

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *SCORZONERA* L. (ASTERACEAE) TAKSONLARININ
nrDNA ITS BÖLGELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Azer ÖZAD

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

RİZE 2010

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI SCORZONERA L. (ASTERACEAE) TAKSONLARININ
nrDNA ITS BÖLGELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Azer ÖZAD

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Serdar MAKBUL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE 2010

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAZI SCORZONERA L. (ASTERACEAE) TAKSONLARININ
nrDNA ITS BÖLGELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Azer ÖZAD

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 02.07.2010

Tezin Sözlü Savunma Tarih: 20.07.2010

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Serdar MAKBUL

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Kamil ÇOŞKUNÇELEBİ

Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Nuran DURMUŞ

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Kerim SERBEST



RİZE 2010

ÖNSÖZ

Bazı *Scorzonera* L. (Asteraceae)'larının morfolojik ve moleküler yönden incelenmesini amaçlayan bu çalışma Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda 'Yüksek Lisans Tezi' olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Serdar MAKBUL' e minnet ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim. Laboratuar çalışmalarında yardımcı olan ve bu çalışmanın tamamlanmasına katkı sağlayan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayrıca analizlerin değerlendirilmesi sırasında yardımını ve görüşlerini esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Arş. Gör. Mutlu GÜLTEPE'ye, Rize Üniversitesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve tüm öğretim elemanlarına, bu tezin hazırlanmasında emeği geçen ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Bu aşamaya gelinceye kadar bana maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen fedakâr aileme minnet, şükran, en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Azer ÖZAD

Rize 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	2
1.2. <i>Scorzonera</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri.....	5
1.3. Filogenetik Sistematiği.....	5
1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	5
1.5. Ribozom ve Ribozomal DNA (rDNA).....	5
1.6. Internal Transcribed Spacer (ITS).....	7
1.6.1. ITS'nin Genel Özellikleri.....	8
1.6.2. ITS Bölgesinin Filogenetik Analizi.....	9
1.6.3. ITS'nin Taksonomide Tercih Edilme Nedenleri.....	9
1.6.4. ITS'nin Taksonomik Seviyelerde Kullanımı.....	10
1.7. DNA Dizi Analizi.....	10
1.8. Filogenetik Analiz.....	13
1.9. Dizilerin Hizalanması.....	13
1.10. Filogenetik Ağacın Oluşumu.....	14
1.10.1. Farklılıkları En Aza İndirme (Maximum parsimony:MP) Yöntemi.....	14
1.10.2. En Yüksek İhtimal (Maximum likelihood:ML) Yöntemi.....	14
1.10.3. Uzaklık (Distance) yöntemi.....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	16
2.1. Materyal Temini.....	16
2.2. Morfolojik Çalışmalar.....	16
2.3. Numerik Analizler.....	16
2.4. Moleküler Çalışmalar.....	19
2.4.1. Kuru Yapraklardan Genomik DNA İzolasyonu.....	19
2.4.2. PCR Uygulamaları.....	20

2.4.3.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	20
2.4.4.	Baz Dizin Analizi.....	20
2.5.5.	Klonlama.....	20
2.5.5.1.	PCR Ürünlerinin Ligasyonu.....	20
2.5.5.2.	Transformasyon.....	21
2.5.5.3.	Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu.....	21
2.4.6.	ITS Bölgelerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi.....	22
3.	BULGULAR.....	23
3.1.	Morfolojik Bulgular.....	23
3.1.1.	İncelenen <i>Scorzonera</i> Taksonları İçin Tayin Anahtarı.....	23
3.1.2.	Taksonların Morfolojik Görüntüleri.....	24
3.1.3.	Morfolojik Karakterler Kullanılarak Elde Edilen UPGMA Fenogramı.....	29
3.2.	Moleküler Bulgular.....	31
4.	TARTIŞMA.....	40
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	45
	KAYNAKLAR.....	46
	EKLER.....	52
	ÖZGEÇMİŞ.....	56

ÖZET

Bu çalışma ile 11 *Scorzonera* L. (Asteraceae) taksonu moleküler (nrDNA ITS bölgeleri) ve morfolojik yönden araştırıldı.

İncelenen bitki materyali, yayılış alanlarında 2004–2009 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları ile toplanmıştır. Toplanan örneklerin önce geleneksel yöntemlere göre tanımlamaları yapılmış ve her örnek herbaryum örneği haline dönüştürülmüştür. Herbaryum örnekleri kullanılarak belirlenen morfolojik karakterlere göre çeşitli ölçümler yapılmıştır. Daha sonra, ITS profillerinin belirlenmesi amacıyla her örnekten uygun yöntemlerle hazırlanan yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Örneklere ait ITS bölgesi, evrensel primerler kullanılarak PCR yoluyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA bölgelerinin baz dizin analizleri yapılmış ve MEGA 3.1 programıyla değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu çalışılan örnekler arasında benzerlik ilişkisini ortaya koyan parsimonik ağaç oluşturulmuştur. Moleküler verilerden elde edilen sonuçlar, 29 morfolojik karaktere dayalı kümeleme analizi sonuçları ile karşılaştırılmış ve çalışılan taksonlar arasındaki ilişkiler tam olarak ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, örnekler arasındaki filogenetik ilişkilerin açıklanmasında ITS dizin analizlerinin morfolojik verilere göre daha güvenilir bilgiler ortaya koyduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Scorzonera*, Asteraceae, Morfoloji, nrDNA, ITS, PCR

SUMMARY

Polymorphism in nrDNA ITS Region of Some *Scorzonera* L. (Asteraceae) Taxa

In this study, 11 *Scorzonera* L. (Asteraceae) taxa were investigated with respect to molecular (nrDNA ITS regions) and morphological features.

Plant materials used in this study were collected from field work between 2004-2009. These specimens were identified firstly according to traditional methods and stored as herbarium the taxa. Genomic DNA's were isolated from healthy leaves of each pattern to perform ITS studies. ITS regions of the examined patterns were amplified by using universal primers and then sequenced. These ITS bands were aligned to use analysis processes. All ITS sequences were analyzed by using MEGA 3.1 software and parsimony tree were formed in order to explain relationships among the taxa. Molecular evidences inferred from sequencing data were compared with 29 morphological results in order to explore the exact relationships among the examined specimens.

This study suggest that to understand the phylogenetic relations among taxa, ITS sequence analysis gives more reliable data compared to morphological characteristics.

Key Words: *Scorzonera*, Asteraceae, Morphology, nrDNA, ITS, PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. rDNA Gen Kümesi.....	6
Şekil 2. 18S-26S nrDNA 'ın Internal Transcribed Sequence (ITS) Bölgesi.....	7
Şekil 3. Sentez Sonrası DNA Bantlarının Otoradyografi Görüntüsü.....	11
Şekil 4. Dört Farklı Floresan Boyanın Kullanılmasıyla Oluşan Pikler.....	12
Şekil 5. Araştırma Bölgesinin Haritası.....	18
Şekil 6. <i>S. armeniaca</i>	25
Şekil 7. <i>S. hieraciifolia</i>	25
Şekil 8. <i>S. lacera</i>	26
Şekil 9. <i>S. parviflora</i>	26
Şekil 10. <i>S. pygmaea subsp. nutans</i>	27
Şekil 11. <i>S. rigida</i>	27
Şekil 12. <i>S. latifolia</i>	28
Şekil 13. <i>S. sosnowskyi</i>	28
Şekil 14. <i>S. tomentosa</i>	29
Şekil 15. <i>S. aucherana</i>	29
Şekil 16. <i>S. kotschyi</i>	30
Şekil 17. Morfolojik Karakterler Kullanılarak Elde Edilen UPGMA Fenogramı	30
Şekil 18. Bazı <i>Scorzonera</i> Örneklerinin ITS Bölgelerine Ait PCR Bantları.....	32
Şekil 19. ITS Bölgesinin MEGA Programıyla Yapılmış MP Analizi.....	38
Şekil 20. ITS Bölgesinin MEGA Programıyla Yapılmış Neighbour Joining Analizi.....	39

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Çalışmalardaki Örneklere Ait Toplama Bilgileri.....	17
Tablo 2. Morfolojik Karakterler.....	19
Tablo 3. Nümerik Analizlerde kullanılan Morfolojik Karakterlerin Ortalama Değerleri.....	31
Tablo 4. ITS PCR Sonucunda Elde Edilen Nükleotit Uzunlukları, G+C ve Pürin/ Primidin İçeriği.....	33
Tablo 5. Clustal W Programı ile Yapılan ITS Bölgelerine Dayalı Örnekler Arasındaki Benzerlik Yüzdeleri.....	34
Tablo 6. Çalışılan Örneklere Ait ITS Baz Sıralarının Clustal W Programı ile Karşılaştırılması.....	35
Tablo 7. Kimura'nın Pair-Wise Benzemezlik Tablosu.....	39

SEMBOLLER DİZİNİ

BLAST	: The Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Baz çifti
°C	: Santigrad
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
cDNA	: Kloroplast Deoksiribonükleik Asiti
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ETS	: External Transcribed Spacer
HCl	: Hidroklorik Asit
IGS	: Intergenic Spacer
ITS	: Internal Transcribed Spacer
KTUB	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü
LB	: Luria Bertani (Broth)
LSU	: Büyük Alt Birim
mat K	: Maturase K Geni
mg	: Miligram
ML	: Maximum Likelihood
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MP	: Maximum Parsimony
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NOR	: Nükleolar Organizer Region
nrDNA	: Nüklear ribozomal Deoksiribonükleik Asit
NTS	: Non Transcribed Spacer
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVPP	: Polivinil polipropidilen
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
RNase	: Ribonükleaz Enzimi

rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
RUB	: Rize Üniversitesi Biyoloji Bölümü
sn	: Saniye
snoRNP	: Küçük Nükleolar Ribonükleoprotein
SSU	: Küçük alt birim
TAE	: Trizma Base, Glacial Asetik Asit, EDTA
TE	: Tris-Edta
UV	: Ultra Viyole

1. GENEL BİLGİLER

1.1. GİRİŞ

Scorzonera L. cinsi Asteraceae (Compositae) familyası içerisinde yer almaktadır. *Asteraceae* Angiospermilerin en geniş familyalarından birisidir ve son yapılan sınıflandırmalara göre 1535 cins ve 26.000 civarında türden oluşmaktadır. Filogenetik açıdan *Asteraceae* familyasının coğrafik orjininin Güney Amerika olduğu kabul edilmektedir (Bremer, 1994). *Asteraceae* familyasına ait Türkiye florasında toplam 1209 tür kaydedilmiş olup tür sayısı bakımından ilk sırada yer alır. Bu türlerin 447'si endemik olup endemizm oranı % 37'dir. Bu familyanın 134 cinsi bulunmaktadır. Cins sayısı bakımından Türkiye florasının birinci büyük familyasını teşkil etmektedir (Davis ve ark., 1988; Özhatay ve Kültür, 2006).

Asteraceae mensupları iki tip çiçek ihtiva eden kapitulum şeklinde çiçek durumuna sahiptirler. Bunlardan korollası tüp şeklinde olanlar tubulat, dil şeklinde olanlar ise ligulat çiçek olarak adlandırılmaktadır. Bazı taksonlarda her iki tip çiçek bulunurken bazılarında ise ya sadece ligulat çiçekler ya da sadece tubulat çiçekler bulunmaktadır (Seçmen ve ark., 2000). *Scorzonera* sadece ligulat çiçeklere sahiptir ve Asteraceae'nin Liguliflorae (Cichorioideae) alt familyasına aittir (Cronquist, 1968).

Scorzonera L. cinsi İran-Turan fitocoğrafik elementi merkezlidir. İran'da yaklaşık 70 tür ile temsil edilmektedir. (Chamberlain, 1975, Davis ve ark., 1988, Duran 2002a, b, Duran ve Sağıroğlu 2002, Kilian ve Parolly 2002, Duran ve Hamzaoğlu 2004, Parolly ve Kilian 2003, Dinç ve ark. 2007). *Scorzonera* cinsi Avrupa'da oldukça az türe sahiptir (Zidorn ve ark. 2003). Yunanistan'da 11 (Tutin ve ark., 1976), Avusturya'da 9 (Adler ve ark., 1994), Almanya'da 5 (Jöger ve Werner, 2002) ve İsveç'te 4 (Heitz, 1990) *Scorzonera* taksonu bulunmaktadır.

Türkiye *Scorzonera*'ları üzerinde ilk araştırma Chamberlain (1975) tarafından yapılmıştır. Chamberlain (1975)'a göre Türkiye'de 39 *Scorzonera* türü bulunmaktadır. Türaltı taksonlarla birlikte Türkiye'deki *Scorzonera* taksonları sayısı 51 olarak tespit edilmiştir (Yıldırım, 1999). Daha sonra bulunan yeni türlerin ilavesi ile bu sayı 49'a çıkmıştır (Hamzaoğlu ve ark., 2009). *Scorzonera*'nın sistematigi ile ilgili bu zamana kadar birçok çalışma yapılmasına rağmen, cinsin hala sistematik problemleri bulunmaktadır (Nazarova, 1997). *Scorzonera*'nın dahil olduğu *Scorzonerinae* tribusu da önemli sistematik problemlere sahiptir (Nazarova, 1997). Bu cinsin sınıflandırılması ile ilk defa De Candolle

(1805) ilgilenmiştir. Bu araştırmacıya göre *Scorzonera* ve *Podospermum* (DC.) Lipsch. cinsleri yakın benzerliklere sahip olup birbirinden yaprak ve tohum özellikleri ile ayrılmaktadır. De Candolle'den sonra Cassini (1826), Dumortier (1827), Endlicher (1838) ve Kuthatheladze (1978) *Podospermum* ve *Scorzonera*'yı ayrı cinsler olarak kabul etmişlerdir. Bu cinsle ilgili son değişiklik Lipschiz (1935, 1939) tarafından yapılmış ve bu değişiklik "Fragmenta monographiae generis *Scorzonera*" adlı bir eser şeklinde yayınlanmıştır. Bu düzenleme Rus Flora'sında da kullanılmıştır (Lipschiz, 1964b). Lipschiz (1964b), *Scorzonera* cinsini *Podospermum*, *Pseudopodospermum* ve *Scorzonera* olmak üzere üç alt cinsle ayırmış ve *Podospermum*'u hiçbir zaman ayrı bir cins olarak kabul etmemiştir. Lipschiz (1935,1964b)'in bu düşüncesi Boissier (1875) ile uygunluk göstermektedir. Ancak bazı araştırmacılar *Podospermum*'un *Scorzonera*'dan farklı bir cins olduğunu savunmuşlardır (Nazarova, 1997; Kuthatheladze, 1978). Buna karşılık Boissier (1875) ve Lipschiz (1935,1964b)'in sınıflandırması birçok sistematikçi tarafından sistematik ve flora çalışmalarında esas olarak kabul edilmiştir (Rechinger, 1977; Chater, 1976; Chamberlain, 1976). Ancak Kafkas florasını çalışan Kuthatheladze (1978) ile Orta Asya *Scorzonera*'larını çalışan Kamelin ve Tagev (1986) *Podospermum*'u farklı bir cins olarak değerlendirmişlerdir.

Scorzonera türlerinin güzel kokulu olmasından dolayı bazı ülkelerde yemeklere tat vermek için kullanılmaktadır (Paraschos ve ark., 2001). Türkiye'de de *Scorzonera* türleri çoğunlukla sebze olarak tüketilmektedir (Turan ve ark., 2003). Anadolu'da yetişen bazı türlerin kök ve taze sürgünleri yemlik adıyla taze veya pişmiş halde tüketilmektedir. Yemlik gıda olarak kullanımının yanı sıra halk arasında damar sertliği, yüksek tansiyon, romatizma, böbrek hastalıkları ve şeker hastalığında tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Avrupa'da yaygın olarak yetişen *S. hispanica* türü Türkiye'de Tekirdağ çevresinde yayılış göstermektedir. *S. hispanica* dışında ülkemizde sebze olarak tüketilen diğer türler yetiştikleri bölgeye göre farklı isimler almaktadır. Bu türlerden *S. cana* (C.A. Mey.) Hoffm. karakök veya teke sakalı olarak isimlendirilmekte, *S. latifolia* (Fisch. ve Mey.) DC. ise geniş yapraklı karakök veya mesdek olarak bilinmekte ve bu türlerin yaprakları salata yapımında kullanılmaktadır. *S. mollis* Bieb. ise Gümüşhane bölgesinde goftigoda ismiyle tanınmakta ve kökleri yenmektedir. *S. suberosa* C. Koch. türünün de yumru şeklindeki kökleri yenmekte ve yabani havuç olarak isimlendirilmektedir (Baytop, 1999; Turan ve ark., 2003). *S. latifolia* sebze olarak kullanılmasının yanı sıra halk arasında da etnobotanik

özellikleri yönünden değerli bir bitkidir (Baytop, 1999; Douglas, 2001; Turan ve ark., 2003; Zidorn ve ark., 2003).

Son zamanlarda Türkiye *Scorzonera*'ları ile ilgili bazı sistematik ve farmakolojik çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesi'nde doğal olarak yayılış gösteren *Scorzonera* cinsine ait 18 takson morfolojik ve anatomik Makbul (2006) tarafından karşılaştırılmalı şekilde incelenmiştir. Bunun dışında Boduroğlu (2008) tarafından Ülkemizde yayılış gösteren bazı *Scorzonera* L. türleri sitolojik ve Bahadır (2009) tarafından farmakolojik yönden araştırılmıştır.

Moleküler çalışmaların kritik dönemeç noktası Watson ve Crick'in DNA çift sarmalının yapısını açıklaması olmuştur; 1980 li yılların başlarında Karl Mullis'in PCR (Polimer Zincir Reaksiyonu) keşfetmesinden sonra ise gizemli bir yapı olan genetik materyal hakkında daha geniş bilgiler elde edilmeye başlanmış olup genlerin yapısı ve fonksiyonu üzerinden daha detaylı incelemelerin gerçekleşmesi mümkün olmuştur. Özellikle 1990'lı yılların başları tohumlu bitkilerin filogenisinin yeniden düzenlenmesi için bir basamak olmuştur. Bu aşamada hızlıca elde edilen DNA dizilerine ait veriler filogenetik gelişim teorisini çok daha ileriye götürmüş ve bu süreç çok büyük veri setlerinin analizlerinin yapılmasına imkân sağlamıştır. Bu amaç doğrultusunda kullanılan değişik metotlarla bireylerin filogenetik soyağacında yerleri verilmiş ve sınıflandırılmaları gerçekleştirilmiştir (Bremer ve ark., 2003). Filogenetik analizlerin gerçekleşmesinde uygun genin ve uygun bir sürecin seçilmesi son derece önemlidir. Revizyon çalışmaları sırasında canlıların evrimsel ilişkilerinin ve akrabalık derecelerinin ortaya çıkarılmasında değişik metotlar kullanılmaktadır. Fakat kullanılan tüm metotların kendine özgü avantaj ve dezavantajları da bulunmaktadır. Bu söz konusu durumların göz önüne alınarak çalışılacak taksonomik seviye ve evrimsel soruna çözüm getirecek uygun moleküler veri setlerinin kullanılması önemlidir. Bu fikirden yola çıkarak birçok araştırmacı hangi genomik bölgenin hangi taksonomik seviyede problemleri çözmeye en iyi yöntem bilimi olduğu noktasında çalışmalarda bulunmuşlardır (Soltis ve ark., 1992).

