve taşıdığı dezavantajlardan dolayı sağlıklı bir şekilde koruma stratejilerinin belirlenmesinde yeterli olamamaktadır.

Ökaryotik genomlarda bulunan ardışık tekrarlanan 2-6 nükleotitli gruplarına mikrosatellit adı verilmektedir. Nadir korunmuş diziler olarak bilinen mikrosatellitler çoğaltılabilen DNA bölgesini belirtmek için kullanılır. Mikrosatellit çeşitliliği PCR kullanılarak elde edilen DNA amplifikasyonu ile tespit edilmektedir. Mikrosatellitler hem türler hem de populasyonlar içi ve arasındaki filogenetik akrabalığın, evrimin, genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi ve tanımlanmasında kullanılan güçlü markörlerdir (Zong-Yun ve ark. 2006). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalara göre mikrosatellitler tehlike altındaki türler için koruma stratejilerinin geliştirilmesinde daha yaygın bir kullanıma sahiptir (Goldstein ve Schlötterer, 1999). Mikrosatellit markörleri de diğer teknikler gibi önemli avantaj ve bazı dezavantajlara sahiptir. Genel olarak mikrosatellitlerin genomda çokça bulunmaları, düzenli dağılışı, yüksek

polimorfizm, kodominantlık, PCR ile hızlı amplifikasyon göstermeleri, oldukça basit bir biçimde değerlendirilmeleri ve yayınlanmış primer dizileri ile kolayca diğer laboratuvarlar tarafından ulaşılabilir olmaları en önemli avantajları arasında değerlendirilmektedir (Saghai-Marooft ve ark. 1994). Yüksek düzeyde polimorfik olmaları ve kodominant olmaları dolayısıyla homozigot ve heterozigot bireyleri ayırt edilebilmesi mikrosatellit markörlerinin daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır. Mikrosatellitlerin her bir tür için yeniden geliştirilmesinin hem pahalı hem de çok iş gücü gerektirmesi bu markörlerin dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu dezavantaja rağmen bir tür için mevcut olan SSR markörleri akraba taksonlarda başarıyla kullanılabilir (Peakall ve ark. 1998; Hernandez ve ark. 2001; Rossetto, 2001; Chen ve ark. 2002; Clauss ve ark. 2002; Scott ve ark. 2003; Gonzalez-Martinez ve ark. 2004; Rohrer ve ark. 2004; Sudupak, 2004; Whitton ve ark. 1997; Westman ve Kresovich 1998; Kaplinsky ve ark. 2002). Bu durum bitki genomları arasında tekrar dizilerinin ve primer bağlanma bölgelerini de içine alan yan bölgelerin korunması ile mümkündür. Farklı türler arasındaki PCR amplifikasyon başarısı kaynak ve hedef tür arasındaki evrimsel uzaklığa bağlıdır (Westman ve Kresovich, 1998; Rossetto, 2001).

Bir tür için geliştirilen SSR markörlerinin yakın akraba türlerde kullanılabilirliğini gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Freville ve ark. (2000) tarafından *C. corymbosa* için geliştirilen 7 adet SSR markörünün 4'ünün *Centaurea* cinsine ait diğer endemik bir tür olan *Centaurea horrida*'da genetik çeşitlilik seviyesinin belirlenmesi amacıyla başarılı bir şekilde kullanıldığını tespit edilmiştir (Mameli ve ark. 2008). Chen ve ark. (2009) nesli tükenme tehdidi altında olan *Rheum tanguticum*'un genetik çeşitliliğini ve populasyon yapısını tespit etmek için Zhang ve ark.(2008) tarafından geliştirilmiş SSR markörlerini kullanmışlardır. Dillon ve ark. (2005) *Sorghum bicolor* için geliştirilmiş olan 12 SSR markörünü Avusturalya bölgesine özgü 25 *Sorghum* türündeki genetik çeşitliliğin değerlendirilmesinde kullanmışlardır. Test edilen SSR markörlerinin Avusturalya bölgesine özgü *Sorghum* türlerinin tanımlanmasında etkili ve oldukça bilgi verici oldukları kaydedilmiştir. Wang ve ark. (2005) başlıca tahıl ürünleri (kendi polenleri ile tozlaşan buğday ve pirinç, büyük ölçüde kendine tozlaşan sorgum ve dış kaynaklı polenlerle tozlaşma yapan mısır) için geliştirilmiş 210

SSR markörünün ikincil derecede öneme sahip türlerde (*Eleusine coracana*, *Paspalum vaginatum* ve *Cynodon dactylon*) kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. SSR markörlerinin türler arasında transfer edilebilme oranının genetik akrabalıkla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Kindiger (2009) 47 *Lolium* ssp. mikrosatellit primerini 8 *Poa* tür ya da alt türünün değerlendirmesinde kullanmıştır.

Bu tez kapsamında *C. corymbosa* (Freville ve ark. 2000) ve *C. stoebe* & *C. diffusa* (Marrs ve ark. 2006) için geliştirilen 10 SSR markörü *C. nivea*'nın genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla test edilmiştir. Her bir SSR primerinin bağlanma sıcaklığı öncelikle formül yardımıyla ardından termal döngü aleti kullanılarak belirlenmiştir. Diğer PCR parametrelerinin de ayrı ayrı optimizasyonu yapılmış ve *C. nivea*'da hangi primerlerin çalıştığı tespit edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları neticesinde toplam 3 SSR primerinin *C. nivea*'da çalıştığı belirlenmiştir. Bu primerler 13D10, 13A9 ve CM15 no'lu primerlerdir.

