

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE *FIBIGIA* MEDIK. (CRUCIFERAE) CİNSİ ÜZERİNE  
MOLEKÜLER VE MİKROMORFOLOJİK BİR ÇALIŞMA

ÖZLEM ÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORTA ÖĞRETİM FEN VE MATEMATİK ALANLARI EĞİTİMİ  
ANABİLİM DALI

KONYA- 2009

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE *FIBIGIA* MEDİK. (CRUCIFERAE) CİNSİ ÜZERİNE  
MOLEKÜLER VE MİKROMORFOLOJİK BİR ÇALIŞMA

ÖZLEM ÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORTA ÖĞRETİM FEN VE MATEMATİK ALANLARI EĞİTİMİ  
ANABİLİM DALI

Bu tez 02 / 07 / 2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet DURAN  
(Danışman)

Doç. Dr. Erdoğan E. HAKKI  
(Üye)

Yard. Doç. Dr. Bekir DOĞAN  
(Üye)

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### TÜRKİYE *FIBIGIA* MEDİK. (CRUCIFERAE) CİNSİ ÜZERİNE MOLEKÜLER VE MİKROMORFOLOJİK BİR ÇALIŞMA

Özlem ÇETİN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi  
Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet DURAN

2009, xii + 84 Sayfa

Jüri: Prof. Dr. Ahmet DURAN

Jüri: Doç. Dr. Erdoğan E. HAKKI

Jüri: Yard. Doç. Dr. Bekir DOĞAN

#### TÜRKİYE *FIBIGIA* MEDİK. (CRUCIFERAE) CİNSİ ÜZERİNE MOLEKÜLER VE MİKROMORFOLOJİK BİR ÇALIŞMA

Bu tez çalışması ile Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren *Fibigia* cinsine ait taksonlar moleküler ve mikromorfolojik yönden incelenmiştir. Ayrıca nümerik analizler sonucu elde edilen veriler NTSYS-pc paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Taksonlara ait polenler ışık ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Ayrıca bu taksonlara ait tohumların taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. Polen ve tohum yüzeyi ornemantasyonu retikulatedir. Ayrıca polenlerin trikolpat ve prolate olduğu gözlenmiştir. *Fibigia* cinsine ait farklı lokalitelerden toplanmış 19 örnekten 2XCTAB ve Qiagen kit ile DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu örneklerin ISSR primerleri kullanılarak filogenetik akrabalığı araştırılmıştır. Moleküler çalışmalar sonucu elde edilen veriler NTYSY-pc paket programı aracılığı ile değerlendirilmiştir. Taksonlara ait örneklerin morfolojik olarak incelenmesi ile taksonomik değer taşıyan karakterler belirlenmiş ve taksonların nümerik sınıflandırmaya göre de filogenetik ilişkilerini yansıtan fenogramları oluşturulmuştur. Bu çalışma ile Türkiye *Fibigia* cinsi iki seksiyona ayrılmıştır. *F. macroptera* ve *F. clypeata*

taksonları *Eufibigia* seksiyonunda, *F. suffruticosa* türü ise yeni bir seksiyon olan *Purpureae* seksiyonu altında yer almıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Brassicaceae, *Fibigia*, ISSR, Mikromorfoloji, SEM, Nümerik Analiz

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **A MOLECULAR AND MICROMORPHOLOGY BASED STUDY ON THE GENUS *FIBIGIA* MEDIK. (CRUCIFERAE) IN TURKEY**

**Özlem ÇETİN**

**Selçuk University**

**Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**Department of Biology Education**

**Supervisor: Prof. Dr. Ahmet DURAN**

**2009, xii + 84 pages**

**Jury: Prof. Dr. Ahmet DURAN**

**Jury: Doç. Dr. Erdoğan E. HAKKI**

**Jury: Yard. Doç. Dr. Bekir DOĞAN**

### **A STUDY OF MOLECULAR AND MICROMORPHOLOGY ON THE GENUS *FIBIGIA* MEDIK. (CRUCIFERAE) IN TURKEY**

In this thesis molecular and micromorphological studies were conducted on the taxa of the genus *Fibigia* Medik. which are naturally ground in Turkey. Numerical data were analysed via NTSYS-pc software. Pollens of the genus *Fibigia* were examined with light and scanning electron microscope (SEM). Micrographs of the seeds were also taken with scanning electron microscope (SEM). Polen and seed ornamentations are reticulate. Also pollens trains are observed as a prolate and tricolpate types. DNAs from 19 specimens collected from different localities were isolated with 2XCTAB procedure and Qiagen DNA Isolation Kit. The molecular relationships of the taxa were studied using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Molecular data were also evaluated via NTSYS-pc programe. Diagnostic characters were of the taxa used were determined with morphological studies and fenograms which reflect the phylogenetic relationships of taxa were obtained according to the numerical

classification. In this study *Fibigia* genus in Turkey was divided into the two sections. *Fibigia macroptera* and *F. clypeata* are placed in the section *Eufibigia* and *Fibigia suffruticosa* is placed in the new section *Purpureae*.

**Key Words:** Brassicaceae, *Fibigia*, ISSR, Micromorphology, SEM, Numerical Analysis

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanmasında ve yürütülmesine öncülük eden, tezimin her aşamasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ahmet DURAN'a teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarında ve örneklerin temini konusunda yardım eden başta danışman hocam Prof. Dr. Ahmet DURAN'a, Süleyman Tuştaş'a, Yard. Doç. Dr. Murat Ünal'a, Yard. Doç. Dr. Mehmet Fırat'a, Araş. Gör. Meryem Öztürk'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımı esirgemeyen Doç. Dr. Erdoğan Eşref Hakkı'ya, Yard. Doç. Dr. Esra Martin'e, Yard. Doç. Dr. Bekir Doğan'a, Ziraat yüksek mühendisi Emine Pınarkara'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresince verdiği burstan dolayı TÜBİTAK'a ve bu tez çalışmasına maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, eğitim hayatım boyunca benden maddi-manevi desteğini esirgemeyen canım aileme teşekkür ederim.