Bitki sistematigi alanında kloroplast genomu, nükleer genom ve mitokondrial genom üzerinde yukarıda sözü edilen konularda kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Kloroplast genomunun genel yapısal özellikleri, avantajları ve dezavantajları ile kloroplast genomunun kullanımı ciddi biçimde araştırılmıştır (Soltis ve ark., 1992; Whitfelt ve Bottomley, 1983; Palmer 1985a, 1985b, 1986, 1987, 1991; Zurawski ve Clegg, 1987). Bu veriler doğrultusunda kloroplast DNA' sının taksonomik sorunların çözümünde tür ve cins

seviyesinden familya seviyesine, hatta daha yüksek kategorilere kadar kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Nüklear genom üzerinde yapılan araştırmalar taksonomik problemlerin çözümlenmesinde çok geniş bir spektrumda faydalanabileceğini ortaya çıkarmıştır. Nüklear genom çok sayıda gen içermesi ile birlikte farklılaşmış genlere sahip olmasından dolayı Angiospermlerde yeniden filogenetik yapının oluşturulmasında, tür seviyesinden en yüksek sistematik basamağa kadar tüm taksonomik kategorilerde ve populasyon analizlerinde faydalıdır. Özellikle büyük ölçüde korunmuş kodlayıcı bölgeler içeren nüklear genom bölgeleri (18S, 26S, 5.8S) familya ve üst seviyede problemlerin çözümlenmesine imkân verir. Hızlı bir biçimde evrimleşen ITS (İnternal Transcribed Spacerlar) ve ETS (External Transcribed Spacer) bölgeleri yakın akraba cinslerin ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında ve tür düzeyindeki analizlerde kullanılmaktadır (Appels ve Dvorak, 1982; Appels ve Honeycutt, 1986; Riven ve ark., 1986; Rodger ve Bendich, 1987; Jorgensen ve Cluster, 1988; Bobola ve ark., 1992; Govindaraju ve Culli, 1992; Hamby ve Zimmer, 1992).

Bitki nüklear genomunda uzunluğu 1 kb'dan 8 kb'a kadar çeşitlilik gösteren varyasyon oluşumunda katkısı büyük olan bölgelere IGS adı verilir. ITS-1 ve ITS-2 bölgelerinin uzunluğu ise Angiospermlerde benzer olup uzunluk değişimleri oldukça dar bir aralıkta gerçekleşir. Yalnızca koniferlerde ITS-1 bölgesinin uzunluğunda büyük varyasyonlar rapor edilmiştir (Soltis ve ark., 1992). Moleküler tekniklerin bitki sistematiki alanında kullanılmaya başlanması ile bitki sistematikçileri farklı taksonomik kategorilerde yeniden çalışmalar yaparak revizyon çalışmalarına girişmişlerdir. Bu çalışmalar sırasında sistematikçiler öncelikle çalıştığı taksonomik kategorilerle ilgili temel grupların tespit edilmesi üzerinde durmuşlardır. Sistematikçiler ilgilendikleri diğer bir konu da gruplar arasındaki evrimsel ilişkileri tespit etmek olmuştur. Bu amaç doğrultusunda vasküler ve tohumlu bitkilerin evrimsel ilişkilerini belirlemek için fosil bitkilerin kullanılması moleküler bitki sistematiki çalışmaları açısından çarpıcı bir örnek olarak karşımıza çıkmaktadır (Bremer ve ark., 2003).

Bu çalışmanın amacı, günümüz sistematik çalışmalarda sıkça kullanılan ve oldukça geçerli sonuçların elde edildiği ITS PCR yöntemi ve morfolojik karakterler kullanılarak Türkiye' de doğal olarak yayılış gösteren bazı *Scorzonera* taksonlarının akrabalık ilişkilerini ortaya çıkartmak ve taksonomik problemlerinin çözümüne katkı sağlamaktır.

1.2. Scorzonera L. Cinsinin Genel Özellikleri

Bu cinse ait olan bitkiler tek, iki veya çok yıllık otsu, nadiren yarı çalimsı, skeep formunda ya da gerçek gövdeye sahip bitkilerdir. Kökler kalın, silindirik ya da yumru şeklindedir. Yapraklar bazal ya da gövdede, basit, şerit, mızraksı, şerit-mızraksı, yumurtamsı, eliptik veya derin loblu, saplı ya da sapsızdır. Kapitulum homogam, dilsî çiçekler, tek ya da çok sayıdadır. İnvolutrum ovat veya silindirik; fillariler iki sıra halinde, akut ya da çatallı içtekiler dıştakilerden daha uzun ve otsudur. Çiçek tablası tüysüz ve az çok yuvarlaktır. Çiçekler beyaz, sarı, krem, mor veya menekşe renklidir. Akenler silindirik, düz ya da oluklu, bazen pürüzlü, tüylü veya tüysüz, saplı ya da sapsızdır. Pappus üç sıralı, sapsız, pappus tüyleri plumose, bazen üstlerde barbellat veya tamamen barbellattır (Chamberlain, 1975).

1.3. Filogenetik Sistematiği

Taksonomi yeni taksonların tanımlanması, adlandırılması ve organizmaların uygun bir sınıflandırma sistemi içerisinde düzenlenmesi gibi bir dizi alanı kapsar (Simpson, 1961). Sistematiği, biyolojik çeşitliliği sınıflandırmakla yetinmez “neden” ve “nasıl” sorularını cevaplayabilmek için organizmaların evrimi, özellikle türleşme olgusunu teorik ve pratik yönleri ile ele alır. Bu yönüyle sistematiği taksonomiye de içine alan bir alandır.

1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR özel DNA dizilerinin uygun primerlerin kullanımıyla dış şartlarda enzimatiği olarak çoğaltılması tekniğidir (Erlich, 1989). DNA üretim işlemini birbirini izleyen bir seri özgül sıcaklık devrelerinde yapılır. Oldukça düşük miktarlarda kalıp DNA kullanılarak bir veya daha fazla DNA parçasının milyonlarca sureti üretilir. Bu suretler otoradyografi veya boyama yapılarak gözlenir (Weissing, 1995). Hızlı, hassas ve pahalı olmayan bir tekniktir. Çeşitliliğin belirlenmesinde en çok kullanılan teknik olan RFLP'nin uygulamasının çok zaman alması ve oldukça pahalı bir metod olması nedeniyle PCR'ın keşfiyle beraber DNA'nın seçilmiş bölgelerinin çoğaltılmasına dayanan genetiği yöntemler gelişmeye başlamıştır (Tingey ve ark., 1992).

1.5. Ribozom ve Ribozomal DNA (rDNA)

rRNA'ları kodlayan çekirdek rDNA (Şekil 1) genleri genellikle filogenetiği yaklaşımlarda kullanılmaktadır. Ökaryotik çekirdek rDNA'lar yaklaşık 5000 kopya ile genomda ardışık sıralı bir şekilde bulunurlar. Her tekrar eden birim küçük altbirim (SSU), büyük altbirim (LSU) ve 5.8S rDNA'lardan oluşur. Bu rRNA kodlayan bölgeler birbirlerinden ayıraçlar ile ayrılır. SSU ve LSU rDNA'ları iki dış yazılan ayıraçlar (ETS)

ve bir yazılmayan ayıraçlar (non-transcribed spacer, (NTS)) ile ayrılır. Bu ayıraçların hepsi gen arası ayıraçlar (intergenic spacer, (IGS)) olarak adlandırılır. 5.8 S rDNA ise iki dâhili yazılan ayıraçlar (internal transcribed spacerlar, ITS1 ve ITS2) arasına yerleşmiştir (Şekil 1).

Ayıraç bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar ölümcül etkiye sahip olmadığından, rRNA şifreleyen bölgelere göre daha hızlı evrimleşirler. rRNA şifreleyen bölgelerde meydana gelen mutasyonlar rRNA'larda da görüleceğinden, bu mutasyonlar başarılı bir ribozom oluşumunu engelleyebilir. Farklı evrim oranlarından dolayı rDNA'lar geniş spektrumlu bir filogenetik ilişkiyi çözümlemede kullanılabilir. Çekirdek SSU rDNA en çok korunan DNA bölgelerinden birisi olduğundan dolayı alem (kingdom), şube (filum), sınıf (classis) veya takımları (ordo) içeren derin filogenetik dallar oluşturmada kullanılabilir (Friedrich ve Tautz, 1995).



Şekil 1. rDNA gen kümesi

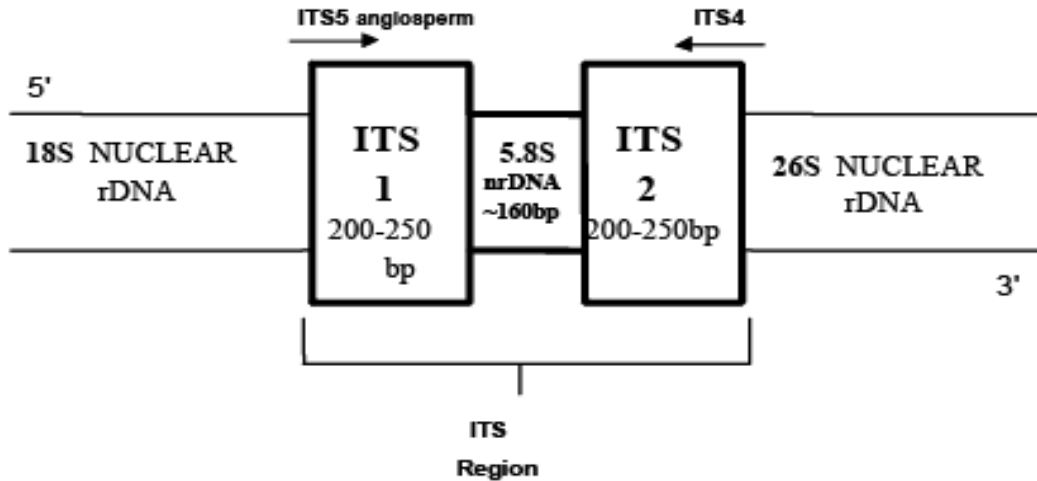
En küçük çekirdek rDNA olan 5.8 S rDNA'nın nükleotid dizisindeki korunma SSU rDNA ile aynı olmasına karşın çok uzun olmadığından (yaklaşık 150 bp), yeteri kadar filogenetik bilgi içermemektedir. Bu nedenle 5.8S rDNA bölgesi filogenetik çalışmalar için önerilmemektedir (Hwang ve ark., 1999). LSU rDNA, SSU rDNA ile karşılaştırıldığında çok daha büyük ve daha fazla değişkenlik göstermektedir. Bu bölge birçok farklılaşmış domain veya genişletilmiş parçalara sahiptir. Bundan dolayı, genin büyüklüğü şubeler arasında değişkenlik göstermektedir. Çekirdek LSU (büyük alt birim) rDNA takım veya familya seviyesindeki filogenetik ilişkiler için kullanışlıdır (Fredrich ve Tautz, 1997; Hwang ve ark., 1998). Çekirdek SSU (küçük alt birim) ve LSU rDNA'ları birkaç zincirden oluşmaktadır. Bu zincirlerden bazıları çok korunmuş olmasına rağmen diğerleri değişkendir. Hızlı evrimleşen segmentler yüksek miktarda değişkenlik gösterirler ve bunlar “genişleyen segmentler (expansion segments)” veya “değişken bölge (variable regions)” olarak adlandırılırlar. Çekirdek SSU ve LSU rDNA'larında görülen uzunluklarındaki değişkenlik, değişken bölgelerin genişlemesinden kaynaklanmaktadır (Hwang ve ark.,

1998). SSU ve LSU rDNA'larının değişken bölgelerindeki nükleotid dizileri familya veya nadiren cins gibi alt kategorik seviyelerde kullanılır (Hwang ve ark., 1999).

1.6. ITS (Internal Transcribed Spacer)

Moleküler biyolojideki son gelişmeler, türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesiyle bitki türlerinin tanımlanmasına imkân vermektedir. Buna yönelik olarak, rDNA'nın ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarda sıklıkla başvurulan yöntemlerden biri haline gelmiştir (Baldwin ve ark., 1995). Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri, çoklu gen yapılarından oluşur ve ardışık tekrarlı diziler şeklindedir.

rDNA tekrarları, genomik DNA'nın NOR (Nükleolar Organizer Region) bölgelerinde yerleşmiş durumdadır ve 18S küçük alt birim (Small Subunit), 5.8 S ve 28 S büyük alt birim (Large Subunit) rDNA'ları kodlayan genlerden oluşmaktadır. ITS bölgeleri, genomik DNA üzerindeki bu rDNA tekrarları içinde yerleşmiştir. Bu bölgeler, rDNA'nın alt birimleri ile transkribe edilmektedir ve korunmuş bölgeleri (18S, 5.8S ve 28S) birbirinden ayıran iki kısımdan (ITS1 ve ITS2) oluşur (Baldwin ve ark., 1995). Bu ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak PCR çalışmalarıyla kolayca elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS bölgeleri Şekil 2 'de verilmiştir.



Şekil 2. 18S-26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgesi (White ve ark., 1990)

rDNA genleri, kopya edilmeyen bölgeler (IGS) ve ITS bölgelerinin varlığıyla birbirinden ayrılmıştır. IGS bölgeleri (ETS ve NTS), komşu rDNA tekrar birimleri arasında yer almaktadır. ETS, ribozomal mRNA ile kodlanan dış kopya bölgesidir ve onun promotor bölgesini ihtiva etmektedir. NTS ise tekrar birimleri arasında yerleşmiş kodlanmayan bölgelerdir (Baldwin ve ark., 1995). ITS1, 18S (SSU) ile 5.8S arasında yerleşmiştir. ITS2 bölgesi ise, 5.8S ile 26S genlerini ayıran DNA bölgesidir. Bu gen yapılarını ihtiva eden rDNA tekrarlarının ökaryotik organizmalardaki kopya sayısı, 200–30.000 arasında değişiklik göstermektedir. Bu, bütün genomun yaklaşık % 1 veya daha fazlasını temsil etmektedir. Ayrıca genomik DNA'nın rDNA kopya sayısında ara sıra değişiklikler meydana gelebilmektedir.

1.6.1. ITS'nin Genel Özellikleri

- Bütün bölgenin toplam uzunluğu yaklaşık 700 bp kadardır. Ökaryotik organizmalarda 5.8S gen bölgesi, çoğunlukla ITS bölgeleri ile birlikte değerlendirilir.

- Bu bölgelerin korunmuş rDNA gen bölgelerine göre daha fazla değişkenlik gösterdiği kanıtlanmıştır.

- ITS1 ve ITS2 bölgelerinin filogenetik açıdan sundukları veriler farklı düzeydedir. Bu bölgelere dayalı analizlerde ITS1 verileri, daha fazla filogenetik çözümler sunmaktadır ve nükleotid içeriği ITS2'ye göre % 29 daha değişkendir.

- Bu bölgeler, rDNA'nın olgun 18S, 5.8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görev almaktadır (Baldwin ve ark., 1995). 1970'lerde DNA dizin analizi çalışmalarının hız kazanmasıyla, rRNA'lar ve komşu bölgeleri üzerindeki sekonder yapı çalışmaları büyük artış göstermiştir. Her tekrar birimi, olgun rRNA'ları oluşturacak olan bir preRNA olarak kopya edilir (Baldwin, 1992). ITS1 ve ITS2 bölgeleri ribozomal transkripsiyon ürününün bir parçası olmasına rağmen olgun ribozomal alt birimlerin yapısına dâhil edilmezler. Ancak bu bölgeler, rRNA'ların olgunlaşması sürecine katkıda bulunmaktadır (Baldwin, 1992). preRNA molekülünün çeşitli olgun RNA türlerine dönüşümünü sağlayan transkripsiyon sonrası süreçte her iki ITS bölgesi kesilip çıkarılır ve ortamdan uzaklaştırılır. ITS bölgelerinin, baz değişimi sınırlamalarından nispeten uzak olduğuna inanılmaktadır. Bu durum Angiosperm'lerden elde edilen ITS bölgelerine dayalı filogenetik analiz sonuçları ile desteklenmektedir (Baldwin ve Markos, 1999). ITS1'de meydana gelebilecek delesyon–insersiyon olayları veya nokta mutasyonları olgun SSU ve LSU rDNA'ların üretimine engel olabilmektedir. ITS2 bölgesinde oluşabilecek bu çeşit mutasyonlar sonucunda da büyük alt birim rRNA'ların oluşumu zarar görebilmektedir. ITS

bölgesinin primer yapısında bu çeşit değişiklikler meydana gelmesine rağmen sekonder yapıları ileri derecede korunmuştur. ITS bölgeleri, değişebilir bölgelerinin yanında korunmuş bölgeler de ihtiva etmektedir. Özellikle ITS1 bölgesinin merkezine yakın kısımlarında değişmeden kalabilen korunmuş bölgelerin varlığı tespit edilmiştir (Baldwin ve Markos, 1999).

1.6.2. ITS Bölgesinin Filogenetik Analizi

ITS bölgesinin filogenetik analizi 4 adımda gerçekleştirilmektedir:

- Genomik DNA izolasyonu,
- ITS bölgesinin PCR ile çoğaltılması,
- DNA'nın direkt dizin analizi ile okunması veya klonlama sonrasında okuma,
- DNA analizleri.

a) ITS baz sıralarının hizalanması,

b) Filogenetik analizlerin gerçekleştirilmesi,

Günümüzde ITS bölgesinin PCR ile çoğaltılması, yakın akraba türlerin ve popülasyonların filogenetik analizi için popüler bir seçenek durumundadır. ITS bölgelerinin bu popülerliği korunmuş rDNA bölgelerine bağlanabilen evrensel primerlerin üretilmesiyle artmıştır. ITS baz sıralarının analizi sonucunda elde edilen veriler, taksonomik kategorilerdeki mevcut problemlerin çözümünde önemli katkılar sağlamaktadır. Genellikle taksonlara ait ITS varyasyonlarına bakılarak ilgili taksonların akrabalıkları belirlenmeye çalışılır (Baldwin ve ark., 1995).

1.6.3. ITS'nin Taksonomide Tercih Edilme Nedenleri

nrDNA gen bölgelerinde bulunan ITS bölgeleri, moleküler ve sistematik açıdan sahip oldukları ayırt edici özellikler nedeniyle filogenetik analiz çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu bölgeler;

- Filogenetiğin yeniden inşasının da yeterli veri sunacak kadar uygun bir büyüklüğe sahiptir (600–700bp),

- Cins ve tür içi seviyelerde ileri derecede korunmuş olan rDNA gen bölgelerine komşu olarak bulunmaktadırlar,

- PCR ile çoğaltılarak karşılaştırılmaları için büyüklüğü son derece elverişlidir,

- rDNA gen bölgelerine göre daha hızlı nükleotit baz değişimi gösterirler,

- Cins ve tür seviyesindeki filogenetik çalışmalarda DNA içerikleri, açıklayıcı bilgiler sunmaktadır,

- Genomik DNA üzerinde yüksek kopya sayısına sahiptirler. Bu bölgelerin evrenselliği, alt birim unsurları ve bölgeler arasındaki farklı baz varyasyon oranları nedeniyle sistematikte kullanılmaları yaygınlaşmıştır.

1.6.4. ITS'nin Taksonomik Seviyelerde Kullanımı

İki kopya bölgesi (ITS1 ve ITS2), yakın akraba olan taksonların karşılaştırılmasındaki kullanışlılığı nedeniyle daha 1990'lı yıllarda bu bölge hızlı bir şekilde çalışılmaya başlanmıştır. Mevcut veriler, ITS baz dizilerinin, Angiosperm'lerde değişik seviyelerde filogenetik açıdan kullanışlı olduğunu göstermektedir (Baldwin ve ark., 1995).

Bazı bitki gruplarında ITS1 ve ITS2'de yüksek oranda varyasyonla karşılaşılırken, bazılarında ise nükleotit varyasyonunun az bir dizisine rastlanılmaktadır. Aynı toplam DNA değerlendirmelerinde, çoğu gruplarda ITS dizilerinin, cpDNA baz dizilerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu sonucuna varılmıştır (Baldwin ve ark., 1999). ITS bölgelerinin, hibrit taksonlara yönelik filogenetik analizlerde kullanılması uygun görülmemektedir. Çünkü hibritlerden elde edilecek ITS bölgelerinin hangi atasal genomdan çoğaltıldığına bilinmemesi, güvenilir olmayan değerlendirmelere neden olacaktır (Baldwin ve ark., 1995). rDNA tekrarlarının yüksek kopya sayısı nedeniyle (hücre başına 30.000'e kadar), ona göre küçük ebatta olan ITS bölgelerini PCR ile çoğaltmak oldukça kolaydır. Bu durum ITS bölgelerini filogenetik ve biyocoğrafik araştırmalar için ilgi çekici bir hale getirmektedir (Baldwin ve ark., 1995).