SSR markörlerinin transfer edilebilirliği test edilen türler arasındaki akrabalığa (DNA dizisindeki farklılık, genom büyüklüğü, evrimleşme oranı) ve uygulanan PCR koşullarına (kalıp DNA miktarı, bağlanma sıcaklığı, döngü sayısı ve iyon konsantrasyonuna) bağlıdır. Diğer *Centaurea* cinsleri için geliştirilmiş SSR primerlerinin *C. nivea*'da kullanılabilmesindeki başarı test edilen türler arasındaki yakın akrabalıkla açıklanabilir (Whitton ve ark. 1997; Westman ve Kresovich 1998; Kaplinsky ve ark. 2002). *C. nivea*'nın diğer türlerle cins düzeyindeki akrabalığı DNA dizilerindeki benzerliği doğurmuştur. *C. nivea*'da çalışan 13D10, 13A9 ve CM15 primerlerinden 13D10 *C. horrida*'da da başarı ile kullanılmıştır (Mameli ve ark. 2008). Bununla birlikte elde edilen bu sonuç geçmişten günümüze kadar olan süreçte test edilen bu türlerde mikrosatellit bölgelerinin oldukça korunduğunun da bir göstergesidir.

SSR primer çiftlerinin %GC içeriği de çapraz türler arasındaki amplifikasyonu etkilemektedir. Yüksek %GC içeriğine (~%50) sahip SSR primerleri mevcut PCR protokolü kullanılarak türler arasındaki başarılı amplifikasyon gösterirken, daha düşük %GC içeriğine (~%30) sahip primerlerin başarılı amplifikasyon gösterebilmeleri uygulanan protokolün büyük ölçüde

modifikasyona uğratılmasına bağlıdır (Dayanandan ve ark. 1997). *C. nivea*'da çalışan 13D10 primerinin %GC içeriği ~50, 13A9 primerinin %GC içeriği ~55 ve CM15 primerinin %GC içeriği ~50 'tir. Test edilen diğer 7 SSR primerine ait %GC içeriği ortalaması yaklaşık %30 civarındadır. Dolayısıyla bu durum diğer primerlerin *C. nivea*'da sonuç vermemesinin nedenlerinden biri olabilir.

SSR markörlerinin tekrar motifi ve tekrar uzunluğu çapraz türler arasındaki amplifikasyonu etkileyebilir (Weber, 1990; Taramino ve ark. 1997; Rossetto, 2001). Buradan *C. nivea*'da çalışan SSR primerlerine ait tekrar motiflerinin ve uzunluklarının bu primerlerin çalıştığı diğer *Centaurea* türlerinde de korunmuş olduğu sonucuna varılabilir.

Türler arasında SSR primerlerinin aktarılabilirliğini etkileyen diğer bir unsur olan PCR koşulları içinde en önemli parametre bağlanma sıcaklığıdır ve SSR markörlerinin çalışılan türler arasında transferini etkilemektedir (Wang ve ark. 2005). *C. nivea*'da denenen primerlerin bağlanma sıcaklıkları belirlenirken öncelikli olarak bu primerlerin diğer *Centaurea* türlerinde hangi sıcaklıkta çalıştıkları tespit edilmiş ardından optimizasyon bu sıcaklık derecesinin 4 derece üstü ve altında bir sıcaklık aralığı belirlenerek PCR reaksiyonları ısı gradienti ile gerçekleştirilmiştir. *C. nivea*'da çalışan primerlerimizden 13A9 *C. corymbosa* ile aynı bağlanma sıcaklığında (55°C), 13D10 primeri *C. horrida*'nın bağlanma sıcaklığından (59°C) düşük bir bağlanma sıcaklığında (56°C) ve CM15 primeri *C. stoebe* & *C. diffusa*'nın bağlanma sıcaklığından (55°C) daha yüksek bir bağlanma sıcaklığında (62°C) çalıştığı belirlenmiştir.

C. nivea'nın populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğinin belirlenebilmesi amacıyla her bir populasyondan 30 birey olmak üzere 5 populasyondan toplam 150 bitki örneği ile çalışılmıştır. 150 bitki örneğinden izole edilen DNA ile 3 SSR primeri kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar agaroz jel elektroforezi yardımıyla görüntülenmiş ve amplifikasyon sonucu oluşan bantlar sayesinde bireyler homozigot ve heterozigot olarak belirlenmiştir. Homozigot bireyler 'AA' ya da 'BB' ; heterozigot bireyler ise 'AB' şeklinde ifade edilmiştir. Bireyler arası genetik çeşitlilik POPGENE32 versiyon 1.32 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Buna göre, analiz sonucunda toplam 21 allel tanımlanmıştır. Çalışılan 3 SSR lokusu da yüksek

düzeyde polimorfizm göstermiştir. Her bir lokus için tespit edilen allel sayısı 5 ile 10 arasında değişmekte olup, en çok allel sayısına sahip lokus 13A9'dur. Genetik çeşitlilik analizinde kullanılan parametreler ve ortalama değerleri şu şekildedir: etkili allel sayısı (n_e) 4.5453, Shannon'un indeks değerleri (I) 1.5531, beklenen heterozigotluk (H_e) 0.7298, gözlemlenen heterozigotluk (H_o) 0.4072, Nei beklenen heterozigotluğu (H_e) 0.7273, Wright'ın fiksasyon indeksi (F_{IS}) 0.4342, heterozigotların gen çeşitliliği oranı (F_{ST}) 0.1322 olarak hesaplanmıştır. Populasyonlar arası genetik uzaklık değerleri 0.2696-0.7640 arasında değişiklik göstermektedir.