	<b><u>Sayfa</u></b>
	<b><u>No</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>ÖNSÖZ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ</b> .....	x
<b>ÇİZELGELERİN LİSTESİ</b> .....	xi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	7
2.1. Brassicaceae Familyası Hakkında Genel Bilgi.....	7
2.2. <i>Fibigia</i> Medik. Cinsi Hakkında Genel Bilgi.....	9
2.3. Genetik Markörler.....	10
2.3.1. Morfolojik Markörler.....	11
2.3.2. Protein Markörleri.....	13
2.3.3. DNA Markörleri.....	14
2.3.3.1. Hibridizasyon Tabanlı Markörler.....	15
2.3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayanan Markör Teknikleri.....	15
2.3.3.2.1 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	18
2.3.3.2.2 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	19
2.3.3.2.3. Simple Sequence Repeat (SSR).....	19
2.3.3.2.4. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR).....	20
2.3.3.2.5. Brassicaceae Familyası Üzerine Yapılmış Bazı Moleküler Çalışmalar.....	21
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	25
3.1. Moleküler Metot.....	27
3.1.1. Sterilizasyon.....	27
3.1.2. DNA İzolasyonu .....	27
3.1.3. DNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Belirlenmesi.....	30
3.1.4. PCR Bileşenlerinin Optimizasyonu.....	31
3.1.4.1 Primer Seçimi ve Konsantrasyonu.....	31
3.1.4.2 Magnezyum Konsantrasyonu.....	32
3.1.4.3 Deoksiribonükleozid Tri Fosfat Konsantrasyonu.....	32

3.1.4.4 10 X <i>Taq DNA Polimeraz</i> Tamponu.....	33
3.1.4.5. <i>Taq DNA Polimeraz</i> Enzimi.....	33
3.1.5 PCR Uygulaması.....	33
3.1.5.1. PCR Karışımının Hazırlanması.....	33
3.1.5.2. PCR Şartlarının Optimizasyonu.....	34
3.1.6. Elektroforez Uygulamaları ve Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
3.1.6.1. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	35
3.1.6.2. Agaroz Jel Hazırlama ve Jel Görüntüleme.....	36
3.1.7. ISSR Bantlarının İstatistikî Analiz Programları ile Değerlendirilmesi.....	36
3.2. Nümerik Metot.....	37
3.3. Mikromorfolojik Metot.....	40
3.3.1 Polenlerin Morfolojik Olarak İncelenmesi.....	40
3.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Metodu.....	41
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>42</b>
4.1 <i>Fibigia</i> Cinsi Taksonlarının Genel Özellikleri.....	42
4.2 Mikromorfolojik Sonuçlar.....	45
4.3. Nümerik Sonuçlar.....	52
4.4. Moleküler Sonuçlar.....	60
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>72</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>75</b>

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

		<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> ve <i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i> taksonlarının polen SEM görüntüsü.....	48
Şekil 4.2	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>anatolica</i> , <i>Fibigia macroptera</i> , <i>Fibigia suffruticosa</i> taksonlarının polen SEM görüntüsü.....	49
Şekil 4.3	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> ve <i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i> taksonlarının tohum yüzeyi SEM görüntüsü.....	50
Şekil 4.4	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>anatolica</i> , <i>Fibigia macroptera</i> , <i>Fibigia suffruticosa</i> taksonlarının tohum yüzeyi SEM görüntüsü.....	51
Şekil 4.5	<i>Fibigia</i> cinsi ve dış grupların nümerik sınıflandırılması sonucu elde edilen fenogram.....	57
Şekil 4.6	<i>Fibigia</i> cinsi ve dış grupların SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat ekseninde dağılımı.....	59
Şekil 4.7	DNA dilüsyonları yapılan örneklerin agaroz jele yükleme numaraları.....	61
Şekil 4.8	Taksonların ISSR 3, 4, 5, 7 nolu primerler ile PCR amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü.....	63
Şekil 4.9	Taksonların ISSR 11, 12, 13, 15 nolu primerler ile PCR amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü.....	64
Şekil 4.10	Taksonların ISSR 16, 17 nolu primerler ile PCR amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü.....	65
Şekil 4.11	<i>Fibigia</i> cinsi ve dış grupların ISSR amplifikasyonları sonunda elde edilen dendogram.....	69
Şekil 4.12	<i>Fibigia</i> cinsi ve dış grupların SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat ekseninde dağılımı.....	71

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Çizelge 3.1 Moleküler çalışmada kullanılan örneklerin adı, toplayıcı numarası ve lokalite bilgileri.....	25
Çizelge 3.2 Mikromorfolojik çalışmalarda kullanılan örneklerin adı, toplayıcı numarası ve lokalite bilgileri.....	26
Çizelge 3.3 ISSR amplifikasyonunda kullanılan primerler.....	32
Çizelge 3.4 PCR mixinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.	34
Çizelge 3.5 6X Jel Yükleme solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar.....	35
Çizelge 3.6 Tris-borik asit- EDTA çözeltisinin hazırlanması.....	36
Çizelge 3.7 Nümerik taksonomide kullanılan morfolojik karakterler.....	39
Çizelge 4.1 Taksonların nümerik taksonomisinde kullanılan karakterlerin değerleri.....	53
Çizelge 4.2 <i>Fibigia</i> , <i>Bornmuellera</i> , <i>Aurinia</i> , <i>Physoptychis</i> taksonlarının biyofotometrede okunan DNA değerleri.....	60
Çizelge 4.3 ISSR amplifikasyonları sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları.....	62

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
km	Kilometre
M	Metre
Cm	Santimetre
Mm	Milimetre
Mm	Mikrometre
°C	Santigrat derece
Ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
G	Gram
M	Molar
Å	Angstron
Rpm	Revolutions per minute
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
RAPD	Randomly Amplified polymorphic DNA
SSR	Simple Sequence Repeat
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CTAB	Cetil Trimetil Amonyum Bromid
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Taq	Thermus aquaticus
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Sect. nov.	Section nova

## 1. GİRİŞ

Türkiye'nin Akdeniz bölgesinde subtropikal kuşak vejetasyonu, Karadeniz bölgesinde orta kuşağın serin ve ılıman iklim ormanları, İç Anadolu bölgesinde orta kuşağın step ve ağaçlı step vejetasyonu, Kuzey ve Kuzeydoğu Anadolu'nun yüksek yerlerinde iğne yapraklı sarıçam ve ladin ormanları, orman sınırının üstündeki dağlık alanlarda ise Sibiryaya ve soğuk kuşağın Alpin vejetasyonu bulunur. Orta kuşağın güneyinde yer alan ülkemizin etrafının denizlerle çevrili olması, kesintisiz dağ sıralarının bulunması, farklı iklim tiplerinin etkisinde olması, değişik vejetasyon formasyonlarının bulunması, farklı topografik yapı ve toprak gruplarına sahip oluşu nedeniyle ekvatorial ve subekvatorial kuşaklardan sonra bitki türleri açısından dünyanın en zengin bölgeleri arasında yer alır (Atalay 1994).