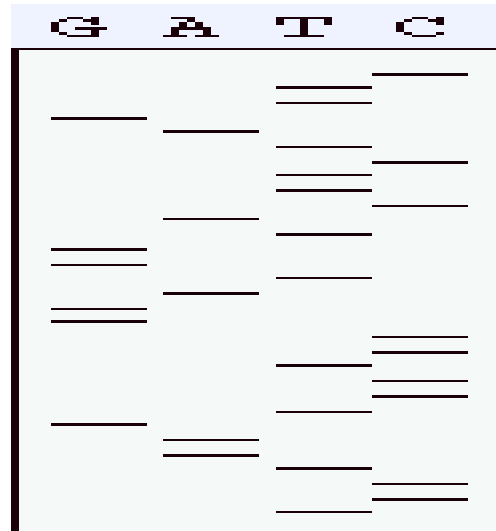
1.7. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da sıralama, DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. 1940'larda DNA baz kompozisyonunu saptama yöntemleri bulunmasına karşın DNA'daki nükleotid dizilerinin doğrudan kimyasal analizi 1960'larda geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır.

Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmentleri elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin geliştirilmesine paralel olarak dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır (Klug ve Cummings, 2002). Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlardan Allan Maxam- Walter Gilbert'in Kimyasal Degredasyon Metodu, DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve Coulson'un geliştirdiği 'Zincir Sonlanma Metod'unda ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır. Bu dört reaksiyonun

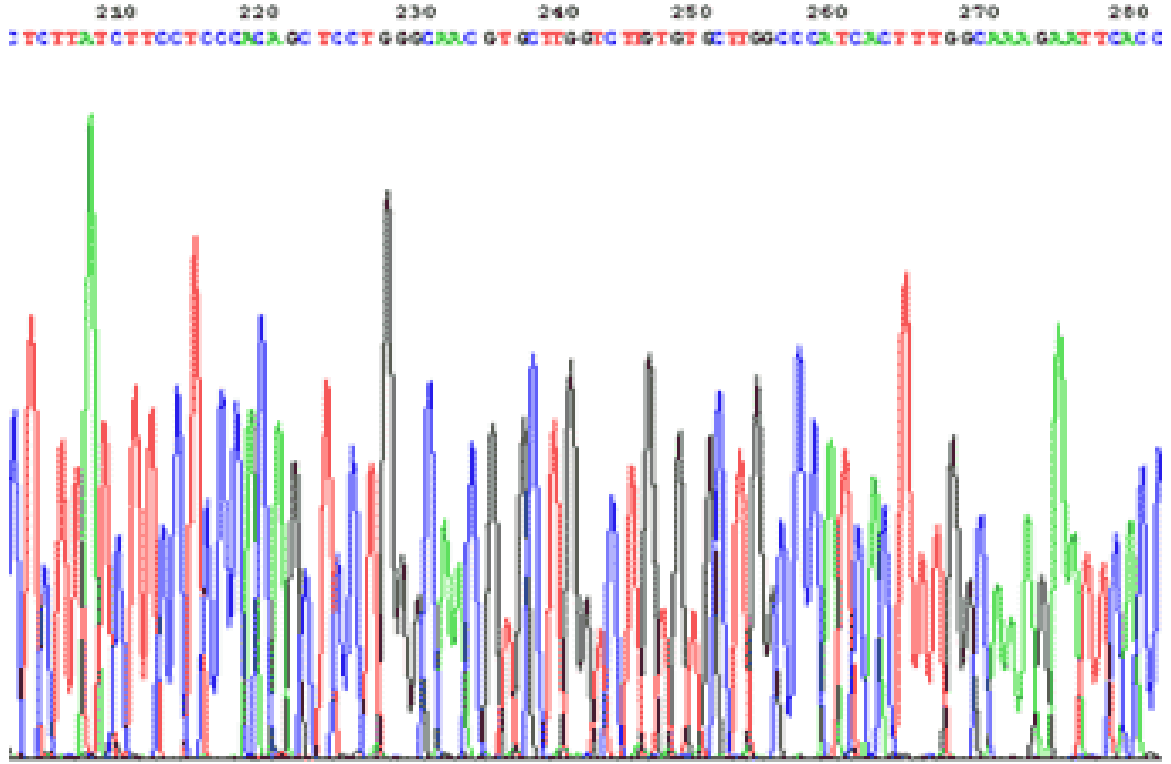
ürünleri, bir nükleotid uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır. Jel hattındaki her bir bant belirli bir baza karşılık gelmektedir ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir (Klug ve Cummings, 2002). Enzimatik DNA sentezine dayanan Sanger'ın dizi analizi yönteminde, dizisi saptanacak olan DNA zinciri yeni sentezlenecek olan DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz I ile katalizlenir. Yöntemde, modifiye (kimyasal değişikliğe uğratılmış) dideoksinükleotit trifosfatlar kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilir. Dideoksinükleotit trifosfatlarda 3'-OH grubu bulunmaz. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır. Ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotit ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir.

DNA sentezi olurken DNA polimeraz, bazen uzayan DNA zincirinin yapısına nükleotitlerin yanısıra dideoksinükleotitleri de sokar. Bu nükleotit analogu 3'-OH grubu içermediği için bir sonraki nükleotid ile fosfodiester bağı oluşturmaz ve bu nedenle DNA sentezi sonlanır. Her bir tüpte birbirinden birer nükleotit farklı olan değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir. Sentez sonrası, dört reaksiyondan elde edilen radyoaktif DNA parçacıkları elektroforez jelinde yan yana dört ayrı kuyucukta yürütülür. DNA bantları otoradyografi ile görüntülendiğinde merdivene benzer bantlar serisi ortaya çıkar (Şekil 3). Dizi aşağıdan yukarıya doğru okunarak baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının 5' den 3' ne doğru nükleotit dizisi belirlenmiş olur.



Şekil 3. Sentez sonrası DNA bantlarının otoradyografi görüntüsü

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi aletleri ve radyoaktif izotop yerine floresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılır ve sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Şekil 4).



Şekil 4. Dört farklı floresan boyanın kullanılmasıyla oluşan pikler

Gen bölgesi PCR işlemiyle çoğaltılır. Çoğaltılan bu bölgeler florokrom maddelerle işaretli bazlarla tekrar PCR reaksiyonuna (Multiplex Flourescent PCR) sokulur. Reaksiyon sonucunda ortaya çıkan hedef bölgelerdeki baz dizisi şifresini oluşturan bazlar genetik analizörler (DNA Sequencer) ile tek tek okunur (Klug ve Cummings, 2002).

DNA dizi analizi ile birçok organizmanın genlerinin yapısı ve organizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (Klug ve Cummings, 2002). Ayrıca bu yöntem, prokaryotik ve ökaryotik genlerde yer alan kontrol bölgelerin organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin aminoasit dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılır.

Nükleotit dizilerinin bilgisayar analizleri, klonlanmış parçanın bir genin tamamını mı yoksa bir kısmını mı içerdiğinin anlaşılmasını sağlar. Bu ekzon/intron birleşme noktalarının araştırılması ile ve çeşitli verilere göre daha önceden ortaya çıkarılmış genlerin DNA dizileri ve proteinlerin aminoasit dizileri ile karşılaştırılarak yapılır (Klug ve Cummings, 2002).

1.8. Filogenetik Analiz

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Filogenetik analiz, farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilir. Moleküler filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde oluşan değişikliklerin hızını ve karakterini saptamaya ve böylece genler ve organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yöneliktir. Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım, elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir (Saitou ve Imanishi, 1989). Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, başlıca bir düğüm (node) ve dallardan (branch) oluşur. Dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir (Freeman ve Herron, 1999). Ağaçta öncülü olmayan düğüm köktür. Kök ortak bir atayı temsil eder. Ağacın herhangi bir yerinde yer alabilir. Köksüz ağaçlarda ise ortak ata gösterilmeden sadece türler arası ilişki ön plana çıkarılır (Mount, 2001a,b).

Filogenetik ağaçta her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir gruba karşılık gelir. Ağaçta dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayırt edilirler (Mount, 2001a,b).

Filogenetik analizlerde ilk adım incelenecek dizinin elde edilmesidir. Daha sonra bu diziler istenirse referans dizi denilen daha önce saptanmış ve üzerinde uzlaşılarak doğruluğuna karar verilmiş dizilerle karşılaştırılabilir. Son yıllarda moleküler filogeni alanında kaydedilen gelişmeler neticesinde çeşitli türlerden elde edilen diziler GenBank gibi özel veritabanı sistemlerinde toplanarak kullanıcıların hizmetine sunulmuştur (Mount, 2001).

1.9. Dizilerin hizalanması

Nükleotid ya da aminoasit dizilerinin karşılaştırılabilmesi için bu dizilerin alt alta hizalanması işlemidir. Bunun için çok çeşitli yöntemler vardır. Kullanılacak yöntemin seçimi dizilerin sayısına ve uzunluğuna bağlıdır. Hizalama elle veya gözle yapılabilir. Ancak dizi sayısı ve uzunluğu arttıkça elle yapılan hizalama zaman alıcı ve hatalara açık hale geleceğinden Clustral, TreeAlign gibi bilgisayar programları geliştirilmiştir (Mount, 2001). Hizalama dizilerin hangi pozisyonunun korunmuş olduğunu ve hangilerinin ortak diziden farklılaşmış olduğunu gösterir. Evrimsel ilişki gösteren diziler homolog olarak

kabul edilir. Genel bir kural olarak iki DNA dizisi arasındaki farklılık ne kadar çoksa bunların ortak atalarından farklılaşma zamanları da o kadar eskiye dayanır (URL-1).

Hizalama sırasında eşleşen ve eşleşmeyen nükleotidler çeşitli işaretler ile gösterilebilir. Sıklıkla tercih edilen eşleşen nükleotidlerin yıldız (*) ile eşleşmeyenlerin ise boşluk ile gösterilmesi şeklindedir. Bu boşlukların dizideki insersiyonları mı delesyonları mı gösterdiği bilinemeyeceğinden nötral bir terim olan 'indel' (insersiyon-delesyon) kullanılmaktadır. Diziler ve dizi gruplarındaki değişikliklerin saptanmasında en görsel yol ağaç oluşturmaktır (Mount, 2001a,b). Burada doğru hizalamanın yapılmış olması başlangıç noktasını oluşturur. Yapılan yanlış bir hizalama filogenetik ağacın yanlış oluşturulmasına neden olur ve bu durum çok çok uzun dalların varlığı ile kendini gösterir (URL-2).

1.10. Filogenetik ağacın oluşumu

Filogenetik ağaç oluşturulurken genellikle üç yöntem kullanılır. Bu yöntemlerden ikisi karakter temelli yöntemler olarak bir başlık altında toplanabilen Maksimum parsimoni ve Maksimum Benzerlik yöntemleridir. Diğeri ise uzaklık yöntemidir.

1.10.1. Farklılıkları en aza indirme (Maximum parsimony:MP) yöntemi

İncelenen diziler ya da genetik uzaklıklar ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gerekli en az mutasyonların saptanmasına dayanan bir yöntemdir. MP analizi ile en iyi sonuçlar, dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin çok güçlü olduğu ve az sayıda dizinin olduğu durumlarda alınır. MP ile ağaçların oluşturulmasında kesin ve tahmini yaklaşımlar söz konusudur. Kesin yaklaşımda olası tüm ağaçlar gözden geçirilir ve kullanılan optimalite ölçütüne en uygun ağaç belirlenir. Bu yöntem çok zaman alıcıdır ve yirmiden fazla örnekleme varlığında uygun değildir. Çok sayıda dizinin bulunduğu durumlarda tahmini yaklaşım uygulanmaktadır. En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir (Freeman ve Herron, 1999).

1.10.2. En yüksek ihtimal (Maximum likelihood:ML) yöntemi

Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında MP'ye alternatif olarak ortaya konulmuş bir yöntemdir (Felsenstein, 1987). Araştırmacıya, sunulan bütün bilgiyi daha etkili kullanmak ve olası birçok ağaç içerisinde en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağı yaratmak için ortaya konmuştur. Bu yöntem için bir bilgisayar programı, her ağaç topolojisini değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar. Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılığı toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Bu olasılık ağaçların olasılığı olarak temsil edilir

1.10.3. Uzaklık (Distance) yöntemi:

Genetik uzaklık yöntemi filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Aralarında az sayıda nükleotid değişikliği olan bu dizi çiftleri komşu olarak adlandırılır. Uzaklık metodları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir (Mount, 2001a,b). Tercih edilen ağaç, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır (Freeman ve Herron, 1999).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal Temini

Çalışmada kullanılan bitki materyallerinin temini için gereken arazi çalışmaları, Erzincan, Kastamonu, Konya, Sivas, Kahramanmaraş, Giresun, Bayburt (Şekil 5) illerinde bitkinin vejetasyon dönemi içerisinde yer alan Haziran-Temmuz aylarında 2004–2009 yılları arasında *Makbul* tarafından gerçekleştirilmiştir. Örneklerin morfolojik görüntüleri bulgular kısmında, toplama bigileri Tablo 1’ de verilmiştir.

Bu örneklerin bir kısmı morfolojik incelemeler için uygun şekilde kurutularak herbaryum örneği haline getirilirken moleküler incelemeler için ise yeteri kadar yaprak materyali silika jel içerisine alınarak stoklanmıştır. Herbaryum materyali haline getirilen örnekler Rize Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu (RUB)’nda saklanmaktadır.

2.2. Morfolojik Çalışmalar

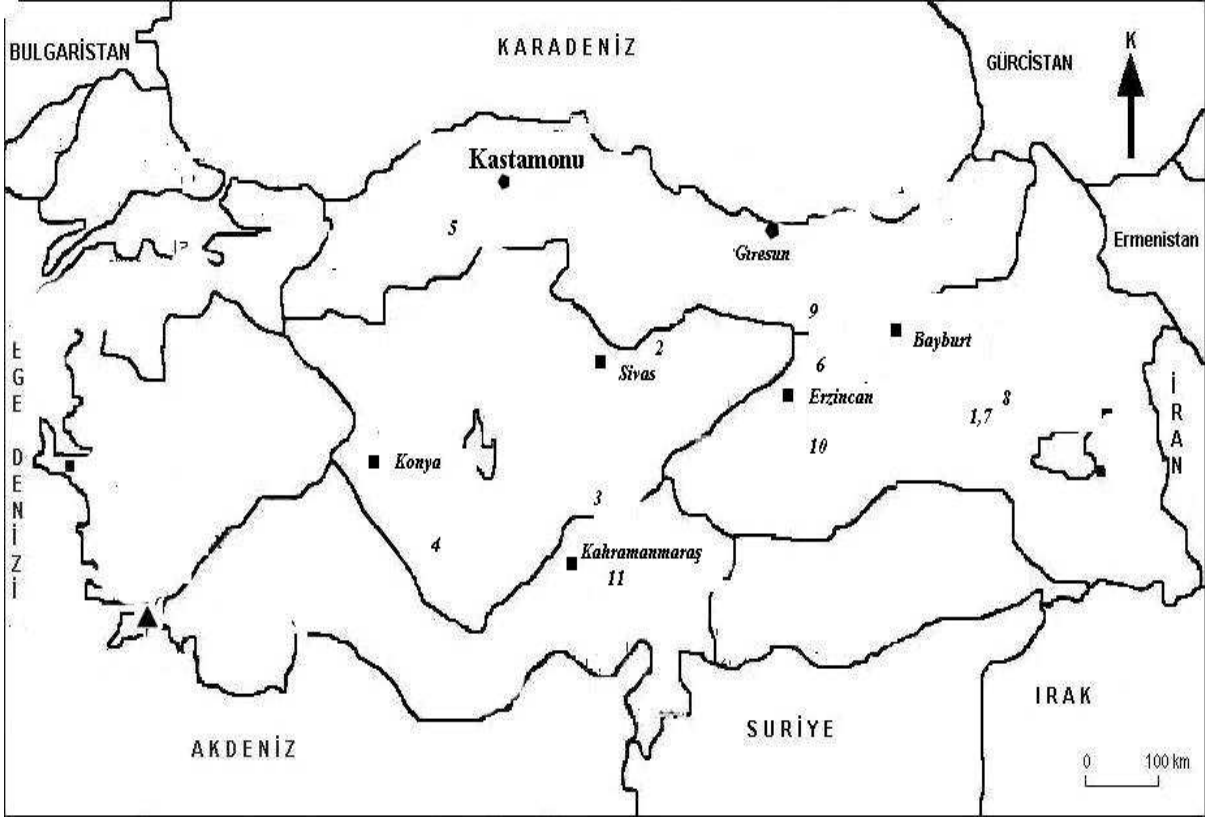
Morfolojik incelemeler herbaryum materyalleri üzerinden Türkiye Florası (Davis, 1975) Rus ve İran Floralarından yararlanılarak yapılmıştır. Morfolojik incelemelerde *Scorzonera* cinsi için önemli 29 karakter tespit edilmiş ve bir bitki için ayrı ayrı ölçülmüştür (Tablo 2). Her bir karakter için ortalama 30 adet ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin ortalama değeri Tablo 3’ de verilmiştir.

2.3. Nümerik Analizler

Nümerik analizler, 11 takson üzerinde 29 morfolojik karakter kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu morfolojik karakterler ve ölçüm birimleri Tablo 2’de verilmiştir. Çalışılan karakterlerin her takson için aldığı değerler en az 5 örnek ya da bu örneklere ait farklı fotoğraflar üzerinde yapılan inceleme ile belirlenmiş ve böylece de bütün taksonlara ait 18 x 29 boyutunda morfolojik birer ortalama veri matrisi elde edilmiştir. Bu mesafe matrisinden UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) olarak bilinen algoritma yöntemi aracılığı ile en yakın olan OTU’lar belirlenerek sonuçlar fenogram halinde dönüştürülmüştür

Tablo 1. Çalışmalardaki Örneklere Ait Toplama Bilgileri

Tür Adı	Toplandığı Yer
1. <i>S. armeniaca</i>	A8 Bayburt: Kop Dağının Aşkale'ye bakan yüzü, 2000 m, 30.06.2004, <i>Makbul</i> 048, RUB.
2. <i>S. hieracifolia</i>	B6 Sivas: Tödürge Gölü, Zara-Hafik doğu bitimi, 1301m, 06.06.2009, <i>Makbul</i> 127, N 39 52.027, E 037 36.483, RUB.
3. <i>S. lacera</i>	C6 Kahramanmaraş Süleymanlı-Ilıca yol ayrımı, 727 m, 08.06.2009, <i>Makbul</i> 134, N 37 50.789, E 036 49.470, RUB.
4. <i>S. parviflora</i>	C4 Konya Gölyazı yayla çıkışı, 912m, Tuzgölü havzası, 11.06.2009, <i>Makbul</i> 139, N 38 32 670, E 033 19.4 78, RUB.
5. <i>S. pygmaea</i> subsp. <i>nutans</i>	A4 Kastamonu: Ilgaz Dağı, televizyon vericisi çevresi, 2055 m, 02.08.2009, <i>Makbul</i> 165, N 41 03 100, E 033 42 969, RUB.
6. <i>S. rigida</i>	B7 Erzincan Ahmediye üstleri, 2306 m, 11.07.2009, <i>Makbul</i> 156, N 39 54 376, E 039 20 275, RUB.
7. <i>S. latifolia</i>	A8 Bayburt: Kop Dağının Aşkale'ye bakan yüzü, Bayburt-Erzurum Yolu, Taş Ocağı civarı, yol kenarları, 2150 m, N 40 26 37, E 040 48 27, 30.06.2004, 27.07.2004, <i>Makbul</i> 094, RUB, KTUB.
8. <i>S. sosnowskyi</i>	A8 Bayburt: Kop Dağının Aşkaleye bakan yüzü. Taş Ocağı civarı, 2148 m, N 40 26 37, E 040 48 27, 30.06.2004, <i>Makbul</i> 086, RUB.
9. <i>S. tomentosa</i>	A7 Giresun: Alucra, 1600 m, 25.06.2004, <i>Makbul</i> 010, RUB, KTUB;
10. <i>S. aucherana</i>	B7 Erzincan: İliç-Hasan ova, 1153m, 25.06.2009, <i>Makbul</i> 167, N 39 32 44, E 38 37 82, RUB.
11. <i>S. kotschy</i>	C6 Kahramanmaraş: Tekir kasabası, değirmen önü balık tesisi yolu üzeri, 1079m., 07.06.2009, <i>Makbul</i> 133, N 37 54.478, E 036 35 687, RUB.