Genetik farklılaşma derecesinin tahmininde kullanılan F_{ST} değeri *C. nivea*'da 0,1322 bulunmuştur. Bu değer normalde 0 ile 1 arasında değişkenlik göstermektedir (Diaz ve ark. 2002). F_{ST} değeri 0.05 ve daha azsa populasyon içi genetik farklılaşma ihmal edilebilir düzeydedir, eğer bu değer 0.25'den büyükse ciddi ölçüde genetik farklılaşmadan söz edilebilir (Velioğlu ve ark. 2002). Tespit edilen bu değer *C. nivea* populasyonları arasında %13.22, populasyon içinde %86.78 genetik çeşitlilik bulunduğunu göstermektedir. Populasyon içi genetik çeşitlilik oldukça yüksek olmakla birlikte populasyonlar arasında da orta derecede genetik farklılaşma mevcuttur.

Populasyonlar arası gen akışının göstergelerinden birisi N_m değeridir. Bu değer F_{ST} değeri esas alınarak hesaplanmaktadır [$N_m = 0.25 (1 - F_{ST}) / F_{ST}$]. Gen akışı, basitçe populasyonlar arası gen aktarımını ifade etmektedir. Populasyonlar arasındaki coğrafik mesafe azaldıkça, populasyonlar arasındaki gen akımı artmaktadır (Kara, 1996). Populasyonlar arası gen akışını ve genetik yapıyı etkileyen önemli faktörden birisi üreme şeklidir. Populasyonlar veya alt populasyonlar arasındaki gen akışı genetik çeşitliliğin dağılımında önemli bir etkiye sahiptir (Kara, 1996). Dış döllenme yapan türlerin kendine döllen türlerle göre daha yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Hamrick ve Godt, 1989). N_m değeri *C. nivea*'da 1.6411 olarak bulunmuştur. Bu değer 1'den yüksek olması populasyonlar arası gen akışı olduğunu ortaya koymaktadır. *C. nivea*'nın hem eşeyli hem eşeysiz üreme gösteren bir bitki olduğu tahmin edilmektedir (Özaydın, 2007). Dolayısıyla N_m değeri seviyesi beklenen şekilde bulunmuştur.

Wright (1978)'ın fiksasyon indeksi (F_{IS}) ya da F-istatistiği geniş ölçüde populasyon yapısının tanımlanmasında kullanılan parametrelerdir (Nagylaki, 1998). Wright (1969) fiksasyon indeksi birleşen gametler arasındaki ilişki olarak tanımlanmıştır. F_{IS} değeri tüm populasyondaki heterozigot fenotiplerinin eksiklik ya da fazlalığının belirlenmesi ile gen sıklığı farklılığının ölçülmesidir (Diaz ve ark. 2002). F_{IS} değeri her bir alt populasyondaki heterozigotluğun Hardy-Weinberg dengesinden sapmasını göstermektedir. F_{IS} değeri -1 ile +1 arasında değişir. Her bir lokusta bulunan alleller için bu değer negatif ya da pozitif olabilmektedir. Negatif değerler heterozigotluk fazlalığına, pozitif değerler ise heterozigotluk azlığına işaret eder. *C. nivea*'da bu değer 13D10 lokusunda ortalama 0.3655, 13A9 lokusunda ortalama 0.4759 ve CM15 lokusunda ortalama 0.4613 olarak bulunmuştur. Çalışılan tüm lokuslar içinde heterozigotluk oranı en yüksek lokusun 13A9 olduğu tespit edilmiştir.

Shannon sabiti her bir populasyondaki varyasyon düzeyini göstermektedir. Allel frekanslarına dayanılarak hesaplanmaktadır. Her bir lokus için hesaplanıp, ortalaması alınarak tüm lokuslar için ortalama değeri bulunmaktadır (Lewontin, 1972). *C. nivea*'da bu değer lokuslar arasında 1.1481 ile 2.1515 arasında değişkenlik göstermekte olup ortalama değeri 1.5531 olarak hesaplanmıştır.