Türkiye Florasının oluşumunda etkili olan edafik, coğrafik, topografik, hidrolojik, iklimsel ve kültürel faktörlerin zenginliği yabancı botanikçilerin yüzyıllar öncesinde ilgisini çekmiştir. Bu nedenle farklı zamanlarda çok sayıda botanikçi ülkemizde floristik çalışmalar yapmışlardır. Türkiye Florası ile ilgili ilk önemli çalışma, İsviçreli botanikçi E. Boissier tarafından 1865–1888 yılları arasında yayımlanan *Flora Orientalis* eseridir. Editörlüğünü P.H. Davis'in yaptığı *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* adlı dokuz ciltlik eser *Flora Orientalis*'ten sonra ülkemiz florası ile yapılmış en kapsamlı çalışmadır. 1988 ve 2000 yıllarında bu dokuz ciltlik esere ilave olarak iki ek cilt daha yayınlanmıştır.

Türkiye Florasında yer alan birçok tür betiminin yalnızca morfolojik karakterler kullanılarak yapılmış olması, bazı taksonların varyasyon sınırlarının belirlenmesinde yetersiz kalmakta ve önemli taksonomik güçlükler ortaya çıkmaktadır. Morfolojik karakterlerin uygulamadaki yetersizlikleri, moleküler markörlerin uygulanmasıyla bir dereceye kadar ortadan kalkmıştır. Farklı disiplinlerden sağlanan bilgilerle birlikte revizyon çalışmalarının daha kapsamlı ve güvenilir hale gelmesi ile botanikçiler özellikle taksonomik olarak problemlili olan cinsler üzerine yoğunlaşmışlardır ve bu cinslerin modern revizyonları yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda problemlili

birçok cinsin sistematik filogenisi aydınlatılmıştır. Ülkemizde revizyonu yapılan cins ve seksiyonlardan bazıları şunlardır; *Hesperis* L., *Heracleum* L., *Jurinea* Cass., *Sideritis* L., *Isatis* L., *Phleum* L., *Delphinium* L., *Astragalus* L. Sect. *Dasyphyllum* Bunge, *Astragalus* L. sect. *Hololeuce* Bunge ve sect. *Acmothrix* Bunge, *Arabis* L., *Ebenus* L., *Phlomis* L., *Ballota* L., *Fritillaria* L., *Verbascum* L., *Ferula* L. Ayrıca bu çalışmalar sonucunda Türkiye Florasına hem tür ve tür altı düzeyde hem de cins düzeyinde yeni kayıt ve bilim dünyası için yeni taksonlar eklenmiştir.

Brassicaceae dünyada yaklaşık 338 cins ve 3715 tür ile temsil edilen monofiletik bir familyadır (Al-Shehbaz ve ark. 2006). Dünyanın ekonomik öneme sahip familyalarından birisi de Brassicaceae'dir. Başta kültürleri yapılan *Brassica* türleri olmak üzere birçok üyesi sebze ve baharat olarak tüketilir. Lahana, karalahana, karnabahar, tere gibi bitkiler Brassicaceae familyasının besin kaynağı olarak kullanılan üyeleri arasında sayılabilir. *Cheiranthus cheiri* L. (Şebboy), *Iberis* L. (Yenidünya çiçeği), *Malcolmia* R.Br. (Yaz şebboyu), *Matthiola* R.Br., *Hesperis* L. gibi Brassicaceae türleri evlerde, park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılırlar. Ayrıca 2001 yılında genom haritası çıkarılan ilk model organizma olan *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.'nın Brassicaceae familyasında olması bu familyanın önemini daha da arttırmaktadır.

Brassicaceae familyası üyelerinde stamenler tetradinam yapıda, korolla cruciform (haç) şeklinde, meyveler ise silikva ve silikula tiplerinde bulunur. Bu diagnostik karakterleri ile diğer familyalardan kolaylıkla ayrılır (Beilstein ve ark. 2006).

Brassicaceae familyası üyeleri Antartika kıtası dışında hemen hemen bütün dünyada yayılış gösterir. Bu familya üyelerinin dünyadaki dağılımı aynı yoğunlukta değildir. Özellikle kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde doğal yayılış gösterirler. Brassicaceae familyasının güney yarım kürede de yayılış gösteren türleri vardır (Koch & Kiefer 2006).

Dünyada Brassicaceae familyası üyelerinin en fazla temsil edildiği yer Amerika'dır. Türkiye ise Amerika'ya göre çok daha küçük olmasına rağmen Brassicaceae üyelerinin dünyada en çok tür ile temsil edildiği ikinci ülkedir. Bu familya Türkiye Florasına göre 464 tür ve 86 cins içerir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre Brassicaceae familyasının ülkemizde 573 tür, 66 alt tür ve 24 varyete olmak üzere toplam 663 takson ve 91 cins ile temsil edilir. Türkiye yüzölçümüne göre Dünyada Brassicaceae familyasının en çok tür içeren ülkesidir (Al-Shehbaz ve ark 2007, Davis 1965, Davis ve ark. 1988, Güner ve ark 2000, Duran & Ocak 2005, Dirmenci ve ark 2005, Dirmenci ve ark 2006).

Brassicaceae familyasının genetik farklılaşma merkezi İran-Turan ve Akdeniz fitocoğrafik bölgeleri kabul edilir. İran-Turan fitocoğrafik bölgesinde yaklaşık 150 cins ve 900 türle temsil edilir ve bu türlerin 530'u endemiktir. Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde ise bu familyanın 113 cinsi ve 630 türü yayılış gösterir ve bu türlerin 292'si endemiktir. Kuzey Amerikanın komşu bölgelerinde ve Saharo-Sindian bölgesinde tür çeşitliliği azalmaktadır ve bu azalma güney yarım kürede de devam eder (Al-Shehbaz 1984, Appel & Al-Shehbaz 2003, Hedge 1976, Koch & Kiefer 2006).