Şekil 5. Araştırma Bölgesinin Haritası

Tablo 2. Morfolojik Karakterler

Değişkenler	Karakter Adı	Birimi
X ₁	Bitkinin boyu	cm
X ₂	Bitki	skeyp:0; gövdemsi:1
X ₃	Bitkinin görünümü	tek tek:0, küme şeklinde:1
X ₄	Bitkinin tüylülük durumu	yoğun tüylü:1; az tüylü ya da tüysüz:0
X ₅	Kök şekli	silindirik:0; yumru:1
X ₆	Gövde tabanında yaprak kalıntıları	var:1; yok:0
X ₇	Gövdenin şekli	dallanmış:1; dallanmamış:0
X ₈	Taban yaprakları	tam:0; tam ya da parçalı:1
X ₉	Yaprak boyu	Cm
X ₁₀	Yaprak eni	Mm
X ₁₁	Gövde ya da taban yaprak ayasının şekli	linear, linear-lanseolat ya da lanseolat-ovat:0; elips:1
X ₁₂	Gövde ya da taban yapraklarının rengi	gri:0; gri-yeşil ya da yeşil:1
X ₁₃	Yaprak kenarları	düz:0; dalgalı:1
X ₁₄	Yaprak tabanı şekli	gövdeyi sarıcı:1; değil:0
X ₁₅	Gövde ya da taban yapraklarının tüylülük durumu	yoğun tüylü:2; az tüylü ya da tüysüz:0
X ₁₆	Yapraktaki tüy tipi	tomentos ya da lanat:1; pubescens, sericea ya da tüysüz:0
X ₁₇	Kapitulum sayısı	Adet
X ₁₈	Kapitulum boyu	Mm
X ₁₉	Fillarilerin tüylülük durumu	yoğun tüylü:1; az tüylü ya da tüysüz:0
X ₂₀	Dış fillarilerin uzunluğu	Mm
X ₂₁	Dış fillarilerin şekli	linear, lanseolat, ovat 0; eliptik:1
X ₂₂	İç fillarilerin uzunluğu	Mm
X ₂₃	İç fillarilerin şekli	linear, lanseolat, ovat 0; eliptik:1
X ₂₄	Ligula rengi	sarı:1; mor:0
X ₂₅	Ligula boyunun iç fillari boyuna oranı	Mm
X ₂₆	Akenin boyu	Mm
X ₂₇	Akenin tüylülük durumu	yoğun tüylü:1; az tüylü ya da tüysüz:0
X ₂₈	Pappus rengi	kahverengi-siyah:1; beyaz-krem:0
X ₂₉	Pappusun tüylülük durumu	plumose:0; barbellat-plumose:1

2.4. Moleküler Çalışmalar

Silika jel içerisinde kurutulan yaprak örnekleri genomik DNA'larının ekstraksiyonu Soltis (1992) tarafından modifiye edilen Doyle'un metodu ve Kit NucleoSpin R. Plant (Macherey-Nagel, GmbH & Co, k6 Germany) ve DNeasy R Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Soltis ve ark., 1992). Elde edilen genomik DNA'nın ITS bölgeleri Soltis tarafından geliştirilmiş protokole göre PCR kullanılarak çoğaltılmıştır. ITS bölgeleri MEGA 3.1 programında hizalanmış ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

2.4.1. Kuru Yapraklardan Genomik DNA İzolasyonu

Kurutulmuş her bir örnekten 0,02 gr tartılan yaprak materyali havan içinde öğütülerek toz haline getirildi. Daha sonra bu yaprak numuneleri ependorf tüplerine aktarıldı. Üzerine önceden hazırlanmış 500 µl CTAB tamponu, 0,02 gr polyvinylpolypropodylene (PVPP) ve 10 µl izomerkaptoetanol ilave edildi. Karışım bir pipet yardımıyla homojenize edilerek 65°C'de 4 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alınarak 1 dakika soğumaya bırakıldı ve oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen numune üzerine 500 µl kloroform eklendi ve tüpler homojen olana kadar alt üst edilerek çalkalandı. Ardından aynı hızda santrifüjde 1dk bekletildi. Santrifüj sonrası, tüplerdeki süpernatant kısım alınarak yeni tüplere aktarıldı. Bunun üzerine tekrar 500 µl kloroform ilave edildikten sonra tüpler 3–5 kez alt üst edildi ve aynı hızda 1 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi ardından süpernatant kısım alınarak bir önceki aşama aynen tekrarlandı. Daha sonra üst faz alınarak yeni bir ependorf tüpe transfer edildi. Tüplerden hacmi en fazla olanın kapasitesi belirlendi ve bu hacim baz alınarak diğer tüplere eşit oranda hacmin % 8'i kadar her tüpe 7,5 M amonyum asetat ilavesi yapıldı, tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra oluşan hacmin % 54'ü kadar izopropanol ilavesi yapıldı ve süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra +4°C'de en az 2 saat bekletildi (daha iyi sonuçlar için bir gece bekletildi). Bir gece +4°C'de bekletilen örnekler 10.000 – 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra şeffaf pellet üzerine 1ml % 70'lik etanol ilave edildi. Tüpler birkaç defa çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 10–15 dakika bekletildi. Alkol ilave edilmiş tüpler 10.000 – 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra tüm alkolün DNA'dan uzaklaştırılması için tüpler kapakları açık şekilde 15 dakika 37°C'de kurumaya bırakıldı. Daha sonra tüplerde bulunan DNA pelleti, 50 µl TE ilave edilerek çözüldü. Örnekler, pelletin tamamen çözülmesi için 15 dakika 65°C'de su banyosunda tutuldu. Ortamda

bulunan RNA'ların uzaklaştırılması için ise her 100 µl'lik hacim için 1 µl RNaz ilave edildi.

2.4.2 PCR Uygulamaları

İzole edilen total DNA'dan 8 µl, her bir primerden 2µl, 5X'lik reaksiyon tamponundan 10 µl, 2,5 mM MgCl₂'den 3 µl, 0,5 mM dNTP'den 2 µl, 1 ünite Taq DNA polimeraz dan 0,5 µl ve son hacim 50 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanarak PCR karışımı hazırlandı.

PCR döngü koşulları:

94 °C'de 3 dakika DNA çift zincirinin ayrılması (ön denatürasyon),

94 °C'de 1 dakika DNA çift zincirinin ayrılması (DNA denatürasyonu),

55 °C'de 1 dakika primerlerin bağlanması (annealing),

72 °C'de 2 dakika DNA sentezi (extension),

Toplam 35 döngü,

72 °C'de 5 dakika son uzatma (final extension)

Yukarıda ifade edilen PCR uygulamaları Eppendorf Mastercycler Personal cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin elektroforezi on iki hücreli jel tepsisi kullanılarak, 0,25 µg/ml etidium bromid içeren % 1'lik agarozda, Trizma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA (IX TAE) tamponunda 25 dakika süre ile 96 voltta yürütüldü ve örnekler UV ışığı altında Polaroid tip siyah–beyaz filmle görüntülenmiştir.

2.4.4. Baz Dizin Analizi

Baz dizin analizi örneklerin pGEM– T easy vektörüne klonlanarak T7 ve SP6 promotorlarıyla okutulmasıyla gerçekleştirilmiştir.

2.4.5. Klonlama

2.4.5.1. PCR Ürünlerinin Ligasyonu

PCR sonucunda elde edilen ITS bölgeleri, PCR ürünlerinin aktarılmasına uygun olan pGEM–T Easy vektörü kullanılarak klonlanmıştır. Fragmentlerin vektöre bağlanmasını sağlamak için 1,4 µl PCR ürünü, 2 µl pGEM–T Easy Tamponu (1X, Promega), 0,3 µl T4 DNA ligaz (Promega) ve 0,3 µl pGEM–T Easy vektörü kullanıldı. Reaksiyon, 16°C'de 16 saat bekletilerek tamamlandı. Ligasyon ürünleri daha sonra Maniatis ve ark. (1982)'ne göre alıcı özellik kazandırılmış *Escherichia coli* JM101 konak hücrelerine aktarıldı.

2.4.5.2. Transformasyon

E. coli'nin JM101 stok kültüründen alınarak minimal agarda bir gece geliştirilen *E. coli* LB besiyerine alındı ve bir gece geliştirildi. LB besiyerindeki bir gecelik *E. coli* JM101 kültürü OD600'de ölçülerek OD600= 0,1 olacak şekilde LB ile 30 ml'ye tamamlandı. 37°C'de OD600= 0,45-0,55 arasında bir değere ulaşınca kadar inkübasyona bırakıldı. 5 dakika buzda beklettikten sonra 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Pellet 10 ml 100mM CaCl₂'de çözüldü. 30 dk buzda inkübe edildi. 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan pellet 2 ml 100mM CaCl₂'de çözüldü. Bir gece +4°C'de bekletildi.

Ligasyon ürünü ve 4 µl kompetant hücre karıştırıldı. 20 dk buzda inkübe edildi. 42°C'lik su banyosunda 90 sn sıcak şoku uygulandıktan sonra tüplerin içerisine 200 µl sıvı LB eklendi ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Daha önce hazırlanmış olan LBA petrilere (50 µg/ml ampisilin içeren, üzerine 100 mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-Gal çözeltisinden 40 µl sürülmüş petrilere) yayılarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Büyüme sonucunda içerisine plazmit alan hücrelerin mavi/beyaz koloni oluşturmamasından yararlanılarak klonlar seçildi.

2.4.5.3. Rekombinant Plazmitlerin İzolasyonu

Elde edilen klonlardan rekombinant plazmitlerin izolasyonu iki şekilde gerçekleştirildi. Birincisinde izolasyonlar elle yapıldı ve restriksiyon kesimleri yapılarak doğrulukları tespit edildi. İkinci seferde ise, doğruluğu tespit edilmiş olan klonlardan elde edilen kültürlerden "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega) kiti kullanılarak yapıldı. Elde edilen pDNA'lar % 1 'lik agaroz jel elektroforezine tabii tutularak tespit edildi ve kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı. Klonların doğruluğunun tespitinde kullanılan plazmit DNA izolasyon yöntemi Sambrook ve ark. (1989)'na göre şu şekilde yapıldı. Öncelikle seçilen beyaz koloniler, birer steril kürdan yardımıyla 50 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB sıvı besiyerine 37°C'de 1 gece kültüre edildi. Bu kültürler daha sonra 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktararak 18000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Tüplerin süpernatant kısımları döküldükten sonra pellet üzerine 200 µl solüsyon I (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM EDTA, 25 mM glikoz) ilave edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Üzerine 400 µl solüsyon II (% 1 SDS ve 0,1 M NaOH) eklendi. Altüst edilerek 5-10 dakika buzda bekletildikten sonra, 300 µl 7,5 M amonyum asetat ilave edildi ve dikkatli bir şekilde altüst edilerek buza kondu. 10 dakika buzda bekletildikten sonra 11000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst faz alınarak yeni

bir mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine 100-700 µl izopropanol ilave edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi, sıvı kısım atıldı ve pellete % 70’lik alkolden 500 µl eklendi. Tüpler 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım döküldü, ardından alkolün uzaklaştırılması için tüpler 37°C’de yaklaşık 15 dakika kurumaya bırakıldı. DNA’lar bu aşamadan sonra 50–100 µl TE de çözüldü ve içerdikleri RNA’ların parçalanması için 1 µl RNaz/100 µl ilave edildi. Elde edilen plazmidler daha sonra kullanılmak üzere –20°C de saklandı. İzole edilen bu plazmitlerin istenilen DNA parçasını ihtiva edip etmediğini anlamak amacıyla restriksiyon enzimlerinden biri olan *EcoRI* ile kesim yapıldı. Bunun için 8.5 µl pDNA, 0,5 µl *EcoRI* enzimi (10 U/µl, Promega), 1 µl *EcoRI* tamponu (10X, Promega) karışımı oluşturularak 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Kesim sonrasında %1’lik agaroz jelde PCR ürünüyle yürütülerek plazmidin istenilen DNA fragmentini taşıyıp taşımadığı kontrol edildi.

Sonuçlar BioDocAnalyze (Biometra) jel görüntüleme sistemi ile kayıt altına alındı. Doğru klonlar tespit edildikten sonra plazmidin taşıdığı ITS bölgesinin DNA baz sırasının analizi için yukarıda bahsedildiği şekilde 3 ml LB sıvı besi yerine *E. coli* JM101 suşu ekilerek 37°C’de 16 saat boyunca inkübe edildi. Sıra analizi amaçlı plazmit izolasyonu belirtildiği üzere, “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) kiti kullanılarak yapıldı. Belirlenen klonların taşıdıkları ITS bölgelerinin DNA sıra analizleri Macrogen (Kore) firması tarafından gerçekleştirildi.

2.4.6. ITS Bölgelerine Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar, NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) internet ara yüzü kullanılarak GenBank’taki verilerle ve CLUSTAL–W (1.83) programı ile de birbirleriyle olan benzerlikleri karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi (URL -3).

3. BULGULAR

3.1. Morfolojik Bulgular

3.1.1. İncelenen Scorzonera Taksonları İçin Tayin Anahtarı

- 1- Bitkiler skeyp ya da gövdemsi
- 2- Kökler sürünücü, gövdelerin içi boş ve kapitulum 20 mm'den uzun 4- *S. parviflora*
- 2- Kökler sürünücü değil, gövdelerin içi dolu ve kapitulum 20 mm'den kısa
- 3- Bitki boyu 19 cm'den kısa, yapraklar pubescent ve akenler 5-9 mm
- 5- *S. pygmaea* ssp. *nutans*
- 3- Bitki boyu 19 cm 'den uzun, yapraklar lanat ve akenler 2-5 mm 6- *S. rigida*
- 1- Bitkiler gövdemsi
- 4- Ligulalar mor renkli 3- *S. lacera*
- 4- Ligulalar sarı renkli
- 5- Yapraklar tamamen parçalı ya da en azından bazıları parçalı
- 6- Bütün akenler lanat, 9- 13 mm, dış fillariler 6-8 mm, iç fillariler 10- 15 mm
- 1- *S. armeniaca*
- 6- Bazı akenler globrous, 4-6 mm, dış fillariler 3-5 mm, iç fillariler 10-15 mm
- 2- *S. hieraciifolia*
- 5- Yapraklar basit
- 7- Yapraklar petiolat, dış fillariler 10 mm'den uzun, akenler tüysüz
- 9- *S. tomentosa*
- 7- Yapraklar sesil, dış fillariler 10 mm'den kısa, akenler tüylü
- 8- Yapraklar 1 cm'den geniş, iç fillariler 15 mm'den uzun
- 9- Yapraklar lanate, pubescent, kapitulum sayısı 30'dan az dış fillariler 8-10 mm
- 8- *S. sosnowskyi*
- 9- Yapraklar nadiren villous ya da globrous, kapitulum sayısı 30'dan fazla, dış fillariler 3-6 mm
- 7- *S. latifolia*
- 8- Yapraklar 1 cm'den dar, iç fillariler 15 mm'den kısa
- 10- Yapraklar 2-5 mm, kapitulum 1- 6 adet, iç fillariler 10-15 mm
- 11- *S. kotschyi*
- 10- Yapraklar 5-9 mm, kapitulum çok sayıda, iç fillariler 8- 10 mm
- 10- *S. aucherana*

3.1.2. Taksonların Morfolojik Görüntüleri



Şekil 6. *S. armeniaca*



Şekil 7. *S. hieraciifolia*



Şekil 8. *S. lacera*



Şekil 9. *S. parviflora*



Şekil 10. *S. pygmaea* subsp. *nutans*



Şekil 11. *S. rigida*



Şekil 12. *S. latifolia*



Şekil 13. *S. sosnowskyi*



Şekil 14. *S. tomentosa*

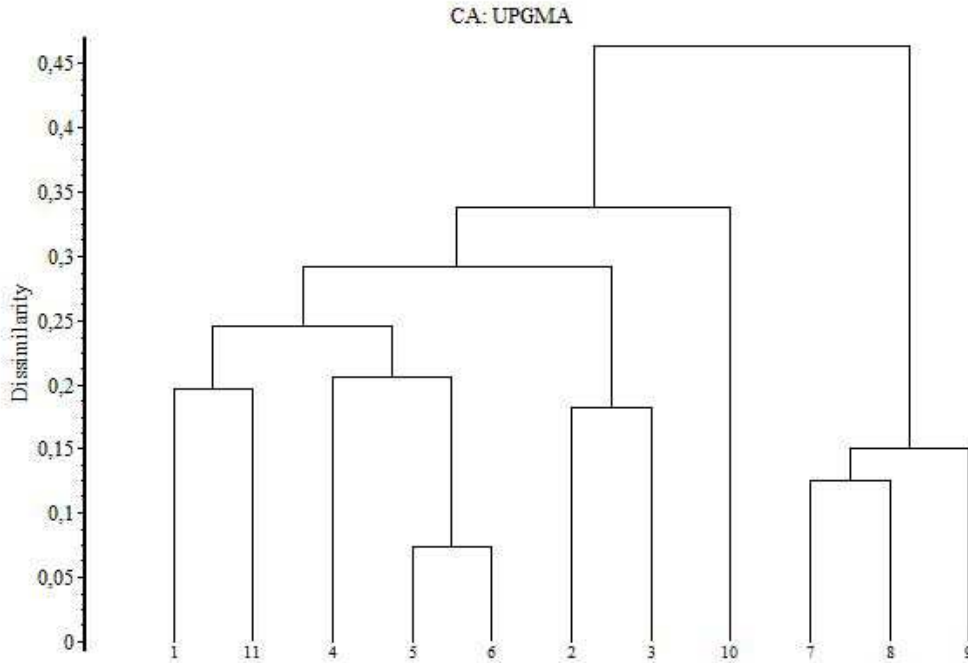


Şekil 15. *S. aucherana*



Şekil 16. *S. kotschy*

3.1.3. Morfolojik Karakterler Kullanılarak Elde Edilen UPGMA Fenogramı



Şekil 17. İncelenen *Scorzonera* taksonlarının morfolojik karakterler kullanılarak UPGMA yönteminden elde edilmiş fenogram üzerindeki konumu

UPGMA yönteminden elde edilen fenogramda temelde iki grup olduğu görülmektedir. Birinci grupta *S. sosnowskyi*, *S. latifolia* ve *S. tomentosa* yer alırken ikinci grupta *S.*

hieraciifolia, *S. lacera*, *S. parviflora*, *S. pygmaea* subsp. *nutans*, *S. armeniaca*, *S. rigida*, *S. aucherana* ve *S. kotschy* yer almaktadır.