Gözlemlenen heterozigotluk (H_o) ve beklenen heterozigotluk (H_e) değerleri tüm populasyonlardaki her bir lokus için hesaplanmıştır. Gözlemlenen ortalama heterozigotluk (H_o) 0.4072 ve beklenen ortalama heterozigotluk (H_e) 0.7298 olarak bulunmuştur. Beklenen heterozigotluk ortalaması *C. nivea*'da yüksek genetik çeşitliliğin bir göstergesidir. Ayrıca Nei (1973) beklenen ortalama heterozigotluk değeri de 0.7273 olarak bulunmuştur. Tespit edilen bu değer beklenen ortalama heterozigotluk (H_e) değeri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Centaurea nivea'da populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik RAPD primerleri ile çalışılmış ve hem populasyon hem de tür seviyesinde yüksek genetik çeşitlilik tespit edilmiştir (Sözen ve Özaydın, 2009). Bu çalışmada polimorfik bant yüzdesi (PPB) %72.90, toplam heterozigotluk oranı (H_t) 0.2963, Shannon'un indeks değerleri (I) 0,3790, genetik çeşitlilik katsayısı (G_{st}) 0,1473 ve gen akışı (Nm) 2,893 olarak bulunmuştur. Tespit edilen bu değerlere göre *C. nivea* populasyonları içinde gözlemlenen genetik çeşitliliğin

(%85.27) populasyonlar arasında gözlemlenen (%14,73) fazla olduğu bildirilmiştir. Dominant karakterli RAPD markörlerden elde edilen bu değerlerin doğruluğunu kodominant karakterli SSR markörleri ile test ettiğimizde populasyon içi genetik çeşitlilik değeri %86.78, populasyonlar arası genetik çeşitlilik değeri %13.22 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin RAPD markörlerden elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Nadir bitkiler ayrı ya da parçalanmış nispeten küçük populasyonlar meydana getirirler (Holsinger ve Gottlieb,1991). Ayrıca bazı endemik bitkiler dar çevresel koşullara yani sınırlı genetik çeşitliliğe uyum sağlamış olarak gözükmemektedir (Godt ve ark. 1997). Küçük ve izole populasyonlar genetik sapmalara maruz kalır ve bundan dolayı genetik varyasyonlarının geniş populasyonlara oranla düşmesi beklenir. Benzer şekilde, nadir ve endemik türler de düşük genetik varyasyon sergilerler. Genellikle küçük yayılış alanına sahip türlerin daha geniş yayılış alanına sahip türlere göre düşük genetik çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir (Hamrick ve Godt, 1989). *C. nivea* dar yayılış gösteren tehlike altında endemik bir türdür. Normalde bu tip bitki türlerinde düşük genetik çeşitlilik gözlemlenmektedir. Buna karşın bu çalışmada *C. nivea*'da yüksek genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. Nadir ve dar yayılışlı bitkilerde yüksek genetik çeşitliliğin varlığı birkaç faktöre dayandırılarak açıklanmaktadır (Zawko ve ark. 2001). Bunlar; populasyon büyüklüğündeki doğal azalmayı takiben genetik çeşitliliğin azalması için henüz yeterli zamanın geçmemiş olması, küçük populasyon koşullarına genetik sistemin adaptasyon kazanması, devam eden genetik sistemin insan tahribatı ile yeni parçalanmalara maruz kalması ve yüksek dış döllenme oranından kaynaklı yoğun gen akışı olarak sıralanmaktadır (Maguire ve Sedgley, 1997). *C. nivea* populasyonları arasında yüksek gen akışı ve orta derecede genetik farklılaşma gözlemlenmesi bu populasyonların zaman içinde insan aktivitesi ile bozularak birbirinden ayrılmış tek ve yaygın bir populasyondan oluştukları sonucunu ortaya koyabilir (Sözen ve Özaydın, 2009).

Dar yayılış alanına sahip endemik *Centaurea* türleri dışında yer alan diğer pek çok nadir endemik bitki türünde de yüksek genetik çeşitlilik tespit edilmiştir. Örneğin; *Leucopogon obtectus* (Zawko ve ark. 2001), *Oxytropis chankaensis* (Artyukova ve ark. 2004), *Sinocalycanthus chinensis* (Li ve Jin, 2006), *Primula*

interjacens (Xue ve ark. 2004), *Castilleja levisecta* (Godt ve ark. 2005), *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* (Sun ve ark. 2006), *Swertia przewalskii* (Zang ve ark. 2007). Dar yayılış alanına sahip endemik *C. nivea*'da düşük genetik çeşitlilik beklenirken yüksek genetik çeşitliliğin tespiti bu türde genetik çeşitliliğinin kaybına neden olabilecek etkenlere maruz kalmadığının göstergesi olabilir. Ayrıca *C. nivea*'nın yayılış alanının büyüklüğü bu türün genetik çeşitliliğinin tahmininde iyi bir yol gösterici değildir (Sözen ve Özaydın, 2009).