Brassicaceae üzerine ilk kapsamlı çalışma 1821 yılında A.P. de Candolle tarafından yapılmıştır. Candolle sınıflandırma sistemini meyve ve embriyo karakterlerini kullanarak yapmıştır. 1911 yılında A. von Hayek nektar salgısı ve myrosin hücrelerini kullanarak bir sınıflandırma yapmıştır. Hayek'in yaptığı sınıflandırmaya göre Brassicaceae familyası 10 tribusa ayrılmıştır. Schulz 1936 yılında Brassicaceae familyasını 19 tribusa, Janchen ise 1942 yılında 15 tribusa ayırmıştır. Ancak Brassicaceae familyası ile yapılan bu çalışmalar daha çok morfolojik karakterlere dayandığı için familyanın filogenetik akrabalığı tam olarak aydınlatılamamıştır (de Candolle 1821, Hayek 1911, Schulz 1936, Janchen 1942, Beilstein ve ark 2006, Koch ve ark 2001).

DNA tabanlı moleküler verilerin sistematik problemleri çözmede kullanılabilir hale gelmesi ile Brassicaceae familyasının filogenetik akrabalığı aydınlatılmaya

başlanmıştır. Al-Shehbaz ve ark.'nın yaptığı moleküler çalışmalar sonucunda Brassicaceae familyasının tribus sayısı yeni eklenen tribuslarla birlikte 25 olarak rapor edilmiştir. Tribuslardan bazılarının filogenetik akrabalığı moleküler veriler yardımıyla açıklanmış olmasına rağmen bazı tribusların sistematik problemleri hala çözülememiştir (German & Al-Shehbaz 2008, Al-Shehbaz ve ark 2006).

Alysea tribusunun filogenetik akrabalığının aydınlatılması için çalışmalar yapılmaktadır. Warwick ve ark.'nın yaptığı çalışma ile bu tribusun filogenetik akrabalığı kısmen aydınlatılmıştır. Ancak Alysea tribusunda yer alan bazı cinslerin filogenetik ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır. Bu tribusta yer alan *Fibigia* Medik. cinsi de filogenetik ilişkisi tam olarak açıklanamamış cinsler arasında yer alır (Warwick ve ark 2008).

*Fibigia* cinsi (Brassicaceae) dünyada yaklaşık 16 takson ile temsil edilmektedir (Cullen 1965, Bouloumoy 1930, Bush 1939, Tutin & Heywood 1964, Rechinger 1968). Bu cins dünyada Eski Yugoslavya, Eski Sovyetler Birliği, İran, İsrail, Suriye, Kıbrıs ve Türkiye'de yayılış göstermektedir. Cins özellikle Doğu Akdeniz ve İran-Turan fitocoğrafik bölgelerine lokalize olmuştur (Bush 1939). Özellikle bu bölgeler, *Fibigia* cinsi taksonlarının genetik farklılaşma merkezi kabul edilir ve bu alanlardaki bireylerde polimorfizmin daha yüksek olduğu bilinmektedir.

Türkiye Florasına göre *Fibigia* cinsinin ülkemizde doğal olarak yetişen dört türü bulunur (Cullen 1965). Son yapılan çalışma ve literatür bilgilerine göre *Fibigia* cinsi ülkemizde üç tür ve beş takson ile temsil edilmektedir (Tuştaş 2008, Townsend & Guest 1980).

Türkiye Florasında *Fibigia* cinsi taksonlarının betimleri ve sınıflandırılması yalnızca morfolojik karakterler kullanılarak yapılmıştır. Varyasyon sınırları yeterince belirlenemeyen bu taksonların önemli taksonomik problemleri günümüze kadar devam etmiştir. Bitki sistematğinde moleküler verilerin de kullanılması ile birlikte önemli bazı sistematik problemler çözülmeye başlamıştır.

Moleküler teknikler, diğer tekniklere göre fazla avantajlara sahip olup, çevre faktörlerinden etkilenmezler ve polimorfizm oranları yüksektir. Aynı zamanda pleotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermeyip son derece kararlıdır (Soller & Beckmann 1983, Tanksley 1983, Avise 1994, Bretting & Widrechner 1995, Parmaksız 2004). Moleküler markörler kullanılarak genetik varyasyon araştırılabilir. Örneğin birbirine çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlaması yapıp, filogenetik akrabalıkları bulunabilir (Lowe ve ark. 1996, Parmaksız 2004). Doğadaki yabani varyetelerin moleküler düzeyde tanımlanması, ekonomik değeri olan çeşitlere yeni ve üstün özellikler kazandırılması açısından da önemlidir (Bothmer ve ark. 1991, Parmaksız 2004).

1980'den bu yana PCR teknolojisinin de yardımıyla genom analizlerinde önemli ilerlemeler gerçekleşti. Bu ilerlemeler hızlı ve az miktarda DNA gerektiren markör protokollerinin gelişmesini sağladı. Başlangıçta RFLP gibi DNA tabanlı markörler moleküler sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak 1990'lı yılların başından itibaren moleküler sistematik çalışmalarda RAPD tekniğinin kullanımı daha çok tercih edilmiştir. İlerleyen yıllarda SSR'lar (microsatellit) ve AFLP'ler yaygın olarak moleküler sistematik çalışmalarda kullanılmıştır. 1994'lerden bu yana diğer tekniklerin dezavantajlarını büyük ölçüde gideren yeni bir markör tekniği olan ISSR tekniği kullanılmaya başlanmıştır. ISSR tekniği RAPD tekniğine göre çok daha hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir tekniktir. Bu teknik ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız olarak genomda rasgele dağılımlarını esas alır.

Bu tez çalışması ile *Fibigia* cinsi taksonlarının tohum ve polen yüzeyi özellikleri elektron mikroskobu (SEM) ile incelenerek özellikle mikro morfolojilerine dayalı taksonomik değer taşıyan karakterleri belirlenmiştir. Yine bu çalışmada moleküler çalışmalar kapsamında elde edilen veriler sistematik analiz programlarında (NTSYSpc 2.1 programı, Minitab) değerlendirilerek *Fibigia* cinsinin filogenetik akrabalığını gösteren dendogram oluşturulmuştur. Ayrıca nümerik

çalışmalardan sağlanan verilerin de analiz programlarında değerlendirilmesiyle fenetik dendogramı yapılmıştır. Sonuç olarak Türkiye *Fibigia* cinsi taksonlarının moleküler, palinolojik ve nümerik verilere dayalı filogenetik ilişkilerini yansıtan modern bir revizyonu gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Brassicaceae Familyası Hakkında Genel Bilgi

Brassicaceae (Cruciferae) familyası taksonları genellikle Kuzey yarıkürenin ılıman kuşağında yayılış göstermektedir. Bu familya dünya genelinde yaklaşık 338 cins ve 3715 tür ile temsil edilmektedir (Bailey ve ark. 2006). Ülkemizde ise Brassicaceae familyası 91 cins ile temsil edilir ve en fazla cins içeren familyalar arasında dördüncü sırada bulunur. Ayrıca bu familya içerdiği 663 tür ve tür altı takson ile ülkemizde Compositae ve Leguminosae familyalarından sonra en fazla takson içeren familyalardan biridir. Brassicaceae familyasının ülkemizdeki endemizm oranı %39.6'dır (Cullen 1965, Davis ve ark. 1988, Güner ve ark. 2000, Özhatay ve Kültür 2006, Yıldırım 2001, Al-Shehbaz ve ark. 2007).