Tablo 3. Nümerik Analizlerde Kullanılan Morfolojik Karakterlerin Ortalama Değerleri

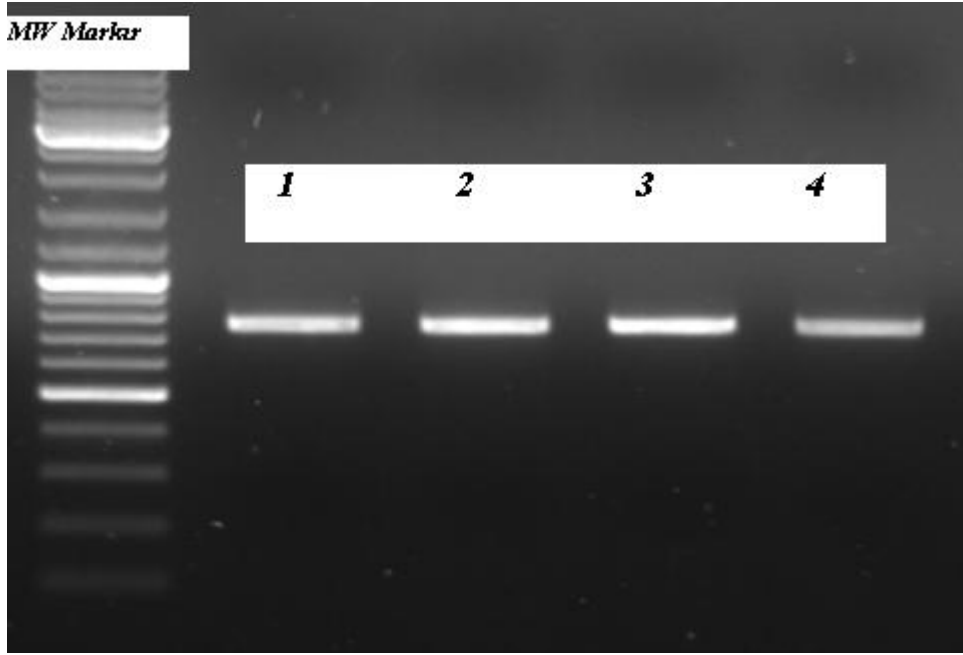
Tür	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄
<i>S. armeniaca</i>	45	1	0	0	0	1	1	1	20	3	0	1	0	1
<i>S.hieraciifolia</i>	20	1	0	0	0	1	1	1	8	4	0	1	1	1
<i>S. lacera</i>	52	1	0	0	0	1	1	1	8.5	7	0	1	1	1
<i>S. parviflora</i>	24	0	0	0	0	1	0	0	9	4	0	1	0	1
<i>S. pygmaea</i> subsp. <i>nutans</i>	17	0	1	0	0	1	1	0	4.8	2.5	0	1	0	1
<i>S. rigida</i>	22	0	1	1	0	1	1	0	8.4	1.5	0	1	0	1
<i>S.latifolia</i>	90	1	0	1	0	0	1	0	15	3.5	0	0	1	0
<i>S. sosnowskyi</i>	75	1	0	1	0	0	1	0	10	2.5	0	0	1	0
<i>S.tomentosa</i>	55	1	0	1	0	0	1	0	10	3	0	0	1	0
<i>S. aucherana</i>	35	1	1	1	0	1	1	0	9	6	0	1	1	1
<i>S.kotschy</i>	24	1	0	0	0	1	1	0	22	3.5	0	1	0	1

Tablo 3'ün devamı

Tür	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	X ₂₀	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇	X ₂₈	X ₂₉
<i>S. armeniaca</i>	0	0	3	20	0	8	0	20	0	1	1	13	0	0	1
<i>S.hieraciifolia</i>	1	0	14	14	0	4.3	0	12.4	0	1	1.15	5	0	1	0
<i>S. lacera</i>	0	0	4	26	0	8	0	24	0	0	1	9.5	0	1	0
<i>S. parviflora</i>	0	0	2	28	0	9	0	24	0	1	1.17	6	0	1	1
<i>S. pygmaea</i> subsp. <i>nutans</i>	0	0	4	17	1	4.5	0	12	0	1	1.3	7	0	1	1
<i>S. rigida</i>	0	0	4	14	1	3.5	0	11	0	1	1.2	4	0	1	1
<i>S. latifolia</i>	1	1	80	25	1	6	0	15	0	1	1.66	9	1	0	1
<i>S. sosnowskyi</i>	1	1	13	30	1	10	0	20	0	1	1.5	10	1	1	1
<i>S. tomentosa</i>	1	1	9	40	1	18	0	22	0	1	1.8	10	0	0	1
<i>S. aucherana</i>	1	1	41	13.2	0	3	0	9	0	1	1.46	5	1	1	1
<i>S.kotschy</i>	0	0	10	17	0	4	0	13	0	1	1.3	5	1	1	1

3.2. Moleküler Bulgular

2004–2009 yılları arasında yapılan arazi çalışmaları sonucu 11 *Scorzonera* taksonlarının genomik DNA'ları daha önceki bölümde bahsedilen prosedüre göre çoğaltılmış, ITS baz sıraları ekler kısmında verilmiştir. Şekil 18 bazı örneklerin ITS bantlarının jel görüntülerini göstermektedir. Labaratuvar çalışmalarında aynı anda bantların jel görüntüleri elde edilemediğinden dolayı bir kısmı verilmiştir.



Şekil 18. Bazı *Scorzonera* örneklerinin ITS bölgelerine ait PCR bantları (1- *S. hieraciifolia*, 2- *S. latifolia*, 3- *S. sosnowskyi*, 4- *S. tomentosa*)

Yapılan çalışmalar sonucu örneklere ait ITS dizinleri uzunlukları 635 – 741 bp arasında değişiklik gösterdiği; bütün ITS nükleotit uzunluğundaki G+C içeriğinin ise, % 51,3 - 55,9 arasında değiştiği bulunmuştur. Her örnek için elde edilen ITS uzunluğu, G+C içeriği ve pürin/ primidin değerlerini içeren veriler Tablo 4’de verilmiştir. Bütün çalışılan örneklerin ITS bölgeleri arasındaki benzerlik ilişkileri, Clustal W programından (URL_3) yararlanılarak ortaya konulmuştur (Tablo 5, 6). Kimura'nın pair wise benzemezlik metoduna göre elde edilen oranlar % 0,2–26,5 oranları arasında değişiklik göstermektedir (Tablo 7).

Tablo 4. ITS PCR Sonucunda Elde Edilen Nükleotit Uzunlukları, G+C ve Pürin/ Primidin İçeriği

Tür adı	ITS uzunluğu(bp)	G+ C %	Pürin/Primidin içeriği
<i>S. armeniaca</i>	731	53.9	366/365
<i>S. hieraciifolia</i>	636	51.3	316/320
<i>S. lacera</i>	698	55.9	346/352
<i>S. parviflora</i>	732	52.7	371/361
<i>S. pygmaea</i> subsp. <i>nutans</i>	642	54.4	324/318
<i>S. rigida</i>	714	53.4	397/317
<i>S. latifolia</i>	635	51.7	311/324
<i>S. sosnowskyi</i>	637	51.3	313/324
<i>S. tomentosa</i>	635	51.5	311/324
<i>S. aucherana</i>	647	54.1	328/319
<i>S. kotschyi</i>	642	53.1	325/317

Tablo 5. Clustal W Programıyla Elde Edilen ITS Bölgelerine Dayalı Benzerlik Yüzdeleri

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score		
1	S.tomentosa	635	2	S.sosnowskyi	637	98
1	S.tomentosa	635	3	S.latifolia	635	99
1	S.tomentosa	635	4	S.armeniaca	731	83
1	S.tomentosa	635	5	S.hieraciifolia	636	98
1	S.tomentosa	635	6	S.kotschyi	642	80
1	S.tomentosa	635	7	S.parviflora	732	98
1	S.tomentosa	635	8	S.aucherana	647	79
1	S.tomentosa	635	9	S.pygmaea	642	80
1	S.tomentosa	635	10	S.lacera	698	73
1	S.tomentosa	635	11	S.rigida	714	69
2	S.sosnowskyi	637	3	S.latifolia	635	99
2	S.sosnowskyi	637	4	S.armeniaca	731	83
2	S.sosnowskyi	637	5	S.hieraciifolia	636	97
2	S.sosnowskyi	637	6	S.kotschyi	642	80
2	S.sosnowskyi	637	7	S.parviflora	732	97
2	S.sosnowskyi	637	8	S.aucherana	647	78
2	S.sosnowskyi	637	9	S.pygmaea	642	79
2	S.sosnowskyi	637	10	S.lacera	698	73
2	S.sosnowskyi	637	11	S.rigida	714	68
3	S.latifolia	635	4	S.armeniaca	731	83
3	S.latifolia	635	5	S.hieraciifolia	636	98
3	S.latifolia	635	6	S.kotschyi	642	80
3	S.latifolia	635	7	S.parviflora	732	98
3	S.latifolia	635	8	S.aucherana	647	79
3	S.latifolia	635	9	S.pygmaea	642	80
3	S.latifolia	635	10	S.lacera	698	74
3	S.latifolia	635	11	S.rigida	714	69
4	S.armeniaca	731	5	S.hieraciifolia	636	83
4	S.armeniaca	731	6	S.kotschyi	642	81
4	S.armeniaca	731	7	S.parviflora	732	82
4	S.armeniaca	731	8	S.aucherana	647	81
4	S.armeniaca	731	9	S.pygmaea	642	82
4	S.armeniaca	731	10	S.lacera	698	87
4	S.armeniaca	731	11	S.rigida	714	64
5	S.hieraciifolia	636	6	S.kotschyi	642	80
5	S.hieraciifolia	636	7	S.parviflora	732	99
5	S.hieraciifolia	636	8	S.aucherana	647	79
5	S.hieraciifolia	636	9	S.pygmaea	642	80
5	S.hieraciifolia	636	10	S.lacera	698	74
5	S.hieraciifolia	636	11	S.rigida	714	68
6	S.kotschyi	642	7	S.parviflora	732	79
6	S.kotschyi	642	8	S.aucherana	647	93
6	S.kotschyi	642	9	S.pygmaea	642	96
6	S.kotschyi	642	10	S.lacera	698	79
6	S.kotschyi	642	11	S.rigida	714	85
7	S.parviflora	732	8	S.aucherana	647	78
7	S.parviflora	732	9	S.pygmaea	642	79
7	S.parviflora	732	10	S.lacera	698	77
7	S.parviflora	732	11	S.rigida	714	61
8	S.aucherana	647	9	S.pygmaea	642	96
8	S.aucherana	647	10	S.lacera	698	76
8	S.aucherana	647	11	S.rigida	714	81
9	S.pygmaea	642	10	S.lacera	698	77
9	S.pygmaea	642	11	S.rigida	714	88
10	S.lacera	698	11	S.rigida	714	61

Tablo 6. Çalışılan Örneklere Ait ITS Baz Sıralarının Clustal W Programı ile Karşılaştırılması

S.armeniaca	-----TCGAAACCT-GCAA	13
S.lacera	-----TCGAAACCTTGCAG	14
S.tomentosa	-----TCGAAACCT-GCAA	13
S.latifolia	-----TCGAAACCT-GCAA	13
S.sosnowskyi	-----TCGAAACCT-GCAA	13
S.hieraciifolia	-----AAACCT-GCAA	10
S.parviflora	-----AAACCT-GCAA	10
S.pygmaea	-----TCGAATCCT-GCAA	13
S.rigida	AAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTTGTCGAATCCT-GCAA	59
S.kotschyi	-----TCGAATCCT-GCAA	13
S.aucherana	-----TCGAATCCT-GCAA	13
	** *** **	
S.armeniaca	-AGCAGAACGACCCG-TGAACCTGTACTCAAAAATCGGGTAATGGGGGAACAGGGAATC	71
S.lacera	GAGCAGACCCGACCCGGCGAAGTTGTACTCAAAA-TCGGTTAATGGGGGAACAGGGGAAGC	73
S.tomentosa	-AGCAGAACGACCCG-TGAACCTGTACTCACAT-CTAGGCGATAGGGTAACGGGCTATGG	70
S.latifolia	-AGCAGAACGACCCG-TGAACCTGTACTCACAT-CTAGGCGATAGGGTAACGGGCTATGG	70
S.sosnowskyi	-AGCAGAACGACCCG-TGAACCTGTACTCACAT-CTAGGCGATAGGGTAACGGGCTATGG	70
S.hieraciifolia	-AGCAGAACGACCCG-TGAACCTGTACTCACAT-CTAGGCGATAGGGTAACGGGCTAAGG	67
S.parviflora	-AGCAGAACGACCCG-TGAACCTGTACTCACAT-CTAGGCGATAGGGTAACGGGCTAAGG	67
S.pygmaea	-AGCAGAATGACCCG-TGAACCTGTACTCAATAA-TCGGGCGATGGGGGAACGGTCTTAGG	70
S.rigida	-AGCAGAATGACCCG-TGAACCTGTACTCAATAA-TCGGGCGATGGGGGAACGGTCTTAGG	116
S.kotschyi	-AGCAGAATGACCTG-TGAACATGTAACATAA-TCTGGCGATGGGGGAAGGTCTTAGG	70
S.aucherana	-AGCAGAATGACCCG-TGAACCTGTACTCAATAA-TCGGGCGATGGGGGAACGGTCTTAGG	70
	***** ** * ** * ** * * * * * * * * * * * * *	
S.armeniaca	CCTCGATCCCTGTT-ACCT-GTTGGCGTG-CATACGTGTTGCTCCTTTCCGGAGCTCCACG	128
S.lacera	CCTCGAACCCTGTTTACCT-GTTGGCGTGGCAGGCGTGTGGTCCCTTTGGAAAGCTCCACG	132
S.tomentosa	CTCGATGCACTGTT-GCCT-GTCGGCGTG-CGTTTCTGTCTGTTCAATTTAGAGCGCCATT	127
S.latifolia	CTCGATGCACTGTT-GCCT-GTCGGCGTG-CGTTTCTGTCTGTTCAATTTAGAGCGCCATT	127
S.sosnowskyi	CTCGATGCACTGTT-GCCT-GTCGGCGTG-CGTTTCTGTCTGTTCAATTTAGAGCGCCATT	127
S.hieraciifolia	CTCGAAGCACTGTT-GCCT-GTTGGCGTG-CGTTTCTGTCTGTTCAATTTAGAGCGCCATT	124
S.parviflora	CTCGAAGCACTGTT-GCCT-GTTGGCGTG-CGTTTCTGTCTGTTCAATTTAGAGCGCCATT	124
S.pygmaea	ATCCGAACCTTATCGCCTTTGTCGGCGTG-CTTTCTGTGGTGCACCGTATGGAGCACCATG	129
S.rigida	ATCCGAACCTTATCGCCTTTGTCGGCGTG-CTTTCTGTGGTGCACCGTATGGAGCACCATG	175
S.kotschyi	ATCCGAACCTTATGTCCTT-GTCTGCGTG-CTTTCTGTGGTGTCCGTATGGAGCACCATG	128
S.aucherana	ATCCGAACCTTATCGCCTTTGTCGGCGTG-CTTTCTGTGGTGCACCGTATGGAGCACCATG	129
	* *	
S.armeniaca	GATGTTTTCGTTAACAACCTTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	188
S.lacera	GACGTTTTGTTGACATTTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	192
S.tomentosa	GACGTTTTGCTGACAATCTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	187
S.latifolia	GACGTTTTGCTGACAATCTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	187
S.sosnowskyi	GACGTTTTGCTGACAATCTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	187
S.hieraciifolia	GACGTTTTGTTGACAATCTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	184
S.parviflora	GACGTTTTGTTGACAATCTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	184
S.pygmaea	AATGTTACGCTTACAAGTTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	189
S.rigida	AATGTTACGCTTACAAGTTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	235
S.kotschyi	AATGTTATGCTTACAAGTTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	188
S.aucherana	AATGTTATGCTTACAAGTTAACAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAA	189
	* *	
S.armeniaca	AAGAAGGGCGTGCCCCGTTGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTAG	248
S.lacera	AAGAAGGGCGTGCCCCGTTGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTGG	252
S.tomentosa	AAGAAGGGTGCGTCTCGTTTTGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTCT	247
S.latifolia	AAGAAGGGTGCGTCTCGTTTTGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTCT	247
S.sosnowskyi	AAGAAGGGTGCGTCTCGTTTTGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTCT	247
S.hieraciifolia	AAGAAGGGTGCGTCTCGTTTTGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTCT	244
S.parviflora	AAGAAGGGTGCGTCTCGTTTTGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTCT	244
S.pygmaea	AAGAAGCAAGCGTCTCTTTAGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTGG	249
S.rigida	AAGAAGCAAGCGTCTCTTTAGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTGG	295
S.kotschyi	AAGAAGCAAGCGTC-CTTTTAGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTGG	247
S.aucherana	AAGAAGCAAGCGTCTCTTTAGCCCCGTTTCGCGGTGTGCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTGG	249
	***** *	
S.armeniaca	AAACACA--AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCAGCATCGATGAAGAACGTAG	306
S.lacera	AAACACA--AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCAGCATCGATGAAGAACGTAG	310
S.tomentosa	AAAAATA--AATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCAGCATCGATGAAGAACGTAG	305

<i>S. latifolia</i>	AAAAATA--AATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	305
<i>S. sosnowski</i>	AAATATATAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	307
<i>S. hieraciifolia</i>	AAAAATA--AATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	302
<i>S. parviflora</i>	AAAAATA--AATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	302
<i>S. pygmaea</i>	AATCACA--AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	307
<i>S. rigida</i>	AATCACA--AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	353
<i>S. kotschy</i>	AATCACA--AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	305
<i>S. aucherana</i>	AATCACA--AACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAG	307
** * * ** *****		
<i>S. armeniaca</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	366
<i>S. lacera</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	370
<i>S. tomentosa</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	365
<i>S. latifolia</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	365
<i>S. sosnowski</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	367
<i>S. hieraciifolia</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	362
<i>S. parviflora</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	362
<i>S. pygmaea</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	367
<i>S. rigida</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	413
<i>S. kotschy</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	365
<i>S. aucherana</i>	CAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTGAAACGCA	367

<i>S. armeniaca</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	426
<i>S. lacera</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	430
<i>S. tomentosa</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	425
<i>S. latifolia</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	425
<i>S. sosnowski</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	427
<i>S. hieraciifolia</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	422
<i>S. parviflora</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	422
<i>S. pygmaea</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	427
<i>S. rigida</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	473
<i>S. kotschy</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	425
<i>S. aucherana</i>	AGTTGCGCCCAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGC	427