Diğer endemik *Centaurea* türlerinde de benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Freville ve ark. (2001) nadir endemik bir tür olan *Centaurea corymbosa*'nın genetik çeşitliliğini mikrosatellit markörlerini kullanarak araştırmışlar ve beklenen heterozigotluk değerlerinin (*He*) 0.36-0.62 aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar populasyonlar arasında ileri derecede farklılaşma olduğunu ortaya koymuştur. Benzer diğer bir çalışma endemik *Centaurea tenorei*'de hem populasyon içi hem de populasyonlar arası genetik varyasyon seviyesi allozimlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Palermo ve ark. 2002). Bu çalışmada beklenen heterozigotluk değerleri (*He*) 0.08-0.34 arasında değişiklik göstermiştir. Endemik *Centaurea corymbosa* ile yapılan diğer bir çalışma ise populasyon içindeki polen dağılımının mikrosatellit markörleri kullanılarak incelenmesine yöneliktir (Hardy ve ark. 2004). Araştırma sonuçlarına göre beklenen heterozigotluk değerleri (*He*) 0.122-0.776 arasında değişmektedir. Bancheva ve ark. (2006) Sicilya bölgesine endemik toplam 7 *Centaurea* türüne ait genetik çeşitliliği allozimler kullanarak belirlediği çalışmada heterozigotluk değerleri 0.126-0.276 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. İncelenen 7 takson içinde en yüksek genetik çeşitliliğe sahip takson *C. todari* taksonu olmuştur. Son yıllarda mikrosatellit markörleri kullanılarak genetik çeşitliliğin tespit edilmeye çalışıldığı diğer bir endemik tür *Centaurea horrida*'dır (Mameli ve ark. 2008). Elde edilen sonuçlar önemli oranda genetik varyasyona işaret etmektedir (*He*: 0.603–0.854). Karşılaştırılan tüm endemik *Centaurea* türlerinde gözlemlenen yüksek genetik çeşitliliğin bu türlerin ağır çevresel koşullarda hayatta kalabilmelerini sağlayan önemli bir faktör olduğu tahmin edilmektedir (Mameli ve ark. 2008).

Türlerin uzun süre hayatta kalması ve evrimi populasyon içi ve populasyonlar arası yeterli genetik çeşitliliğin belirlenmesine bağlıdır (Barrett ve Kohn, 1991). Genetik çeşitlilik kaybı genellikle doğal populasyonların hayatta kalmasını tehdit etmektedir ve türlerin evrimsel potansiyelleri üzerinde çarpıcı etkilere sahiptir (Reed ve Frankham, 2003). Bitki türlerinde belirlenen genetik çeşitlilik, türlerin karakteristik özellikleri ve uzun süreli evrimsel tarihleri gibi genetik sapma, gen akışı, çoğalma modeli ve çiftleşme sistemini de içine alan birçok süreçten etkilenmektedir (Hamrick ve Godt, 1989). Dış döllen poplasyonlar arasında genellikle yüksek genetik çeşitlilik ve düşük genetik farklılaşma gözlemlenmektedir (Hamrick ve Godt 1996b). Yapılan arazi çalışmaları neticesinde *C. nivea* 'nın hem seksüel hem de aseksüel çoğaldığı belirlenmiştir. Ayrıca tozlaşmanın küçük böcekler ya da rüzgar aracılığıyla olduğu belirtilmiştir (Sözen ve Özaydın, 2009). Dolayısıyla *Centaurea nivea*'nın üreme mekanizmasının aydınlatılması gözlemlenen yüksek genetik çeşitliliğin sebeplerinin tespitinde yol gösterici olacaktır.

Centaurea nivea'da populasyon içi genetik çeşitliliğin populasyonlar arası genetik çeşitliliğe göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Türlerin değişen çevre koşullarına uyum sağlamaları için genetik çeşitliliklerinin yüksek olması gerektiği pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır.

Tehlike altındaki türlerin korunması, sağlam ve dayanıklı bir populasyon büyüklüğünün korunmasına bağlıdır (Carson, 1990). Korumadaki temel amaç, yok olmayı önlemek için yaşayabilir organizmalardaki evrimsel sürecin ve genetik çeşitliliğin belirlenmesidir (Falk ve Holsinger, 1991; Godt ve Hamrick 1995). Genetik çeşitlilik kaybı, hem kısa hem de uzun vadede demografik dalgalanmalara ve değişen çevre koşullarıyla başa çıkabilmek için türlerin yeteneklerinde bir azalmaya neden olabilir (Ellstrand ve Elam 1993; Milligan ve ark. 1994; Reisch ve ark. 2003). Nadir ve tehlike altında bulunan tür populasyonlarına ait genetik varyasyonun dağılımı uygun koruma stratejisinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Falk ve Holsinger, 1991; Francisco-Ortega ve ark. 2000). Var olan genetik çeşitlilik seviyelerinin belirlenmesi koruma biyolojisindeki temel amaçtır. Frankel (1974)' e göre genetik çeşitlilik kritik bir özelliktir, çünkü bu özellik doğrudan ekolojik başarıyı etkilemektedir. Çünkü

genetik çeşitlilik miktarı ve dağılımı türlerin ve populasyonların evrimsel potansiyelini muhtemelen etkileyecektir (Futuyma, 1986). Dolayısıyla, tehdit altında olan türlerin genetik çeşitlilik dağılımının ve seviyesinin doğru tahmini koruma programlarının belirlenmesinde önemli bir elementtir (Kim ve ark. 2005).