**Familya Özellikleri:** Brassicaceae familyası üyeleri genellikle otsu veya nadiren yarı çalimsı formdadır. Yapraklar alternat nadiren opposit ve stipulasız. Çiçekler genellikle hermafrodit, hipogin ve bilateral simetrik. Sepaller 4, serbest, dekussat çiftler halinde. Petaller 4, serbest. Stamen genellikle 6, tetradinam, nadiren 4 veya 2. Filamentler çoğunlukla kanatlı, apendageli veya dişli. Nektaryumlar stamenlerin tabanı etrafında farklı şekillerde dizilmiş. Ovaryum sinkarp, 2 karpelli, genellikle 2 gözlü ve yalancı bir septum ile bölünmüş. Meyve alttan açılan 2 valveli bir kapsula (meyva genişliğinin 3 katından fazla ise silikva, genişliği 3 katından daha az uzunlukta ise silikula olarak adlandırılır), nadiren lomentuma benzer veya açılmaz. Çoğu zaman tohumlar ıslakken müsilajlıdır.

Brassicaceae familyası dünyada ekonomik değeri olan önemli familyalar arasında yer alır. Bugün dünyanın farklı ülkelerinde bu familyanın çok sayıda türü farklı ekonomik amaçlar doğrultusunda kültür bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Brassicaceae familyası üyelerinin başlıca ekonomik kullanım alanları şunlardır; özellikle sebze olarak tüketilenlerden bazıları: *Fibigia clypeata* (L.) Medik., *Brassica oleracea* L. var. *oleracea* (lahana), *B. oleracea* L. var. *acephala* DC. (karalahana), *B. oleracea* L. var. *gemmifera* DC. (brüksel lahanası), *B. oleracea* L. var. *botrytis* L.

(karnabahar), *Eruca sativa* Miller (roka), *Raphanus raphanistrum* L. (yabani turp), *R. sativus* L. var. *radicula* (kırmızıturp), *Lepidium sativum* L. (tere)'dur (Hedrick 1972, Kunkel 1984, Facciola 1990). *Capsella bursa-pastoris* Medik. türü de gıda olarak tüketilmektedir (Şimşek ve ark. 2002). *Brassica nigra* (L.) Koch. (siyah hardal), *Sinapis alba* L. (beyaz hardal) gibi türler baharat olarak kullanılmaktadır. *Brassica rapa* L. var. *rapa* (şalgam) türü içecek sanayisinde kullanılmaktadır. *Brassica napus* L. (kolza) ve *B. rapa* L. var. *oleracea* DC. (yağ şalgamı), *Eruca sativa* Miller (ızgın) türleri tohumlarından yağ elde etmek için kültür edilmektedir. Ülkemizde yaygın olarak yetişen *Isatis tinctoria* L. (yabani çivitotu) türü ise kökboyası elde edilmesinde kullanılır (Baytop 1994, Özyurt 1992).

*Sinapis arvensis* L. yapraklarından elde edilen ekstraksiyonun idrar yolu iltihabı, diyabet, gaz giderici ve kurt düşürücü gibi tedavi edici özelliklerinin olduğu belirtilmiştir (Şimşek ve ark. 2002). Bazı *Isatis* türleri ise yara iyileştirici ve kabızlığı giderici olarak kullanılmaktadır (Özyurt 1992).

*Fibigia clypeata* türü Lübnan'ın Aarsal bölgesinde dar yayılışlı olmasına rağmen halk tarafından kullanılan tıbbi bitkiler arasında yer almaktadır. Kullanılış amacı safra kesesi ve böbrek taşı ağrılarının azaltılması veya giderilmesidir.

Bazı Avrupa ülkelerinde sebze olarak tüketilen *Fibigia clypeata* türüne ait tohumların ticari satışı yapılmaktadır. *Fibigia clypeata* türünün yetiştirilen vejetatif organlarının demeti 1.80 £'dan satılmaktadır. Ayrıca *Fibigia eriocarpa* (DC.) Boiss. türünün kök, gövde, yaprak ve meyveleri drog olarak kullanılmaktadır. *Fibigia clypeata* türünde yapılan bir çalışmada ise bu türün biyoindikatör olduğu belirtilmektedir (Tohmé & Tohmé 2005).

Aynı zamanda park, bahçe ve evlerde *Cheiranthus cheiri* (Şebboy), *Iberis* (yenidünya çiçeği), *Malcolmia* (yaz şebboyu), *Matthiola* (bahçe şebboyu), *Fibigia* ve *Hesperis* cinslerinin türleri yaygın biçimde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Seçmen ve ark. 1998, Duran ve ark. 2003).

## 2.2. *Fibigia* Cinsi Hakkında Genel Bilgi

*Fibigia* cinsi (Brassicaceae) dünyada yaklaşık 16 takson ile temsil edilmektedir (Cullen 1965, Bouloumoy 1930, Bush 1939, Tutin & Heywood 1964, Rechinger 1968). *Fibigia* cinsi özellikle Doğu Akdeniz ve İran-Turan fitocoğrafik bölgesine lokalize olmuştur (Bush 1939). Özellikle bu bölgelerin *Fibigia* cinsine ait taksonlarının genetik farklılaşma merkezi kapsamında bulunması nedeniyle, bireyler arasındaki polimorfizm daha yüksektir.

*Fibigia* cinsinin Lübnan ve Suriye’de doğal yayılış gösteren tek türünün olduğu bilinmektedir (Bouloumoy 1930). Lübnan ve Suriye Florasında yer alan *F. clypeata* türü ülkemizde de doğal olarak yayılış göstermektedir. Avrupa Florasında üç *Fibigia* türü bulunmaktadır. Avrupa Florasında yer alan türlerden yalnızca *F. clypeata* türü Türkiye’de yayılış göstermektedir.