<i>S. armeniaca</i>	CTCC-CCCATC-CATCCTTAGAGATGATTTTATCGGGGCGTAGATTGGCCTCGTGTGC	484
<i>S. lacera</i>	CTCC-CCCATC-CATCCTTAGAGATGATTTTATCGGGGCGTAGATTGGCCTCGTGTGC	488
<i>S. tomentosa</i>	CTCC-CCCATG-TACCTAATCAGGATGCATGTTGTTGGGGGCGGAGATTGTCCTCTGTGC	483
<i>S. latifolia</i>	CTCC-CCCATG-TACCTAATCAGGATGCATGTTGTTGGGGGCGGAGATTGTCCTCTGTGC	483
<i>S. sosnowski</i>	CTCC-CCCATA-TACCTAATCAGGATGCATGTTGTTGGGGGCGGAGATTGTCCTCTGTGC	485
<i>S. hieraciifolia</i>	CTCC-CCCATG-TACCTAATCAGGATGCATGTTATGGGGGCGGAGATTGTCCTCTGTGC	480
<i>S. parviflora</i>	CTCC-CCCATG-TACCTAATCAGGATGCATGTTATGGGGGCGGAGATTGTCCTCTGTGC	480
<i>S. pygmaea</i>	CTCCACCCATGTCTTCCATCTGGATGCATGGAGTTGGGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGC	487
<i>S. rigida</i>	CTCCACCCATGTCTTCCATCTGGATGCATGGAGTTGGGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGC	533
<i>S. kotschy</i>	CTCCACCCATGTATTCATTTGTTGGATGCATGGAGTTGGGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGC	485
<i>S. aucherana</i>	CTCCACCCATGTCTTCCATCTGGATGCATGGAGTTGGGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGC	487
*** *		
<i>S. armeniaca</i>	TCT-AGGCGTGCTTGGCCCAAACACGAGTCTCCTTC--GGTGGAT-GCAC-GACTAG-T	537
<i>S. lacera</i>	TCT-AGGCGTGCTTGGCCCAAACACGAGTCTCCTTC--GGTGGAT-GCAC-GACTAG-T	546
<i>S. tomentosa</i>	TTA-TGGCGCGGTTGGTCCAAACCTAAGTCCCCTGC--GGTGGAT-GCAC-GACAAG-T	536
<i>S. latifolia</i>	TTA-TGGCGCGGTTGGTCCAAACCTAAGTCCCCTGC--GGTGGAT-GCAC-GACAAG-T	536
<i>S. sosnowski</i>	TTA-TGGCGCGGTTGGTCCAAACCTAAGTCCCCTGC--GGTGGAT-GCAC-GACAAG-T	538
<i>S. hieraciifolia</i>	TTA-TGGCGCGGTTGGTCCAAACCTAAGTCCCCTGC--GGTGGAT-GCAC-GACAAG-T	533
<i>S. parviflora</i>	TTA-TGGCGCGGTTGGTCCAAACCTAAGTCCCCTGC--GGTGGAT-GCAC-GACAAG-T	533
<i>S. pygmaea</i>	TCTCAGGTGCGGTTGGCTTAAACACGAGTCCCCTATT--GGTGGAT-GCAT-GGCTAG-T	542
<i>S. rigida</i>	TCTCAGATGCGGTTGGCTTAAACACGAGTCCCCTATT--GGTGGAT-GCAT-GGCTAG-T	588
<i>S. kotschy</i>	TCTCAGGTGCGGTTGGCTTAAACACGAGTCCCCTATT--GGTGGAT-GCAT-GGCTAG-T	542
<i>S. aucherana</i>	TCTCCGTTGCGGTTGGCTTAAACACGAGTCCCCTATT--GGTGGAT-GCAT-GGCTAG-T	542
* *		
<i>S. armeniaca</i>	GGTGGTTGAA-TAGGCCCTTGTCTTTTGT-----CGTGTGCCGTGTGC---TGC--AAGG	586
<i>S. lacera</i>	GGTGGTTGAA-TAGGCCCTTGTCTTTTGT-----CGTGTGCCGTGTGC---TGC--AAGG	606
<i>S. tomentosa</i>	GGTGGTTTGA-TAGGCCCTCGTCTTTCGT-----CGTGTGTGTTTCC---TGC--ATGG	585
<i>S. latifolia</i>	GGTGGTTTGA-TAGGCCCTCGTCTTTCGT-----CGTGTGTGTTTCC---TGC--ATGG	585
<i>S. sosnowski</i>	GGTGGTTTGA-TAGGCCCTCGTCTTTCGT-----CGTGTGTGTTTCC---TGC--AAGG	587
<i>S. hieraciifolia</i>	GGTGGTTTGA-TAGGCCCTCGTCTTTCGT-----CGTGTGTGTTTCC---TGC--AAGG	582
<i>S. parviflora</i>	GGTGGTTTGA-TAGGCCCTCGTCTTTCGT-----CGTGTGTGTTTCC---TGC--AAGG	582
<i>S. pygmaea</i>	GGTGGTTGAA-TAGACCCTCGTATTATGC-----TGTGTGTCTTGAAC---CGTTAGGGA	593
<i>S. rigida</i>	GATGGG-GAA-TAGACAAAATATGGGG-----GGGATAAAAATAAA---AGTTAGGCG	638
<i>S. kotschy</i>	GGTGGTTGAA-TAGACCCTCGTATTATGC-----TGTGTGTCTTGAAC---CGTTAGGGA	593
<i>S. aucherana</i>	GGTGGTTGAA-TAGACCCTCGTATTATGC-----TGTGTGTCTTGAAC---CGTTAGGGA	593
* *		

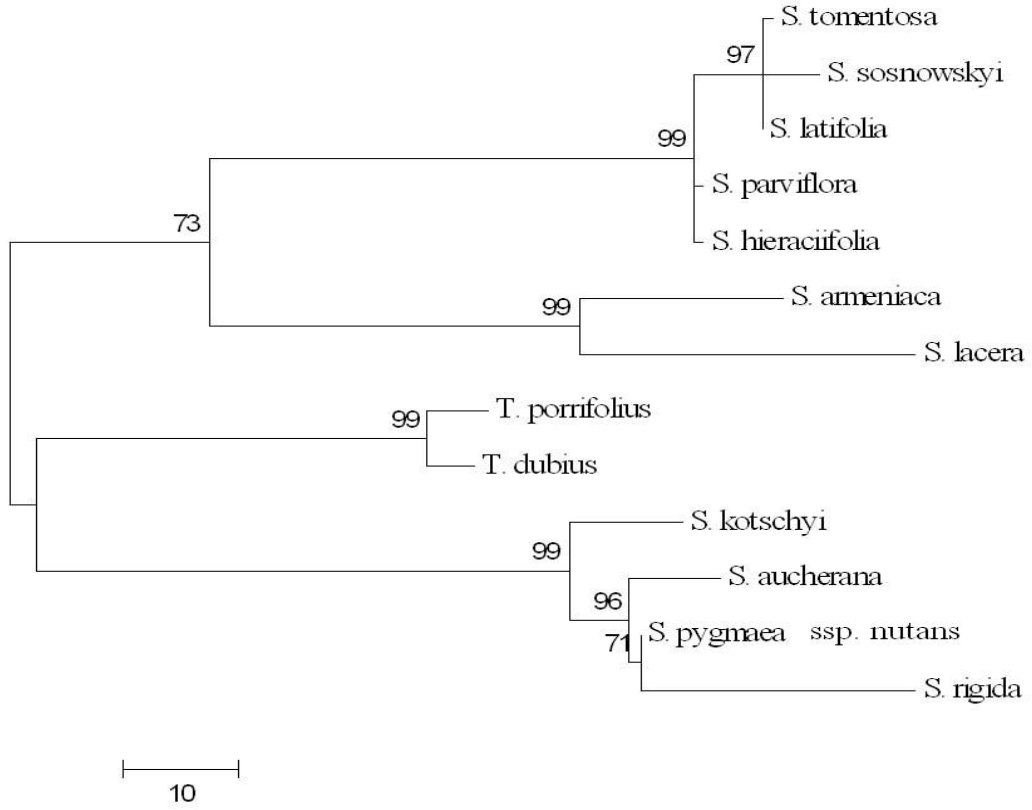
S.armeniaca GAACCT--CTTTTATTA---GACCCCAATGCATC--TTCCTAT---GACGA----TGTTT 632
S.lacera GAACCTTCCTTTTTATTAAGAGACCCCATGGCATCCTTTCCTATATGGACGAATAGTGTTT 666
S.tomentosa TAATCT----TGTACTAA--GACCCTAATGCATT--GTCTTAT---GATGA----TGCTT 630
S.latifolia TAATCT----TGTACTAA--GACCCTAATGCATT--GTCTTAT---GATGA----TGCTT 630
S.sosnowskyi TAATCT----TGTACTAA--GACCCTAATGCATT--GTCTTAT---GATGA----TGCTT 632
S.hieraciifolia TAATCT----TGTACTAA--GACCCTAATGCATT--GTCTTAT---GATGA----TGCTT 627
S.parviflora TAATCT----TGTACTAA--GACCCTAATGCATT--GTCTTAT---GATGA----TGCTT 627
S.pygmaea AGCCCT----CGTATGAG---ACCCCAATGCGTC--GTCTTGC---GACGA----AGCTT 637
S.rigida CGGCCT----CGTATATA---GGGGGGGGTGGG--GTATAAC---AA--G---AGCCG 680
S.kotschy AGCCCT----CGTATGAG---ACCCCAATTCGTC--GTCTAGC---GACGA----AGCTT 637
S.aucherana AGCCTT----CGTATGAG---ACCCCAATGCGAT--GACTTGC---CATGA----AGATT 637
* ** *

S.armeniaca CGACCG--CGACCCC--AGGTCAGGC--GGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAG 688
S.lacera CGACCCGCGACACCCAGGTCAAGCCGGGACT----- 698
S.tomentosa CGACT----- 635
S.latifolia CGACT----- 635
S.sosnowskyi CGACT----- 637
S.hieraciifolia CGACTG--CGA----- 636
S.parviflora CGACTG--CGACCCC--AGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAG 683
S.pygmaea CGAC-C----- 642
S.rigida CGGC-GCATCTCAAGGCGGGGATGACCTAACGGCT----- 714
S.kotschy CGAC-C----- 642
S.aucherana CGACCGGAC----- 647
** *

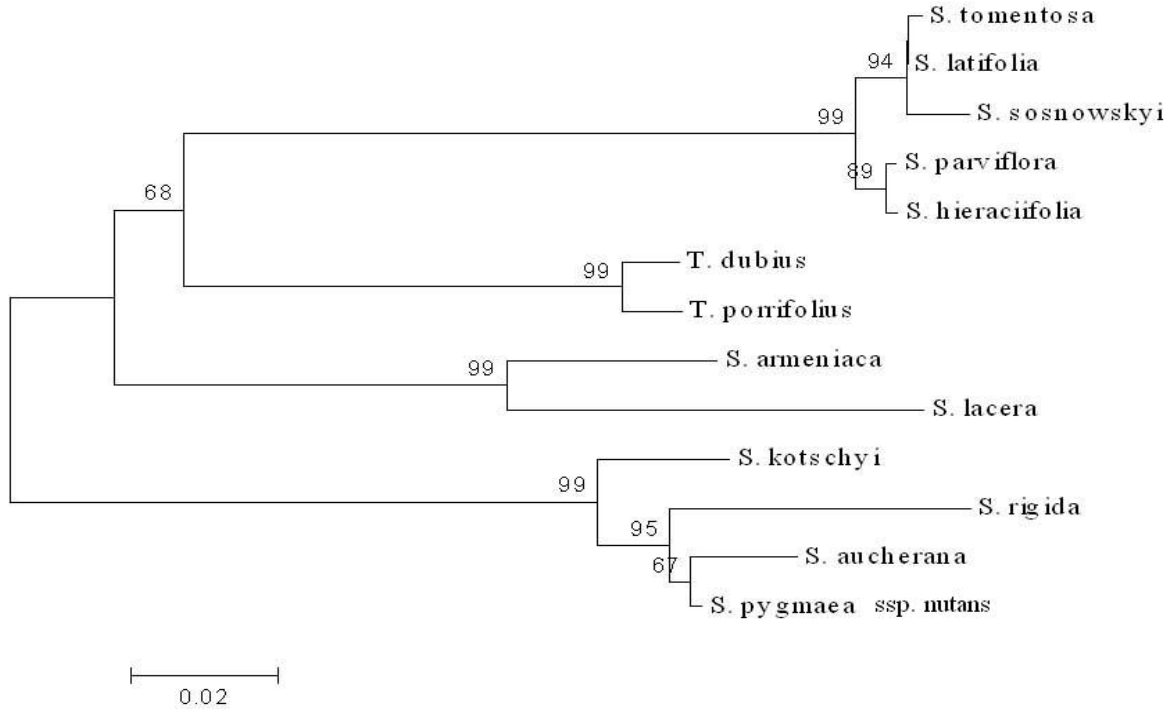
S.armeniaca CGGAGGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACC----- 731
S.lacera -----
S.tomentosa -----
S.latifolia -----
S.sosnowskyi -----
S.hieraciifolia -----
S.parviflora CGGAGGAAATCGAATTCGCGGCCGCCATGGCGGCGGGAGCATGCGA----- 732
S.pygmaea -----
S.rigida -----
S.kotschy -----
S.aucherana -----

Not: *'ler Örneklerde Baz Çakışma Dizilerini Göstermektedir

ITS bölgesinin tamamı alınarak yapılan maksimum parsimoni (MP) ağacında örneklerin temelde iki gruba ayrıldığı görülmektedir (Şekil 19). *S. kotschyi*, *S. aucherana*, *S. pygmaea* subsp. *nutans*, *S. rigida* bir grup oluştururken, *S. tomentosa*, *S. latifolia*, *S. sosnowskyi*, *S. hieraciifolia*, *S. parviflora*, *S. armeniaca* ve *S. lacera* taksonlarında başka bir grup oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 19. ITS Bölgesinin MEGA programıyla yapılmış maksimum parsimoni analizi



Şekil 20. ITS Bölgesinin MEGA programıyla yapılmış Neighbour joining Analizi

ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) bölgesinin tamamı alınarak yapılan Neighbour joining ağacında örneklerin temelde iki gruba ayrıldığı görülmektedir (Şekil 20). *S. armeniaca*, *S. lacera*, *S. kotschy*, *S. rigida*, *S. aucherana* ve *S. pygmaea* subsp. *nutans* bir grup oluştururken, *S. tomentosa*, *S. latifolia*, *S. sosnowskyi*, *S. parviflora*, *S. hieraciifolia* taksonlarında başka bir grup oluşturduğu görülmüştür. Dış grup olarak seçilen *Trogopogon* türleri ise her iki ağaç topolojisinde de oluşan iki grup arasında kaldığı tespit edilmiştir. İki ağaç topolojisinde de oluşan gruplar arasında kalmış olması *Scorzonera* ve *Trogopogon*'un ortak ataya sahip olmalarına ve bu iki cinsin ayrılmasının üzerinden çok uzun süre geçmemesine bağlıdır.

Tablo 7. Kimura'nın Pair-Wise Benzemezlik Tablosu

S._tomentosa																			
S._latifolia	0,002																		
S._sosnowskyi	0,011	0,009																	
S._parviflora	0,014	0,013	0,022																
S._hieraciifolia	0,014	0,013	0,022	0,004															
S._armeniaca	0,192	0,190	0,194	0,178	0,178														
S._lacera	0,215	0,213	0,218	0,201	0,201	0,085													
T._dubius	0,166	0,164	0,173	0,166	0,166	0,170	0,208												
T._porrifolius	0,166	0,164	0,173	0,166	0,166	0,170	0,210	0,016											
S._aucherana	0,233	0,231	0,241	0,234	0,234	0,201	0,222	0,189	0,192										
S._pygmaea	0,221	0,218	0,228	0,221	0,221	0,187	0,220	0,175	0,173	0,016									
S._rigida	0,257	0,254	0,265	0,257	0,257	0,221	0,248	0,212	0,209	0,059	0,044								
S._kotschy	0,218	0,215	0,225	0,218	0,218	0,200	0,234	0,180	0,184	0,042	0,029	0,075							

5. TARTIŞMA

Scorzonera cinsine ait bazı taksonların filogenetik ilişkilerinin incelendiği bu araştırmada morfolojik ve moleküler incelemeler yapılmıştır. Morfolojik incelemelerde kök, gövde, yaprak ve çiçek karakterleri üzerinde durulmuş moleküler incelemeler ise ITS baz sıralarına göre yapılmıştır. Çalışmada 11 *Scorzonera* taksonu ele alınmıştır bunlardan dört tanesi endemiktir.

Scorzonera cinsi başlangıçta *Podospermum* ile birlikte aynı cins altında incelenmiştir (De Candolle, 1805). Kuthatheladze (1978) ise *Podospermum* ile *Scorzonera*'yı farklı birer cins olarak ele almışlardır. Yine son yıllarda ITS baz sıraları analizlerine göre yapılan çalışmalarda *Scorzonera* ile *Podospermum* cinslerinin birbirlerinden çok iyi ayrıldığı belirtilmiştir (Madrodiv ve ark., 2004). Günümüzde *Scorzonera* bağımsız bir cins olarak incelenmektedir. Ancak morfolojik özellikleri yönünden kendisine benzer olan *Tragopogon* cinsi mensupları ile sistematik açıdan karıştırılmaktadır (Davis, 1988). Filleri uzunluklarının eşit olmayışı ve akenlerinde gaga bulundurmaması yönüyle *Tragopogon*'dan ayrılmaktadır.

Son yıllarda rDNA'nın ITS bölgelerine dayalı filogenetik analizler taksonomik pozisyonun ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Bu analizler aynı zamanda taksonomik açıdan çok karmaşık olan birçok cinsin, türün veya fazla sayıda takson ihtiva eden grupların filogenetiğinin yeniden inşası çalışmalarında da kullanılmaktadır (Madrodiv ve ark., 2005).

Scorzonera taksonlarının teşhisinde özellikle kök yapısı, gövde formu ve dallanma özellikleri, yaprak karakterleri, tüylenme ve tüy tipleri ile çiçek özellikleri ve aken morfolojisi büyük önem taşımaktadır (Makbul, 2006). İncelenen *Scorzonera* örneklerini morfolojik olarak skeyp, yarı gövdemsi ve gövdemsi olarak üç grupta toplamak mümkündür. Aynı grup içerisinde yer alan örnekleri birbirinden ayırt etmek oldukça zordur. *S. pygmaea* ssp. *nutans* ve *S. rigida* skeyp formda bulunan örneklerdir. *S. pygmaea* ssp. *nutans*'ın boyu 19 cm'den kısa, yaprakları lanat ve aken boyu 2-5 mm arasında, *S. rigida*'nın boyu 19 cm'den uzun, yaprakları pubescent ve aken boyu 5-9 mm'dir. Bu morfolojik özellikler bakımından iki taksonu biribirinden ayırmak mümkündür.

S. armeniaca, *S. parviflora*, *S. hieraciifolia*, *S. lacera*, *S. aucherana* ve *S. kotschy* yarı gövdemsi veya gövdemsi formda bulunan bitkilerdir. Bu grupta yer alan *S. lacera* mor ligulalara sahip olmasıyla *S. parviflora* ise kök şeklinin rizom, gövdesinin ise içi boş olması ile diğer taksonlardan kolaylıkla ayırt edilebilir. *S. armeniaca* aken boy uzunluğu ve akenlerinin tabanında şişkinlik olması ile diğer türlerden ayrılır. *S. armeniaca* çalışılan taksonlar arasında en uzun akenlere sahip taksondur. *S. kotschy* ve *S. hieraciifolia* ise birbirinden genç kapitulum boyu ve akenlerinin oluklu olup olmamasına göre ayrılırlar. *S.*

kotschyi' nin genç kapitulum boyu 15-16 cm'dir, akenleri sapsız ve oluksuzdur. *S. hieraciifolia*'nin genç kapitulum boyu 10-14 cm, akenleri saplı ve olukludur. Bu morfolojik karakterler iki takson arasındaki sistematik problemin çözümüne katkı sağladığını söyleyebiliriz.

Gövdemsi formada ise *S. latifolia*, *S. sosnowskyi*, *S. tomentosa*, bulunmaktadır ve birbirine en çok benzeyen üç türdür. Bu üç türün habitatında birbiri içerisine girmiş olması beraberinde bir takım sıkıntıları da getirmektedir. *S. tomentosa* diğerlerine göre daha kısa boylu, yaprakları daha geniş, pappusları kahverengimsi ve akenleri tüysüzdür. *S. sosnowskyi* ile *S. latifolia* birbirlerine çok benzerler. *S. sosnowskyi* ile *S. latifolia* aynı habitatı paylaşırlar. Aralarındaki tek fark kapitulum sayısıdır. *S. latifolia*, *S. sosnowskyi*'ye göre daha fazla kapitulum sahiptir. *S. latifolia*'nin kapitulum sayısı 50–100 arasında değişkenlik gösterirken, *S. sosnowskyi*'nin kapitulum sayısı 10-20 arasında değişkenlik göstermektedir.