C. nivea'nın sadece marnlı topraklarda gelişim göstermesi, tohumların çimlenme kabiliyetlerinin düşük olması, üreme engeli olmamasına rağmen sağlıklı embriyo meydana getirememesi bu türün yayılış alanını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır (Özaydın, 2007). Buna ilave olarak her geçen gün antropojenik etkilere maruz kalması ve tarımsal faaliyetlere açık olması yayılış alanını sınırlayan diğer dış etkenler arasında sayılabilir. Bu sebeplerden dolayı *C. nivea*'a ait tüm populasyonların korunması gerekmektedir. Ekim ve ark. (2000)'nın hazırladığı "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı"na göre CR (Critically endangered) "Çok tehlikede" kategorisinde yer alması da bunu doğrulamaktadır.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda *C. nivea*'nın sahip olduğu yüksek genetik çeşitliliğin yok olma riskine karşın koruma altına alınması gerektiği sonucuna varılmıştır. Öncelikle bu türün yayılış alanının daha fazla tahribe uğramasının önüne geçilmesi gerekir. Bitki türlerinin korunmasındaki en iyi yol, yayılış gösterdikleri habitatın korunmasıdır (Li ve ark. 2002). Bu amaç doğrultusunda alınacak *in-situ* koruma prensibi bu türün habitatı ile birlikte koruma altına alınmasıdır. *Ex-situ* koruma prensipleri kapsamında tohumların tohum depolarında saklanması, özellikle nadir ve tehlike altında olan türlerin korunabilmesi için bunların botanik bahçelerinde yetiştirilmesi (Maunder, 1994) uygun görülür. *C. nivea* için *ex-situ* koruma planı uygulanacağında genetik çeşitlilik seviyesi yüksek bir ya da iki populasyondan yoğun şekilde örnekleme yapılması yeterli olacaktır.

Bununla birlikte, agaroz jel elektroforezinin küçük moleküler ağırlıklı bantları etkin bir şekilde ayırt edememesi nedeniyle çalışılan primerlerin oluşturduğu birbirine çok yakın büyüklükteki bantların ayırımı sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilememiş olabilir. Bu durum her bir primerden elde edilen allel sayısını da doğrudan etkileyecektir. Dolayısıyla, düşük örnek hacimleri ile çalışma olanağı sunan, kısa sürede analiz imkanı tanıyan ve yüksek verimli ayırım

gücüne sahip kapiler elektroforez tekniği kullanılarak elde edilen sonuçların güvenilirliğinin test edilmesi gerekebilir.

Sonuç olarak, *Centaurea nivea*'ya ait genetik çeşitlilik seviyesi SSR markörleri kullanılarak belirlenmiştir. Dar yayılış alanına sahip olan bu endemik türün populasyon içi genetik çeşitlilik seviyesinin yüksek olduğu ve populasyonlar arasında da orta derecede genetik farklılaşma bulunduğu görülmüştür. Elde edilen bu veriler aynı türde RAPD markörlerle yapılmış ön çalışmayı doğrular niteliktedir. Çalışmamızdan elde edilen bilgiler ışığında bu türe yönelik uygun koruma stratejileri önerilmiştir. Bu bağlamda, *C. nivea*'nın habitatıyla birlikte korunma altına alınması önemli bir nokta olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışma dar yayılış gösteren diğer endemik bitkilerin genetik çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik yapılacak çalışmalara da yol gösterici olması bakımından önemli bir değere sahiptir.

KAYNAKLAR

- Avila-Diaz, I., Oyama, K. (2007), "Conservation Genetics of an Endemic and Endangered Epiphytic *Laelia Speciosa* (Orchidaceae)", *American Journal of Botany*, **94** (2), 184–193.
- Artyukova, E.V., Kholina, A.B., Kozyrenko, M.M., Zhuravlev, Y.N. (2004), "Analysis of genetic variation in rare endemic species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) using RAPD markers", *Genetica*, **40** (7), 877-884.
- Anonim (2002), Sürdürülebilir Kalkınma Ulusal Raporu, Dünya Sürdürülebilir Kalkınma Zirvesi, Johannesburg 2002 Türkiye Ulusal Raporu Çevre Bakanlığı.
- Anonim (2005), *Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri*, Türkiye Çevre Vakfı Yayını Yayın No: 170, Önder Matbaa, Ankara.
- Baranek, M., Raddova, J., Pidra, M. (2006), "Comparative analysis of genetic diversity in *Prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers", *Scientia Horticulturae* **108**, 253-259.
- Belaj, A., Munoz-Diez, C., Baldoni, L., Porceddu, A., Barranco, D. & Satovic, Z. 2007: Genetic Diversity and Population Structure of Wild Olives from the North-western Mediterranean Assessed by SSR Markers, *Annals of Botany*, **100**, 449-458.
- Brini, W., Mars, M., Hormaza, J.I. (2008), "Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers", *Scientia Horticulturae* **115**, 337-341.
- Bancheva, S., Geraci, A., Raimondo, F.M. (2006), "Genetic diversity in the *Centaurea cineraria* group (Compositae) in Sicily using isozymes", *Plant Biosystems* **140** (1), 10-16.
- Carson, H.L. (1990), "Increasing genetic variance after a population bottleneck", *Trends in Ecology & Evolution*, **5**, 228-231.