*Fibigia* cinsi İran Florasında iki seksiyona ayrılmıştır. Bu seksiyonlar ve türler şunlardır:

Seksiyon 1: *Fibigia*

*F. suffruticosa* (Vent.) Sweet

*F. clypeata*

*F. thesigeri* K.H.Rechinger

*F. macrocarpa* (Boiss.) Boiss.

Seksiyon 2: *Edmondia* Bge. ex Boiss.

*F. multicaulis* Boiss. & Hohen. ex Boiss

*F. umbellata* (Boiss.) Boiss.

*F. pendula* (Boiss.) Boiss.

*F. membranacea* Rech. f. & Köie

Irak Florasında da *Fibigia* türleri *Fibigia* ve *Edmondia* seksiyonları altında toplanmıştır. Bu seksiyonlar ve türleri şunlardır:

Seksiyon 1: *Fibigia*

*F. suffruticosa*

*F. clypeata*

*F. thesigeri*

Seksiyon 2: *Edmondia*

*F. multicaulis*

*F. umbellata*

*Fibigia macrocarpa* türü farklı Floralarda farklı isimlerde ve farklı taksonomik basamaklarda yer almaktadır. Irak Florasında *F. clypeata*'nın alt türü olarak verilen *F. clypeata* subsp. *macroptera* taksonunun Türkiye Florasında ve İran Florasında tür düzeyinde temsil edilen *F. macrocarpa* olduğu not edilmiştir.

Rus Florasında ise dört *Fibigia* türü bulunmaktadır. Irak Florasında *Fibigia* seksiyonu altında yer alan *F. clypeata* subsp. *macroptera*, *F. eriocarpa* ve *F. clypeata* taksonları Rus Florasında *Eufibigia* seksiyonu altında verilmiştir.

*Fibigia* cinsi Türkiye Florasında dört tür ile temsil edilmektedir. *Fibigia* cinsi üzerine yapılan morfolojik bir çalışmada *Fibigia* cinsine bilim dünyası için yeni bir takson eklenmiştir. Türkiye Florasında tür düzeyinde temsil edilen *Fibigia eriocarpa*, *F. clypeata* türüne aktarılmıştır. Ayrıca *Fibigia* cinsinin deskripsiyonu ve teşhis anahtarı revize edilmiştir (Tuştaş 2008).

### 2.3. Genetik Markörler

Genetik markör bir kromozom ya da kromozom bölgesinin ebeveynlerden bir sonraki generasyona geçerken takip edilebilen kısmı olarak tanımlanabilir (Bovenhuis & Meuwissen, 1996).

## Genetik Markör Çeşitleri

Genetik Markörler üç ana başlık altında toplanabilir. Bunlar;

- a. Morfolojik markörleri
- b. Protein markörleri
- c. DNA markörleridir.

### 2.3.1. Morfolojik markörler

Günümüzde moleküler tabanlı araştırmalardan elde edilen veriler genetik markörler olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ancak genetik markörler içinde en eski ve en yaygın kullanılanı ise hala morfolojik markörlerdir. Ucuz olmaları, hızlı ve basit bir şekilde tanımlanabilmeleri en önemli avantajlarıdır (Bretting & Widrechner 1995).

Sistematikte bitkinin hayat formu, kökü, gövdesi, yaprağı, çiçeği, meyvesi, tohum ve polen özellikleri morfolojik markörler olarak kullanılmaktadır.

*Verbascum* L. cinsinin (A) grubunda yer alan *Verbascum naticum* (Fisch. & Mey.) Hub.-Mor. (Scrophulariaceae) türüne ait örneklerin filament tüy rengi, kapsül şekli ve plasenta tipi karakterleri esas alınarak taksonomik pozisyonu değerlendirilmiştir (Bağcı & Çakır 2005).

*Cardamine quinquefolia* (M. Bieb.) Schmalh, *Nasturtium officinale* R.Br., *Isatis*, *Alyssum pateri* Nyar. ve *A. praecox* Boiss. & Bal. türlerinin polen morfolojileri farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Aytuğ 1971, Doğan & İnceoğlu 1990, Vural & İnce 1994).

*Alyssum obtusifolium* Steven ex DC. türünün anatomik ve palinolojik özellikleri belirlenmiş ve polen yapısının trikolpat olduğu rapor edilmiştir (Orcan & Binzet 2003).

15 *Draba* L. türünün 54 populasyondan toplanan örneklerinin tohum ve polen mikromorfolojisi çalışılmıştır. Bütün bireylerde geçerli olmamasına rağmen polen büyüklüklerinin kromozom sayısı ile kuvvetli ilişkisi olduğu rapor edilmiştir (Brochmann 2008). Brassicaceae familyasının *Arabideae*, *Euclidieae*, *Hesperideae*, *Lunarieae*, *Matthioleae* ve *Sisymbrieae* tribuslarında yer alan 45 taksonun nümerik analizleri tohum, polen ve morfolojik özelliği kullanılarak yapılmıştır (Khalik ve ark. 2002).

*Atelanthera* Hook.f. & Thoms., *Arcyosperma* O.E. Schulz. ve *Sisymbrium* L. (*Brassicaceae*) cinslerine ait toplam sekiz örnekte ışık mikroskobu ile polen morfolojisi çalışılmıştır. Çalışılan örneklerin detaylı polen özellikleri verilmiştir (Khan 2005). *Eruca* Miller ve *Diplotaxis* DC. cinsine ait toplam 20 taksonun tohum yüzeyinin özellikleri SEM ile incelenmiştir (de Leonardis ve ark. 1997).

*Hesperis turkmenaghensis* A.Duran & A.Ocak türünün tohum yüzeyi SEM ile incelenmiştir. Bu türün tohum yüzeyinin reticulate-verrucate olduğu rapor edilmiştir (Duran & Ocak 2005).

Türkiye'nin farklı lokalitelerinden toplanmış *Aethionema* L. cinsinin 17 türünde tohum yüzeyi ışık mikroskobu ve SEM ile incelenmiştir (Pınar ve ark. 2007).