Araştırma incelenen 11 *Scorzonera* taksonu morfolojik incelemeler sonucunda tespit edilen değişkenler kullanılarak UPGMA ile gruplandırılmıştır (Şekil 17). Morfolojik değişkenler kullanılarak yapılan kümeleme analizinde incelenen 11 taksonun iki ana gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu iki gruptan birincisini *S. tomentosa*, *S. sosnowskyi*, *S. latifolia* oluştururken ikinci grupta *S. armeniaca*, *S. kotschyi*, *S. parviflora*, *S. pygmaea* ssp. *nutans*, *S. rigida*, *S. hieraciifolia*, *S. lacera* ve *S. aucherana* bulunmaktadır. Bu dendrograma göre morfolojik özelliklere göre *S. tomentosa* ile *S. sosnowskyi* ve *S. pygmaea* ssp. *nutans* ile *S. rigida* taksonları birbirine en yakın taksonlar olarak tespit edilmiştir. Yine bu fenograma göre *S. armeniaca*'nın *S. tomentosa* ve *S. sosnowskyi*'ye olan uzaklığı en fazla olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Türkiye Florası (Chamberlain, 1975) ile karşılaştırıldığında karşımıza benzer sonuçlar çıkmaktadır.

ITS dizin analizleri sonucunda elde edilen Maksimum Parsimoni ağacında 11 örneğin temelde iki grup oluşturduğu görülmektedir. *S. kotschyi*, *S. aucherana*, *S. pygmaea* ssp. *nutans* ve *S. rigida* bir grup oluştururken, *S. tomentosa*, *S. latifolia*, *S. sosnowskyi*, *S. hieraciifolia*, *S. parviflora*, *S. armeniaca* ve *S. lacera* ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir (Şekil 19). Neighbour joining ağaç topolojisinde de örneklerin iki grup oluşturduğu görülmektedir (Şekil 20). *S. kotschyi*, *S. aucherana*, *S. pygmaea* ssp. *nutans*, *S. rigida*, *S. armeniaca* ve *S. lacera* bir grup oluştururken, *S. tomentosa*, *S. latifolia*, *S. sosnowskyi*, *S. hieraciifolia*, *S. parviflora*, taksonlarının başka bir grup oluşturduğu görülmüştür. İki ağaç topolojisinde oluşan sonuçlar birbirleri ile paralellik göstermektedir.

Dış grup olarak seçilen *Scorzonera* cinsine en yakın cins olan *Tragopogon*'un her iki ağaç topolojisinde de oluşan iki grup arasında kalmıştır. Bizim çalışmamızda dış grup olarak

seçilen *Tragopogon*'un ITS baz dizilerine göre iki grup arasında kalması bu iki cinsin ortak bir ataya sahip olması ve birbirlerinden ayrılma zamanı çok uzun süreye dayanmadığından dolayı olduğu söylenebilir. Yine *Scorzonera*'nın polifilitik olmasından dolayı ağaçlardaki kollardan birine *Tragopogon* bağlanabilir.

Çalışılan *Scorzonera* örneklerinin ITS bölgesinin toplam uzunluğunun 635–741 bp arasında değiştiği ve türler arasında sabit olmadığı tespit edilmiştir. Baz varyasyonunun ise % 0,2–26,5 arasında olduğu belirlenmiştir. ITS baz sırasının % 26,5'e varan oranda varyasyon göstermesi, çalışılan bazı taksonların sistematik ayırımına önemli katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. En az farkın % 0,2 oranla aynı grupta yer alan *S. tomentosa* ve *S. latifolia* arasında olduğu görülmektedir. Bu taksonlara en uzak tür ise % 26,5 oranında baz farkıyla *S. rigida*'dır. ITS bölgelerinde % 0,2'lik oranda düşük bir farkın olması bu türler arasındaki sistematik problemin çözümüne yardımcı olmadığını gösterir. *Scorzonera* cinsi içerisinde bulunan taksonların filogenetik ilişkilerinin incelendiği bir araştırma da (Owen ve ark., 2006) ITS baz sıralarının bazı türlerin ayırımında etkili olduğu fakat bazı türlerde yüksek oranda benzerlik göstermesinden dolayı sistematik problemlerine katkı sağlamadığı belirtilmiştir. Türkiye florasında da (Chamberlain, 1975) *S. tomentosa* ve *S. latifolia*'nın hibrit olabileceği düşünülmüştür. *Scorzonera* ile ilgili yapılan başka bir çalışmada (Makbul, 2006) yine bu iki türün morfolojik ve anatomik özelliklerinin birbirine çok yakın olduğu belirtilmiştir. *S. tomentosa*, *S. sosnowskyi* ve *S. latifolia* hem morfolojik verilere hem de ITS bölgeleri ağaç topolojisine göre büyük oranda benzerlik göstermiş olması bu türler arasında ki ayırımında moleküler verilerin morfolojik karakterleri desteklediği görülmüştür. Aynı türler üzerine yapılmış olan bir çalışmada (Makbul, 2006) morfolojik karakterlerin anatomik karakterlere göre sistematik probleme daha çok katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Türkiye florasında da (Chamberlain, 1975) bu türlerin birbirine çok yakın türler olduğu belirtilmiş ve bu türler için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

ITS verilerine göre oluşturulan dendogram incelendiğinde ikinci grupta *S. kotschyi*, *S. aucherana*, *S. pygmaea* ssp. *nutans*, *S. rigida*, *S. armeniaca* ve *S. lacera*'nın yer aldığı görülür. Taksonlar arasında Kimura'nın pair-wise (Tablo 7) benzemezlik metoduna göre, *S. rigida*'nın en düşük varyasyon gösterdiği *S. pygmaea* ssp. *nutans* ile arasında % 4,4'lük baz farklılığın olması bu iki tür arasında sistematik ayırma gidilebileceği söylenebilir. Yapılan bir çalışmada (Madrodiv ve ark., 2004) ITS baz sıralarına göre oluşturulan dendogramda *S. latifolia* ve *S. rigida* aynı grupta yer aldığı belirtilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda *S. latifolia* ve *S. rigida* farklı grupta yer almış ve birbiri ile tamamen ayrıldığı görülmüştür. İki çalışma arasındaki bu fark, zamanla taksonlarda insersiyonların veya delesyonların

oluşmasından kaynaklanabilir. İnsersiyon ve delesyonların meydana gelmesi taksonlar arasında baz farklılığının artmasına neden olduğu için bu iki takson arasında zamanla insersiyon veya delesyonun meydana gelmiş olması düşünülmektedir.. Aynı habitatı paylaşan *S. hieraciifolia* ve *S. parviflora* morfolojik karakterlere göre olan ağaç topolojisinde birbirine çok uzak türler olduğu tespit edilmiştir. Ancak ITS baz sıraları ağaç topolojilerinde ve Kimura'nın pair wise benzemezlik metoduna göre birbirlerine yakın türler olarak görülmüştür. Bu türlerin morfolojik yapılarının farklı olması fakat ITS bölgelerinin birbirine çok yakın olması aynı habitatı paylaşmalarından dolayı aynı bazlarda meydana gelebilecek mutasyonlara maruz kalmalarından kaynaklanabilir.

Morfolojik verilere dayalı UPGMA analizi sonucunda aynı grupta bulunan *S. lacera* ve *S. hieraciifolia*, ITS baz dizileri sonucu elde edilen Neighbour Joining ağaç topolojisinde farklı grup oluşturmuş ve Clustal W programından % 74 benzerlik göstermiştir. Bu sonuçlara göre ITS baz dizilerinin birbirlerinden tamamen farklı olduğu ve moleküler analizin bu iki taksonu ayırımında morfoloji karakterlere göre daha etkili olduğu söylenebilir. Asteraceae familyasında bulunan *Robinsonia* cinsindeki türlerin ITS dizisine dayalı filogenesinin incelendiği bir araştırmada ITS baz sıralarının türler üzerinde yapılan morfolojik çalışmalarla paralellik gösterdiği vurgulanmıştır (Sang ve ark., 1995). Ancak bu iki tür için moleküler verilerin morfolojik verileri desteklemediği görülmüştür. Yine Asteraceae familyasındaki başka bir tribus olan Cardueae'nin filogenetik analizinde ITS baz sırasının varyasyon göstermediği yani tribusun sistematik problemini çözmede yardımcı olmadığı tespit edilmiştir (Susana ve ark., 1995).

S. armeniaca'nın morfolojik karakterlere göre *S. kotschy*'ye daha yakın olduğu fakat ITS bölgesi ağaç topolojisine bakıldığında ve baz farklılıklarına bakıldığı zaman birbirinden çok farklı türler olduğu görülmüştür. Clustal W programından elde edilen sonuçlarda da *S. armeniaca*'nın ITS baz sırasının *S. kotschy*'nin baz sırasına % 81 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir bu kadar yüksek oranda baz farkının olması iki türü birbirinden ayırmada ITS baz sıralarının morfolojik karakterlere göre daha etkili olduğu söylenebilir. Yine *S. armeniaca*'ya morfolojik olarak yakın diğer türler arasındaki benzerliğin ITS ağaç topolojisinde ve baz farklılık oranında rastlanmamış olması ITS baz dizisinin *S. armeniaca*'yı diğer türlerden ayırmada büyük rolünün olduğunu göstermektedir. Makbul (2006) yaptığı çalışmada *S. armeniaca*'nın morfolojik olarak *S. cana* var. *jacquiniana*'ya, anatomik değişkenlere göre ise *S. suberosa* ssp. *suberosa* ile benzerlik gösterdiğini belirtmiştir.

S. aucherana morfolojik analiz sonucu tamamen farklı bir dal oluşturmuş ve diğer taksonlardan kolaylıkla ayrılmıştır. ITS baz dizi analizinde ise *S. rigida* ve *S. pygmaea* ssp.

nutans ile çok yakın grup oluşturmuştur. Ağaç topolojisinde yakın grup oluşturmalarına rağmen Kimura'nın pir-wise benzemezlik metodundaki baz varyasyonları ile birbirlerinden ayrıldığı görülmektedir.

Morfolojik ve moleküler veriler kullanılarak gerçekleştirilen analizler ışığında sonuçların birbirlerine bazı taksonlar için benzediği bazıları için ise benzemediği görülmektedir. Örneğin *S. tomentosa*, *S. sosnowskyi* ve *S. latifolia* hem moleküler hem de morfolojik verilere göre aynı grupta bulunmakta fakat *S. lacera* ve *S. hieraciifolia* morfolojik ağaç topolojisinde aynı grup iken moleküler ağaç topolojisinde tamamen ayrılmaktadırlar. Buna göre elde edilen moleküler sonuçların taksonların ayırımında morfolojik verilere önemli katkılar sağladığını söyleyebiliriz. Yani moleküler veriler *Scorzonera* taksonlarındaki varyasyonu açıklamada etkin rol oynamaktadır. Özellikle morfolojik veriler bazı taksonları ayırmada etkili olurken bazılarında ise moleküler veriler daha etkilidir. İkisi birlikte düşünüldüğünde taksonomik olarak etkili bir ayırım söz konusudur. Fakat bazı taksonlar için morfolojik değişkenler tek başına kullanıldığında varyasyonun önemli bir kısmını açıklayabildiğini de görmekteyiz. Makbul (2006) tarafından yapılan bir çalışmada morfolojik karakterlerin *Scorzonera* cinsi içindeki varyasyonu açıklamakta önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Anatomik karakterlerin de morfolojik karakterler kadar olmasa da varyasyonu belirleme de önemli bir rol oynadığını söylemiştir.

Bu sonuçlara göre hem morfolojik karakterler hemde moleküler veriler *Scorzonera* cinsi içerisindeki varyasyonu açıklamada büyük katkı sağlamıştır. ITS analizlerine dayalı ağaçta araştırmaya konu olan taksonlar arasındaki filogenetik ilişki ileri derecede ortaya konulmuştur. İki analizin bazı yönleri ile benzerlik göstermesi ITS baz analizinin morfolojiye katkıda bulunabileceğini göstermektedir

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Scorzonera* cinsine ait 11 taksonun nrDNA ITS bölgesi araştırılmıştır. Araştırmanın gerçekleştirildiği taksonlara ait nrDNA ITS bölgelerinin toplam uzunluğunun 635 – 741 bp arasında değişim gösterdiği bulunmuştur. Örneklerin birbirlerine benzerlik oranlarının da % 73,5–99,8 arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu bölgedeki G+C içeriği % 51,3-55,9 arasındadır.

Literatüre göre bu cinsin Türkiye taksonları ile ilgili olarak, daha önce yapılmış böyle bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla doğal olarak yetişen 11 *Scorzonera* taksonuna ait ITS baz sıraları ilk kez bu araştırma ile ortaya konulmuştur. Bu çalışmada kullanılmak üzere toplanmış *Scorzonera* taksonlarına ait örnekler teşhisleri yapıldıktan sonra herbaryum örneği haline getirilmiş, RUB ve KTUB herbaryumlarına kazandırılmıştır.

Çalışılan taksonlardan *S. aucherana*, *S. hieraciifolia*, *S. tomentosa* ve *S. pygmaea* ssp. *nutans* endemiktir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile gen kaynakları için önemli bir veri olan endemik *Scorzonera* türlerine ait ITS baz dizini ilk kez elde edilmiştir.

Yapılan moleküler ve morfolojik analizler sonucunda oluşturulan dendogramların genel olarak birbirine benzer sonuçlar ortaya koyduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, daha önce *Scorzonera* türleri ile yapılan sistematik çalışmaları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

cpDNA üzerinde bulunan *trnT*-L ve *trnL*-F intronlarının sistematik çalışmalarda ITS gibi yaygın olarak kullanıldığı ve açıklayıcı çözümler sunduğu bazı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Yine cpDNA üzerinde bulunan *matK* geninin sekans analizi yapılarak önemli bir varyasyonun bulunup bulunamayacağı araştırılabilir. Bulunacak sonuçların ITS ve morfolojik veriler ile uygunluk sağlayıp sağlayamayacağı bu şekilde belirlenebilir.

Türkiye’de yayılış gösteren çoğu *Scorzonera* türlerinin kromozom sayıları henüz belirlenmemiştir. Bu cinsin Türkiye’de yayılış gösteren türlerinin sistematik problemlerinin çözümü için, morfolojik ve moleküler çalışmaların yanı sıra anatomik, karyolojik ve palinolojik çalışmalarda yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adler, W., Oswald, K. ve Fischer, R., 1994. Exkursionsflora von Österreich. Ulmer, Stuttgart.
- Appels, R., Dvorak, J. 1982. The wheat ribosomal DNA spacer region its structure and variation in populations among species. *Theoretical and Applied Genetics*, 63: 337-348.
- Appels, R., Honeycutt., R .L., 1986. rDNA: evolution over a bilion years. In *DNA Systematics, Vol. II, Plants*, ed. S. K. Dutta, pp. 81-135. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Bahadır, Ö., 2009. Türkiye’de Yetişen Bazı *Scorzonera* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter J. M., Wojciechowski, M. F., Campell, C. S. and Donoghue, M. J., 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 250-272.
- Baldwin, B. G., and Markos, S., 1999. Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae), *Molecular Phylogeny evolution*, 10: 449-463.
- Baldwin, B. G., Wessa, B. L. ve Panera, J. L., 2002. Nuclear rDNA evidence for major lineages of helenioid Heliantheae (Compositae), *Syst. Bot.*, 27, 161- 198.
- Baytop, T., 1994. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları, Türk Kültür Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Ankara.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri :236-237.
- Bobola, M. S., Smith, D. E., Klein, A. S., 1992. Five major nuclear ribosomal repeats represent a large and variable fraction of the genomic DNA of *Picea rubens* and *P. mariana*. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 125.137.
- Boduroğlu, D., 2008. Türkiye *Scorzonera* L. Cinsinde Yer Alan Bazı Taksonların Sitogenetik Analizi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Bremer, K., 1994. *Asteraceae, Cladistics and classification*, Timber Press, Portland.
- Bremer, K., Bremer, B., Thulin, M., 2003. *Introduction to Phylogeny and Systematics of Flowering Plants*, Upsala Univ, 33-2.

- Cassini, A., H. G., 1826. In Dict. Sc. Nat. Strasbourg, 1- 48
- Chamberlain, D. F., 1975. *Scorzonera* L. In: "Flora of Turkey and East Aegean Island, ed. P.H. Davis, Edinburg, 5: 632-657.
- Chater, A. O., 1976. *Scorzonera* L. In: "Flora Europaeae" Cambridge, 4:317 – 322.
- Cronquist, A., 1968. The evolution and Classification of Flowering Plants, London.
- Davis, P. H., Mill., R. R., Tan, K., 1988. *Scorzonera* L. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands (suppl. I). Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. (eds.). Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 10: 169-170.
- De Candolle, A. P., 1805. Flora Francaise, Paris, 4: 61.
- Dinç, M., Duran, A., Martin, E., 2007. Rediscovery of the poorly known *Scorzonera argyria* Boiss., and its relationships in Turkey, International Symposium 7th Plant Life of South West Asia (7 th Ploswa), Anadolu University, Eskişehir.
- Douglas, J., 2001. *Scorzonera hispanica* – a European vegetable. Ruakura Agricultural Centre, New Zeland.
- Dumortier B. C., 1827. Florula Belgica, Operis Majoris Prodromus. Stammaeia, Tornaci Nerviorum.
- Duran, A., Hamzaoglu, E., 2004. A new species of *Scorzonera* L. (Asteraceae) from South Anatolia, Turkey. *Biologia Bratislava*, 59 (1): 47-50.
- Duran, A., Sagiroglu, M., 2002. A New species of *Scorzonera* L. (Asteraceae) from Anatolia, Turkey. *Nord. J. Bot.*, 22 (3): 333-336.
- Duran, A., 2002a. A new species of *Scorzonera* L. (Asteraceae) from Central Anatolia, Turkey. *Israel J. Plant Sci.*, 50: 155-159.
- Duran, A., 2002b. A new species of *Scorzonera* L. (Asteraceae) from Anatolia, Turkey. *Pak. J. Bot.*, 34 (3): 385-389.
- Endlicher, S., L., 1838. *Genera plantarum*, Vindobonae, 1836-1840.
- Erlich, H. A., 1989. *PCR Technology*. Stockton Press. N.Y.
- Felsenstein, J., 1987. Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Moleculer Evolution*, 26:123-31.
- Freeman, S. and Herron, J. C., 1999. *Evrimsel Analiz*. Çıplak, B., Basıbüyük. H. H., Karaytug. S. ve Gündüz. 9. (eds.), Palme Yayıncılık, 28-29, 438-449.
- Friedrich, M., Tautz, D., 1995. Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods, *Nature*, 376: 165 – 167

- Govindaraju, D. R., Culli, C. A., 1992. Ribosomal DNA variation among populations of a *Pinus rigida* Mill. (pitch pine) ecosystem: I. Distribution of copy numbers. *Heredity*, 69: 133-140.
- Hamby, K. R., Zimmer, E. A., 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In *Molecular Systematics of Plants*, eds. P. Soltis, D. Soltis and J. Doyle, pp. 50- 91. Chapman&Hall, New York.
- Hamzaoğlu, E., Aksoy, A., Martin, E., Pinar, N. M. and Çölgeçen, H., 2009. A new Record for the Flora of Turkey : *Scorzonera Ketzkhoveli* Gross. (Asteraceae). *Turk. J. Bot.* 34: 57-61.
- Heitz, C., 1990. *Schul-und Exkursionsflora für die Schweiz*, 19. Aufl. Schwabe, Basel.
- Hwang, M Y., Yu, H S., Kim, T O., Yun, H C., Kim, T H., Kong, H H. and Chung, D., 1999. Phylogenetic Relationships Among *Acanthamoeba* spp. Based on PCR-RFLP Analyses of Mitochondrial Small Subunit rRNA Gene. *The Korean Society for Parasitology*. 37 (3) : 181-188.
- Jones, N., Ougham. H. and Thomas, H., 1991. Markers and mapping; we are all geneticists now, *New Phytol*, 137: 165-177.
- Jorgensen, R. A. and Cluster, P. D., 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75: 1238- 1247.
- Jöger, E. J. and Werner, K., 2002. *Exkursionsflora von Deutschland*, 9. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Kamelin, R. V. and Tagev, I. U., 1986. Survey of the species of the genus *Scorzonera* (Asteraceae). *Bot. Journ.*, 71: 1672-1682.
- Kilian, N. and G. Parolly., 2002. *Scorzonera ulrichii* Parolly and N. Kilian, sp. nova.- (In: Greuter, W. and Th. Raus Ed., *Med-Checklist Notulae*, 21). *Willdenowia*, 32: 198-200.
- Klug, W. S. and Cummings, R. M., 2002. Genetik. Öner, C. (eds.), *Palme Yayıncılık*, 381-383, Ankara.
- Kuthatheladze, S H. L., 1978. Caucasian representatives of the subtribe *Scorzonerinae* Dum. Tbilisi, 1184.
- Lipschiz, S. J., 1939. *Fragmenta monographiae generis Scorzonera*, *Soc. Nat. Curiosiorum Mosquensis*, Moscow, 2: 1-165.