- Chakravarthi, B.K., Naravaneni, R. (2006), "SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa*. L)", *African Journal of Biotechnology*, **5** (9), 684-688.
- Dillon, S.L., Lawrence, P.K., Henry, R.J. (2005), "The new use of *Sorghum* bicolor-derived SSR markers to evaluate genetic diversity in 17 Australian *Sorghum* species", *Plant Genetic Resources*, **3** (1), 19–28.
- Diaz, S., Dulout, F.N., Peral-Garcia, P. (2002), "Greater genetic variability in Argentine Creole than in Thoroughbred horses based on serum protein polymorphisms", *Genetics and Molecular Research*, **1** (3), 261-265.
- Dokuzoğuz, M. (1987), *Bitki Genetik Kaynakları*, Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri (Koor. A, Kence), Türkiye Çevre Vakfı Yayını, Önder Matbaa, Ankara.
- Ekim, T., Koyuncu M., Vural M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N. (2000), *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)*, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayını, Ankara.
- Ellstrand, N.C., Elam, D.R. (1993), "Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **24**, 217-242.
- Erik, S., Tarıkahya, B. (2004), "Türkiye Florası Üzerine", *Kebikeç*, **17**, 139-163.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2004), *A Primer of Conservation Genetics*, University Press, Cambridge.
- Falk, D.A., Holsinger, K.E. (Eds.) (1991), *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, New York
- Garcia, Antonio A.F., Benchimol, L.L., Barbosa, A.M.M., Geraldi, I.O., Souza Jr, C.L. De Souza, A.P. (2004), "Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines", *Genetics and Molecular Biology*, **27** (4), 579-588.
- Hardy, O.J., Gonzales-Martinez, S.C., Freville, H., Boquien, G., Mignot, A., Colas, B. & Oliveri, I. (2004), "Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae) I. Pattern of pollen dispersal", *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 795-806.

- Hughes, M., Hollingsworth, P.M., Miller, A.G. (2003), "Population genetic structure in the endemic *Begonia* of the Socotra archipelago", *Biological Conservation*, **113**, 277-284.
- Hedrick, P.W. (2001), "Conservation genetics: where are we now?" *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 629–636.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. (1996), "Conservation Genetics of Endemic Plant Species", In: Avise J.C. ve Hamrick J.L., (ed) *Conservation Genetics: case histories from nature*, 281-304, NY: Chapman and Hall, New York.
- Işık, K. (1996), *Çevre sorunları, biyolojik çeşitlilik ve orman gen kaynaklarımız*, Tema Vakfı, İstanbul.
- Jin, Z., Li, J. (2007), "Genetic differentiation in endangered *Heptacodium miconioides* Rehd. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation", *Forest Ecology and Management*, **245**, 130-136.
- Köllijer, R., Jones, E.S & Drayton, M.C. (2001), "Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.)", *Theoretical Applied Genetics*, **102**, 416–424.
- Kaneko, S., Isagi, Y., Nobushima, F. (2007), "Development of microsatellite markers for *Metrosideros boninensis* (Myrtaceae), an endangered endemic plant species from the Bonin Islands, Japan", *Conservation Genetics*, **8**, 753–755.
- Kindiger, B. (2006), "Cross-species amplification of *Lolium* microsatellites in *Poa* spp", *Japanese Society of Grassland Science*, **52**, 105–115.
- Li, Q., Xu, Z., He, T. (2002), "Ex situ genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China", *Biological Conservation*, **106**, 151-156.
- Marrs, R.A., Hufbauer R.A., Bogdanowicz, S.M., Sforza, R. (2006), "Nine polymorphic microsatellite markers in *Centaurea stoebe* L. [subspecies *C. s. stoebe* and *C. s. micranthos* (S. G. Gmelin ex Gugler) Hayek] and *C. diffusa* Lam. (Asteraceae)", *Molecular Ecology Notes*, **6**, 897-899.

- Marrs, R.A., Huffbauer R.A., Sforza, R. (2008), "When invasion increases population genetic structure: a study with *Centaurea diffusa*", *Biology Invasions*, **10**, 561-572.
- Mameli, G., Fılıgheddu, R., Binelli, G., Meloni, M. (2008), "The Genetic Structure of the Remnant Populations of *Centaurea horrida* in Sardinia and Associated Islands", *Annals of Botany*, **101**, 633-640.
- Maunder, M. (1994b), "Practical aspects of plant conservation in a botanic garden, the relationship between botanic gardens and the wild habitat", *Biossiera*, **47**, 155–165.
- Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G. (1997), "Complementary conservation strategies, *Plant Genetic Conservation*, Chapman and Hall, London, 15–39.
- McGregor, C.E., Lambert, C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H., Warnich, L. (2000, "A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm", *Euphytica*, **113**, 135–144.
- Nagylaki, T. (1998), "Fixation Indices in Subdivided Populations", *Genetics Society of America*, **148**, 1325-1332.
- Özaydın, B. (2007), *Batı Anadolu’da yayılış gösteren Centaurea nivea ve C. wiedemanniana üzerine morfolojik, anatomik ve ekolojik araştırmalar*, Doktora tezi Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Palermo, A.M., Pellegrino, G., Menale, B., Musacchio, A. (2002), "Allozymic variability in *Centaurea tenorei* Guss. ex Lacaita and in other species of *C. parlatoris* Heldr. group (*Asteraceae*)", *Plant Biosystems*, **136** (3), 331-338.
- Poljuha, D., Sladonja, B., Setic, E., Milotic, A., Bandelj, D., Jakse, J., Javornik, B. (2008), "DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers", *Scientia Horticulturae*, **115**, 223-230.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W. (1998), "Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera – implications for the transferability of SSRs in plants", *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1275-1287.