*Rorippa sylvestris* (L.) Bess. türüne ait polenler SEM ile çalışılmıştır. Bu türün polenlerinin yüzey ornemantasyonu reticulate olarak gözlenmiştir ve polenlerin 3, 4 ya da pantokolpate olduğu rapor edilmiştir (Hsieh 2005).

*Coronopus didymus* (L.) Smith, *Cheiranthus cheiri*, *Eruca sativa* ve *Iberis amara* L. türlerinin polen morfolojisi ışık mikroskobu ile çalışılmıştır. Bu türlerin yüzey ornemantasyonu retikulate olarak bulunmuştur. Ayrıca polenlerin trikolpat ve prolate, prolate-spheroidal, subprolate olduğu rapor edilmiştir (Khan 2005).

*Arabidopsis* (*A. lasiocarpa* (Hook.f. & Thoms.) Schulz, *A. mollissima* (C.A.Mey.) N.Busch, *A. pumila* var. *pumila* (Steph.) Busch, *A. pumila* var.

*graffithiana*, *A. stricta* (Camb.) N.Busch, *A. taraxacifolia* (T.Anders.) Jafri, *A. thaliana* (L.) Heynh., *A. wallichii* (Hook.f. & Thomson) N.Busch) cinsine ait sekiz taksonun polen özellikleri ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Bu taksonların polen yüzey ornemantasyonu retikulate olarak bulunmuştur. Ayrıca polenlerin 3–4 kolpat olduğu rapor edilmiştir (Khan 2004).

*Biscutella* L. cinsinin 52 taksonunun yaprak tüy karakterleri stereo mikroskop, SEM ve lup ile araştırılmıştır (Olowokudejo 1992).

### 2.3.2. Protein Markörleri

Protein markörleri, depo proteinleri ve enzimler olarak iki ana gruba ayrılırlar.

Depo proteinleri bir jel üzerinde hareket ettirilip boyandıklarında, farklı genotiplerde ortaya çıkan yapı farklılıkları, genetik markör olarak kullanılabilir. Buğday tohumunda bulunan iki depo protein grubu olan gliadin ve glutenin bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. En önemli avantajları analizlerinin çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasıdır. En büyük dezavantajları ise sayıca çok az olmalarıdır (Yıldırım & Kandemir 2001).

Enzim markörleri alloenzim ve izoenzim olarak iki grup altında incelenebilir (Yıldırım & Kandemir 2001).

İzoenzimler, aynı bireyde bulunan benzer veya aynı göreve sahip aynı enzimin farklı varyantları olarak belirlenip tanımlanmıştır (Markert & Moller 1959).

Organizmaların izoenzimlerine bağlı benzerlik veya farklılıkları, bu materyallerin taksonomik ve metabolik benzerlikleri ile de bilgi verebilmektedir. İzoenzimlerin farklılığı elektroforez tekniği kullanılarak nitelik ve nicelik yönünden tespit edilir (Gülen ve ark. 2002).

Peroksidaz, izoenzimlerin çok geniş bir grubunu oluşturmakta ve çok sayıdaki fizyolojik olayda doğrudan veya dolaylı olarak görev almaktadır. Bu fizyolojik

olaylar bitkilerde yaşlanma, ölüm, ligninleşme, tepe tomurcuğunun baskınlığı (dominansı), soğuk toleransı, dinlenme, meyve gelişimi ve olgunlaşması, çimlenme, büyüme ve gelişme, yumru oluşumu, cinsiyet farklılaşması şeklinde özetlenebilir (Gaspar ve ark. 1982, Gülen ve ark. 2002, Walter 1992 ).

Alloenzim, birbirinden ayırt edilebilen allelleri bulunan enzimleri ifade etmektedir. Alloenzimler aynı genin farklı allelleri tarafından meydana getirilmektedir (Yıldırım & Kandemir 2001).

Enzim markörlerinin analizlerinin çabuk, ucuz ve güvenilir olması gibi bazı avantajları vardır. En belirgin dezavantajları ise sayılarının çok az olmasıdır. Diğer bir dezavantajı ise bazı alloenzimlerin özel dokularda ve belli bir gelişme döneminde gözlemlenebilir olmalarıdır (Van den Berg ve ark. 1983, Yıldırım & Kandemir 2001).

### **2.3.3. DNA Markörleri**

DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markörlerdir. Nükleik asit temeline dayalı genetik markörlerin genom analizlerinde kullanımı ıslahçılar için ihtiyaç duyulan bir alandır. Bu markörler kullanılarak genetik varyasyon araştırılabilir. Örneğin birbirine çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlaması yapıp, filogenetik akrabalıkları bulunabilir (Lowe ve ark. 1996, Yıldırım & Kandemir 2001, Parmaksız 2004). Doğadaki yabani varyetelerin moleküler düzeyde tanımlanması, ekonomik değeri olan çeşitlere yeni ve üstün özellikler kazandırılması açısından da önemlidir (Bothmer ve ark. 1991, Parmaksız 2004). Moleküler markör teknolojileri, bazı bitki türlerinin ıslahı ve gen kaynaklarının korunması konusunda araştırma yapan bilim adamlarına yeni ufuklar açmıştır (Boskoviç & Tobutt 1996).

DNA markörlerinin en önemli avantajları; stabil olmaları, tüm dokularda ortaya çıkabilmeleri ve epistatik etkilere hassas olmamalarıdır. DNA markörleri dominant ya da kodominant özellikte olabilir (Parmaksız 2004, Williams ve ark. 1990).

DNA markörleri temelde iki grup altında incelenebilirler.

a. Hibridizasyon tabanlı markörler (DNA melezleme markörleri)

b. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı markörleri

### **2.3.3.1. Hibridizasyon Tabanlı Markörler**

Genomda istenilen bir DNA parçasının yerini belirlemek ve bu parçaların nükleotid dizilerini araştırmak amacıyla çeşitli şekillerde işaretlenmiş bir prob DNA ile bu parçaların hibridize edilmesi temeline dayanır. Hibridizasyon bantlarına bakılarak DNA seviyesindeki farklılıklar tespit edilebilir. Bu teknik, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi ile PCR teknolojisinin yaygınlaşmasından önce çok yaygın kullanım alanı bulmuştur (Yıldırım & Kandemir 2001).

### **2.3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayanan Markör Teknikleri**

Tüm dünyada canlıları oluşturan genetik yapının çözülmesi, ortaya çıkarılan bu yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, işlevlerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Bu amaç doğrultusunda, belirlenen hedefe ulaşmayı kolaylaştıracak, hızlandıracak yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Basit gibi görünmekle birlikte, geliştirilen bu yöntemlerin en önemlilerinden birisi Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Polymerase Chain Reaction", PCR)'dur (Ceyhan 2005).