- Lipschiz, S. J., 1935. Fragmenta monographiae generis *Scorzonera*, Transactions of the Rubber and Guttapercha Institute, Moscow, 1: 1-164.
- Lipschiz, S. J., 1964b. *Scorzonera*. Pp. 111-115 in: Shishin, B. K. (ed.), Flora of the USSR, vol. 29. Academy of science of the U.S.R.R., Moskva-Leningrad..
- Makbul, S. 2006. Doğu Karadeniz Bölgesi *Scorzonera* L. (Asteraceae) taksonlarının morfolojik ve anatomik yönden incelenmesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Madrodiv, E. V., Edvards, C. E., Albach, D. C., Gitzendanner, M. A., Soltis, P. S., and Soltis, D., 2004. Phylogenetic Relationships in Subtribe Scorzonerinae (Asteraceae: Cichorioideae: Cichorieae) Based on ITS Sequence Data, Taxon, 53 (3): 699-712.
- Madrodiv, E. V., Tancing, M., Sherwood, A. M., Gitzendanner, M. A., Rocca, J., Soltis, P. S., and Soltis, D., 2005. Phylogeny of *Tragopogon* L. (Asteraceae) Based on Internal and External Transcribed Spacer Sequence Data, Int.J. Plant Sci., 166 (1): 117-133.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York.
- Mount, D W., 2001a. Bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,. Chapter 3. Alignment of pairs of sequences; 52-137.
- Mount, D W., 2001b. Bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,. Chapter 7. Phylogenetic prediction, 281-324.
- Nazarova, E. A., 1997. Karyosystematic investigation of the genus *Scorzonera* L. s.l. (Lactuceae, Asteraceae), Caryologia, 50, 4, 239-261.
- Owen, W. M., Damato, G., Dominicis, R. I., Salimbeni, P. and Tucci, G. F., 2006. A Cytological and Molecular Study of the Genera *Scorzonera* L. And *Podospermum* (L.) DC (Asteraceae), Caryologia, 2: 153-163.
- Palmer, J. D., 1985a. Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In Molecular Evolutionary Genetics, ed. R. J. MacIntyre, pp. 131-240. Plenum Press, New York.
- Palmer, J. D., 1985b. Comparative organization of chloroplast genomes. Annual Review of Genetics, 19: 325-354.
- Palmer, J. D., 1986. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. Methods in Enzymology, 188: 167-186.

- Palmer, J. D., 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *American Naturalist*, 130: 6- 29.
- Palmer, J. D., 1991. Plastid chromosomes: structure and evolution. In *cell Culture and somatic Cell Genetics in Plants*, Vol. 7, *The Molecular Biology of Plastids*, eds. L. Bogorad and I.K. Vasil, pp. 5-53. Academic Pres, New York.
- Paraschos, S., Magiatis, P., Kalpoutzakis, E., Harvala, C. and Skaltsou-nis, A. L., 2001. Three new dihydroisocoumarins from the Greek endemic species *Scorzonera cretica*, *J. Nat. Prod.*, 64: 1585-1587.
- Parolly, G., N. Kilian., 2003. *Scorzonera karabelensis* Parolly and N. Kilian (Compositae), a new species from SW Anatolia, with a key to the subscapigerous *Scorzonera* species in Turkey. *Willdenowia*, 33: 327-335.
- Rechinger, K. H., 1977. Genus *Scorzonera* L. In : *Flora Iranica*, 122: 16 – 83.
- Riven, C .J., Cullis, C. A., Walbot, V., 1986. Evaluating quantitative variation in the genome of *Zea mays*. *Genetics* 113: 1009- 1019.
- Rodgers, S. O. and Bendich, A. J., 1987. Ribosomal RNA genes in Plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology* 9: 509-520.
- Saitou, N. and Imanishi, T., 1989. Relative efficiens of the Ficti-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol*: 6: 514-525.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manuel*, Volume2, Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York.
- Sang, T., Crawford, D. J., Stuessy, T. F., Silvia, M., 1995. ITS Sequence and Phylogeny of The Genus *Robinsonia* (Asteraceae), *American Society of Plant Taxonomists*, 55-64.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici E., 2000. *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Bornova, İzmir.
- Simpson, G. G., 1961. *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia Univ. Pr.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. and Dolye, J. J., 1992. *Molecular Systematics of Plants*, Chapman & Hall, New York, 14–35.
- Susana, A., Jacas, N. G., Soltis, P. S., and Soltis, D. 1995. Phylogenetic Relationship in Tribe Cardueae (Asteraceae) Based on ITS Sequence, *American Journal of Botany*, 1056–1068.

- Tingey, S. V., Rafalski, J. A. and Williams, J. G. K., 1992. Genetic analysis with RAPD markers, Joint Plant Breeding Symposia Series, November, Minnesota, Application of RAPD Technology to Plant Breeding, 3-8.
- Turan, M., Kordald, S., Zengdn, H., Dursun, A., Sezen, Y., 2003. Macro and Micro Mineral Content of Some Wild Edible Leaves Consumed in Eastern Anatolia. *Soil and Plant Sci.*, 53: 129-137.
- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges. N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M. and Webb. D. A. (eds), 1976. *Flora Europaea* Vol. 4, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 317-322.
- URL-1, <http://cmgm.stanford.edu/help/manuel/software/sequence/> phylogenetic, 14.03.2010
- URL-2, http://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer, 18.04. 2010.
- URL-3, <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/jobresults/clustalw/clustalw-2010100414272844.output>. 24.04.2010.
- Whitfelt, P. R., Bottomley, W., 1983. Organization and structure of chloroplast genes. *Annual Review Plant Physiology*, 34: 279-310.
- Yıldırım, Ş., 1999. The crology of the Turkish species of Asteraceae family. *The Herb journal of Systematic Botany*, 6: 2, 75-123.
- Zidorn, C., Ellmerer, E. P., Sturm, S. and Stuppner, H., 2003. Trylobibenzyls E and F from *Scorzonera humilis* and distribution of caffeic acid derivatives, lignans and tyrolobibenzyls in European taxa of the subtribe Scorzonerinae (Lactuceae, Asteraceae), *Phytochemistry*, 63: 61 – 67.
- Zurawski, G., Clegg, M., 1987. Evolution of higher plant chloroplast DNA coded genes; implications for structure-function and phylogenetic studies. *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 391-418.

7. EKLER

Ek 1. *S. armeniaca*

TCGAAACCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTACTCAAAAATCGGGTAATGGGGGAACAGGGAAATCCCTC
GATCCCTGTTACCTGTTGGCGTGCATACGTGTTGCTCCTTTTCGGAGCTCCACGGATGTTTCGTTAACAACCTAAC
AAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAAAAGAAGGGCGTGCCCCGTGTTGCCCGTTCGCGGTGT
GCAAGCGGGTCGTGGCCTCCTAGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGA
ACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCC
CAAAGCCATCCGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCCATCCATCCTTTAGAGAT
GTATTTTATCGGGGCGTAGATTGGCCTCGTGTGCTCTAGGCGTGCTTGGCCCAAACACGAGTCTCCTTCGGTGG
TGCACGACTAGTGGTGGTTGAATAGGCCCTTGTCTTTTGTGCGTGTGCCGTGTGCTGCAAGGGAACTCTTTTATT
AGACCCCAATGCATCTTCCCTATGACGATGTTTCGACCGGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAA
GCATATCAATAAGCGGAGGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACC

Ek 2. *S. hieraciifolia*

AAACCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACCTGTACTCACATCTAGGCGATAGGGTAACGGGCTAAGGCTCGAAGC
ACTGTTGCCTGTTGGCGTGCCTTTCTGTGCTTCAATTTAGAGCGCCATTGACGTTTTGTTGACAATCTAACCAAC
CCCAGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAAAAGAAGGGTGCCTCGTTTTGCCCTGTTTGGGTGTGCAT
GCGAGTTGTGGCCTCCTCTAAAAATAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGT
AGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAA
GCCATCCGGTTGAGGGCACGCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCCATGTACCTAATCAGGATGCAT
GTTATGGGGGCGGAGATTGTCCTCCTGTGCTTATGGCGGGTTGGTCCAAACCTGAGTCCCCTGCGGTGGATGCA
CGACAAGTGGTGGTTTTGATAGGCCCTCGTCTTTTCGTGCTGTGTTGTTTCTTGCAAGGTAATCTTGTACTAAGACC
CTAATGCATTGTCTTATGATGATGCTTCGACTGCGA

Ek 3. *S. lacera*

TCGAAACCTTGCAGGAGCAGACCGACCCGGCGAACTTGTACTCAAAAATCGGTTAATGGGGGAACAGGGGAAGCCC
TCGAACCCTGTTTACCTGTTGGCGTGGCAGGCGTGTGGCTCCTTTGGAAGCTCCACGGACGTTTGTGTTGACATTC
TAACCAACCCCGCCACGGAATGTGCCAAGGAAACCAAACAAAAGAAGGGCGTGCCCCGTGTTGCCCGTTCGCG
GTGTGCACGCGGGTCGTGGCCTCCTGGAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATG
AAGAACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTG
CGCCCAAAGCCATCCGGCTGAAGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCCATCCATCCTTGAA
GGATGGATGCTACCGGGGCGGAGATTGGCCTCGTGTGCTCTAGGCGTGCTTGGCCCAAACATGAATCCCTTTCCG
GGTGGACAGCACCGACTAGGTGGTGGTTGAAATAAGCCCTTGTCTTTTTTGTTCGTGTGTGCCGTGTGTGCTTGC
CAAGGGGAACCTTCTTTTTATTAAAGAGACCCCATGGCATCCTTTCTATATGGACGAATAGTGTTCGACCCGCC
GACCCCAAGTCAAGCCGGGACT

Ek 4. *S. parviflora*

AAACCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACTTGTACTCACATCTAGGCGATAGGGTAACGGGCTAAGGCTCGAAGC
ACTGTTGCCTGTTGGCGTGCCTTTCTGTCGTTCAATTTAGAGCGCCATTGACGTTTTGTTGACAATCTAACCAAC
CCCAGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAAAAGAAGGGTGCGTCTCGTTTTGCCCGTTTTGCGGTGTGCAT
GCGAGTTGTGGCCTCCTCTAAAAATAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGT
AGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAA
GCCATCCGGTTGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCCCATGTACCTAATCAGGATGCAT
GTTATGGGGGGGAGATTGTCCTCCTGTGCTTATGGCGCGGTTGGTCCAAACCTGAGTCCCCTGCGGTGGATGCA
CGACAAGTGGTGGTTTTGATAGGCCCTCGTCTTTTCGTGCTGTGTTGTTTCTGCAAGGTAATCTTGTACTAAGACC
CTAATGCATTGTCTTATGATGATGCTTCGACTGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGAAATCGAATTCCCGCGGCCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGA

Ek 5. *S. pygmaea* subsp *nutans*

TGAATCCTGCAAAGCAGAATGACCCGTGAACTTGTAACTATAATCGGGCGATGGGGGAACGGTCTTAGGATCCG
AACCTTATCGCCTTTGTGCGGCGTGCTTTTCGTGGTGCACCGTATGGAGCACCATGAATGTTACGCTTACAAGTTAA
CCAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAAAAGAAGCAAGCGTCTCTTGTAGCCCCGTTTCGCGGTG
TGCACTTGGGTGCGGGCCTCTTGGAAATCACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAG
AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTTGAACGCAAGTTGCGC
CCGAAGCCATTTCGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCACCCATGTCTTCCATTCTG
GATGCATGGAGTTGGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGCTCTCAGGTGCGGTTGGCCTAAACACGAGTCCCCTATTG
GTGGATGCATGGCTAGTGGTGGTTGAATAGACCCTCGTATTATGCTGTGTGTCTTGAACCGTTAGGGAAGCCCTC
GTATGAGACCCCAATGCGTCTTTCGCGACGAAGCTTCGACC

Ek 6. *S. rigida*

AAATCGTAACAAGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAATCCTGCAAAGCAGAATGACCCGTG
AACTTGTAACATAATCGGGCGATGGGGGAACGGTCTTAGGATCCGAACCTTATCGCCTTTGTGCGGCGTGCTTTC
GTGGTGCACCGTATGGAGCACCATGAATGTTACGCTTACAAGTTAACCAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAA
AACAAAACAAAAGAAGCAAGCGTCTCTTGTAGCCCCGTTTCGCGGTGTGCACTTGGGTGCGGGCCTCTTGGAAATCA
CAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGA
ATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTTCGGCCGAGGGCACGCCTG
CTTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCACCCATGTCTTCCATTCTGGATGCATGGAGTTGGGGCGGAGATTGGCC
TCCCCTGCTCTCAGATGCGGTTGGCCTAAACACGAGTCCCATAGGGGTGGAGGCAAAAATAGAGATGGGGAATAG
ACAAAAATATGGGGGGGGTAAAAATAAAAAGTTAGGCGCGCCTCGTATATAGGGGGGGGGTGGAGTATAACAAG
AGCCGCGGCGCATCTCAAGGCGGGGATGACCTAACGGCT

Ek 7. *S. latifolia*

TCGAAACCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACTTGTACTCACATCTAGGCGATAGGGTAACGGGCTATGGCTCGA
TGCACTGTTGCCTGTGCGGCGTGCCTTTCTGTGCTTCAATTTAGAGCGCCATTGACGTTTTGCTGACAATCTAACC
AACCCCAGCACGGAATGTGCCAAGGAAAAACAAAACAAAAGAAGGGTGCCTCTCGTTTTGCCCCGTTTGC GGTTGTG
CATGCGAGTTGTGGCCTCCTCTAAAAATAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAA
CGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCC
AAAGCCATCCGGTTGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGTGTGCTCCCCATGTACCTAATCAGGATG
CATGTTGTGGGGGCGGAGATTGTCCTCCTGTGCTTATGGCGCGGTTGGTCCAAACCTGAGTCCCCGCGGTGGAT
GCACGACAAGTGGTGGTTTTGATAGGCCCTCGTCTTTTCGTGCTGTGTTGTTTCTGCATGGTAATCTTGTACTAAG
ACCCTAATGCATTGTCTTATGATGATGCTTCGACT

Ek 8. *S. sosnowskyi*

TCGAAACCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACTTGTACTCACATCTAGGCGATAGGGTAACGGGCTATGGCTCGA
TGCACTGTTGCCTGTGCGGCGTGCCTTTCTGTGCTTCAATTAAGAGCGCCATTGACGTTTTGCTGACAATCTAACC
AACCCCAGCACGGAATGTGCCAAGGAAAAACAAAACAAAAGAAGGGTGCCTCTCGTTTTGCCCCGTTTGC GGTTGTG
CATGCGAGTTGTGGCCTCCTCTAAATATATAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAG
AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGC
CCAAAGCCATCCGGTTGAGGGCACACCTGCCTGGGCGTCACGCATCGTGTGCTCCCCATATACCTAATCAGGA
TGCACTGTTGTGGGGGCGGAGATTGTCCTCCTGTGCTTATGGCGCGGTTGGTCCAAACCTGAGTCCCCGCGGTGG
ATGCACGACAAGTGGTGGTTTTGATAGGCCCTCGTCTTTTCGTGCTGTGTTGTTTCTGCAAGGTAATCTTGTACTA
AGACCCTAATGCATTGTCTTATGATGATGCTTCGACT

Ek 9. *S. tomentosa*

TCGAAACCTGCAAAGCAGAACGACCCGTGAACTTGTACTCACATCTAGGCGATAGGGTAACGGGCTATGGCTCGA
TGCACTGTTGCCTGTGCGGCGTGCCTTTCTGTGCTTCAATTTAGAGCGCCATTGACGTTTTGCTGACAATCTAACC
AACCCCAGCACGGAATGTGCCAAGGAAAAACAAAACAAAAGAAGGGTGCCTCTCGTTTTGCCCCGTTTGC GGTTGTG
CATGCGAGTTGTGGCCTCCTCTAAAAATAAATGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAA
CGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCC
AAAGCCATCCGGTTGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGTGTGCTCCCCATGTACCTAATCAGGATG
CATGTTGTGGGGGCGGAGATTGTCCTCCTGTGCTTATGGCGCGGTTGGTCCAAACCTAAGTCCCCGCGGTGGAT
GCACGACAAGTGGTGGTTTTGATAGGCCCTCGTCTTTTCGTGCTGTGTTGTTTCTGCATGGTAATCTTGTACTAAG
ACCCTAATGCATTGTCTTATGATGATGCTTCGACT

Ek 10. *S. aucherana*

TCGAATCCTGCAAAGCAGAATGACCCGTGAACTTGTAACATAATCGGGCGATGGGGGAACGGTCCTAGGATCCG
AACCTTATCGCCTTTGTTCGGCGTGCTTTTCGTGGTGCACCGTATGGGGCACCATGAATGTTATGCTTACATGTTAA
CCAACCCCGGCACGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAAAAGAAGCAAGCGTCTCTTGTAGCCCCGTTTCGCGGTG
TGCACTTGGGTTCGCGGCCTCTTGGAAATCACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAG
AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGC
CCGAAGCCATTTCGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCACCCATGTCTTCCGTTCTG
GATGCATGGAGTTGGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGCTCTCCGGTTCGGTTGGCCTAAACACGAGTCCCCTATTG
GTGGATGCATGGCTAGTGGTGGTTCGTATAAACCCCTTGTATTATGCTGTGTGTCTTGCAGGGATAGGGAAGCCCTC
GTATGAGACCCCAATGCGATGACTTGCCATGAAGATTCGACCGCGAC

Ek 11. *S. kotschy*

TCGAATCCTGCAAAGCAGAATGACCTGTGAACATGTAACATAATCTGGCGATGGGGGAAAGGTCCTAGGATCCG
AACCTTATTGCCTTGTCTGCGTGCTTTTCGTGGTGTTCGGTATGGAGCACCATGAATGTTATGCTTACAAGTTAAC
CAAACCCGGCGCGGAATGTGCCAAGGAAAACAAAACAAAAGAAGCAAGCGTCTTTTAGCCCCGTTTCGCGGTGTG
CACTCGGGTTCGCGGCCTCTTGGAAATCACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAA
CGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCC
GAAGCCATTTCGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCTCCACCCATGTATTCCATTGTGGA
TGCATGGAGTTGGGGCGGAGATTGGCCTCCCGTGCTCTCAGGTTCGGTTGGCCTAAACCCGAGTCCCCTATTTTG
GTGGATGCATGGCTAGTGGTGGTTGAATAGACCCTCGTATTATGCTGTGTGTTCGTGAACCATTAGGGAAGCCCTC
GTATGAGACCCCAATTCGTCTAGCGACGAAGCTTCGACC

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında KARS'ta doğdu. İlk Öğrenimini Kars Halitpaşa İlk Öğretim Okulunda, Orta Öğrenimini ise Kars Cumhuriyet Lisesinde (YDA) tamamladı. 2004 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimine başlayıp 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Rize Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek Lisansa başladı. 2009–2010 eğitim-öğretim yılının güz dönemini ERASMUS programıyla gittiği POLONYA'nın KRAKOW ilinde tamamladı. Halen Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.