- Qui-Lun, Y., Ping, F., Ke-Cheng, K., Guang-Tang, P. (2008), "Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China", *Journal of Genetics*, **87**, 3.
- Shah, A., Li, D-Z., Gao, Li-Mi., Li, H-T., Möller, M. (2008), "Genetic diversity within and among populations of the endangered species *Taxus fuana* (Taxaceae) from Pakistan and implications for its conservation", *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**, 183-193.
- Smulders, M.J.M., Cottrell, J.E., Lefevre, F., Van der Schoot, J., Arens, P., Vosman, B., Tabbener, H.E., Grassi, F., Fossati, T., Castiglione, S., Krystufek, V., Fluch, S., Burg K., Vornam, B., Pohl, A., Gebhardt, K., Alba, N., Aguñdez, D., Maestro, C., Notivol, E., Volosyanchuk, R., Pospiskova, M., Borda'cs, S., Bovenschen, J., van Dam, B.C., Koelewijn, H.P., Halfmaerten, D., Ivens, B., Van Slycken, J., Vanden Broeck, A., Storme, V., Boerjan, W. (2008), "Structure of the genetic diversity in black poplar (*Populus nigra* L.) populations across European river systems: Consequences for conservation and restoration", *Forest Ecology and Management*, **255**, 1388-1399.
- Saghai-Marooof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P. (1994), "Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal location and population dynamics", *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **91**, 5466-5470.
- Su, Y., Long, R., Chen, G., Wu, X., Xie, K., Wan, J. (2007), "Genetic Analysis of Six Endangered Local Duck Populations in China Based on Microsatellite Markers", *Journal of Genetics and Genomics*, **34** (11), 1010-1018.
- Santos-Silva, F., Ivo, R.S., Sousa, M.C.O., Carolino, M.I., Ginja, C., Gama, L.T. (2008), "Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers", *Small Ruminant Research*, **78**, 32-40.

- Setoguchi, H., Mitsui, Y., Ikeda, H., Nomura, N., Tamura, A. (2009), Development and characterization of microsatellite loci in the endangered *Tricyrtis ishii* (Convallariaceae), a local endemic plant in Japan, *Conservation Genetics*, **10**, 705-707.
- Sözen, E., Özaydın, B. (2009), "A preliminary study on the genetic diversity of the critically endangered *Centaurea nivea* (Asteraceae)", *Annales Botanici Fennici*, **46**, 541-548.
- Tansley, S.A., Brown, C.R. (2000), "RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation", *Biological Conservation*, **95**, 39-48.
- Tautz, D. (1989), "Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers", *Nucleic Acids Research*, **17**, 6463–6471.
- Tang, S., Dai, W., Li, M., Zhang, Y., Geng, Y., Wang, L., Zhong, Y. (2008), "Genetic diversity of relictual and endangered plant *Abies ziyuanensis* (Pinaceae) revealed by AFLP and SSR markers", *Genetica*, **133**, 21-30.
- Velioğlu, E., Çengel, B., İçgen, Y., Kandemir, G., Alan, M., Kaya, Z. (2002), "Moleküler Belirteçler Yardımıyla karaçam (*Pinus nigra* Arnold subspecies *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) Tohum Meşçerelerinde, Tohum Bahçelerinde ve Ağaçlandırmalarında Bulunan Genetik Çeşitliliğin Karşılaştırılması", Teknik Bülten no: 11, Orman Bakanlığı Yay. No:190, Müdürlük Yay. No: 23, Ankara.
- Vischi, M., Fiori, M., De Paoli, E., Padovan, S., Guarda, M., Olivieri, A. (2008), "Broccoli 'Fiolaro' (*Brassica oleracea*) an endangered typical Italian cultivar. A genetic by SSR markers", *Plant Genetic Resources*, **1** (7), 1479-2621.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995), "AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting", *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414.
- Wagenitz, G. (1975), *Centaurea* L. in: Davis, P.H. (ed), *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, **5**, 465-585, Edinburg Univ. Press, Edinburg.

- Wang, M.L., Barkley, N.A., Yu, J-K., Dean, R.E., Newman, M.L., Sorrells, M.E., Pederson, G.A. (2005), "Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation", *Plant Genetic Resources*, **3** (1), 45–57.
- Wang, L., Guo, J., Zhao, G.F. (2006), "Genetic diversity of the endangered and endemic species *Psathyrostachys huashanica* natural populations using simple sequence repeats (SSRs) markers", *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 310-318.
- Wallace, L.E. (2002), "Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers", *Plant Species Biology*, **17**, 37–49.
- Yong, L., De-Chun, L., Bo, W., Zhong-Hai, S. (2006), "Genetic diversity of pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its relatives based on simple sequence repeat markers", *Journal of Agricultural Biotechnology*, **3** (2), 119–126.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y. (2001), "SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear", *Theoretical Applied Genetics*, **102**, 865–870.
- Zong-Yun, F., Xian-Jun, L., Yi-Zheng, Z., Hong-Qing, L. (2006), "Genetic Diversity Analysis of Tibetan Wild Barley Using SSR", *Acta Genetica Sinica*, **33** (10), 917–928.
- Zawko, G., Krauss, S.L., Dixon, K.W., Sivasiththamparam, K. (2001), "Conservation genetics of rare and endangered *Leucopogon obtus* (Ericaceae)", *Moleküler Evolution*, **10**, 2389-2396.