1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketinde çalışan Kary Mullis tarafından geliştirilen metod, nükleik asitlerin canlı organizma dışında da, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanır (Ceyhan 2005). Son yıllarda özellikle 1980'li yılların başından itibaren, genetik materyaller üzerindeki çalışmalar, nükleik asit karakterizasyonunda, moleküler klonlamada, sekans analizlerinde, rekombinant teknolojisinde ve klinik uygulamalarında nükleik asit tabanlı problemlerden yararlanma olanakları giderek artmıştır. Ayrıca prokaryot ve ökaryotların

genomlarındaki modifikasyonlar, restriksiyon analizleri ve sistemleri üzerinde de son zamanlarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Saiki ve ark. (1985), mevcut yöntemlerin duyarlılıklarının artırılmasından çok, DNA veya RNA baz sıralarının sayısal olarak artırılması (amplifikasyon) teknolojisine dayanan ve dolayısıyla mevcut yöntemlerin analiz edilebilmelerini sağlayan, Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (PCR) geliştirmişlerdir (Arda 2000).

PCR'in geliştirilmesi moleküler teknolojinin kullanım alanının da genişlemesine yol açmıştır. PCR son yıllarda, biyomedikal araştırmaların yanı sıra infeksiyöz ajanların teşhisinde, epidemiyoloji, genetik defektlerin saptanmasında, adli tıp ve diğer alanlarda da geniş bir uygulama ortamı bulmuştur (Arda 2000).

### **PCR' nin İşleyiş Mekanizmaları**

PCR çalışmaları başlıca üç aşamada gerçekleştirilir. Bunlar;

1. Hedef DNA'nın denatürasyonu: Çoğaltılacak DNA ve DNA'nın çoğalmasını sağlayacak enzimle beraber diğer gerekli materyaller (magnezyum, tampon çözelti, primerler, PCR suyu) mikrofüj tüplerine konduktan sonra cihaza yerleştirilir. Cihaz sıcaklığını otomatik olarak 95 °C'ye yükseltir ve DNA'ların denatürasyonu (nükleik asitin iki iplikçığının birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi) sağlanır. Bu işlem için gerekli süre değişmekle beraber genellikle 3–5 dakikadır.
2. Primerlerin bağlanması: Hedef DNA'nın denatürasyonu gerçekleştikten sonra PCR'in sıcaklığı primerin bağlanma sıcaklığına düşer ve ortamda bulunan primerlerin hedef DNA üzerindeki özel sekanslara bağlanması gerçekleştirilir. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3–5 dakikada gerçekleşir.
3. Polimerizasyon: Primerlerin bağlanmasından sonra cihazın sıcaklığı 70–72 °C'ye çıkartılır. Bu sıcaklıkta tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan polimeraz enzimi, 5'- 3' yönünde olmak üzere, ortamdaki nükleotidleri kullanarak, primerlerin 3'-terminusuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Polimerizasyon reaksiyonunda,

hedef DNA'nın tek iplikçik sekansları kalıp ödevi görür. Bu süre de yaklaşık 3–5 dakika sürmektedir (Arda 2000).

Böylece PCR'in üç aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10–15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması tamamlanır. Tekrar ısının 95°C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25–30 kez tekrarlanması durumunda tek bir hedef DNA segmenti,  $2^n$  formülüne göre, yaklaşık 33,6 milyon çoğaltılmış olur. Ancak deney koşullarında gerçekleşen verim oranı %85 kadardır. Verimin düşmesinde, tekrar sayısının artması, enzimin tanınması gereken nükleotid sayısının fazla olması, tekrarlanan sıcaklık değişiklikleri ve sıcaklık artışları etkili olmaktadır. *Taq polimeraz* enziminin yaklaşık, her 1000 nükleotidde bir nükleotid kadar hata yapması, sentezlenen yeni cDNA'ya yanlış nükleotidlerin girmesine de yol açmaktadır. Hata oranı (m),  $m=2f/c$  formülü ile hesaplanmaktadır (f: nükleotidlerin zincire katılmasındaki hata ve c: dönem sayısı) (Arda 2000).

PCR yöntemi kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Bu alanlar şöyle özetlenebilir:

1. Genetik bozuklukların belirlenmesinde
2. Adli tıpta
3. Mikrobiyolojik çalışmalarda
4. Prob oluşturulmasında; klonlamada; gen tanımlaması araştırmalarında
5. Bilinmeyen dizilerin tayininde

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin kullanılması ile RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat) ve AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) markör metotları da geliştirilmiştir ( Vos ve ark. 1995, Tautz 1989, Botstein ve ark. 1980, Bornet & Branchard 2001). Ayrıca son zamanlarda PCR tabanlı bir markör olan ISSR ile de çalışmalar yapılmaktadır (Zietkiewicz ve ark. 1994, Bornet & Branchard 2001)

### 2.3.3.2.1. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) yöntemi; 9–10 baz uzunluğundaki rasgele oligonükleotidlerin (primerlerin) kalıp DNA'nın iki iplikçiği üzerinde, birbirine karşı iki farklı noktada tamamlayıcılarını bularak, bu ara bölgenin çoğaltılmasını esas alan nükleotid dizi polimorfizminden oluşmaktadır. Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil bir primer kullanılmaktadır. Ancak bu primer her iki yöndeki DNA üretimi için de kullanılmaktadır. Dolayısıyla kullanılan primerin DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye yapışabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılmaktadır. Amplifikasyonu yapılan DNA parçaları bir agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde farklı bireylerde DNA'nın bazı bölgelerinin üretildiği bazılarında ise üretilmediği gözlenmektedir (Williams ve ark. 1990, Welsh & McClelland 1990, Ergül 2000, Yıldırım & Kandemir 2001).

RAPD yöntemi basit ve ucuz olduğu için çok tercih edilmektedir. Bu yöntem çoğunlukla sistematik çalışmalarda, gen akışının analizinde, hibrit çalışmalarında ve karışık genom örneklerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kısa primerlerin ve düşük annealing sıcaklıklarının kullanımı, primerlerin genom içinde rasgele bölgeleri çoğaltmasına neden olur. Fertler arasındaki nükleotid dizilimi farkından oluşan polimorfizm, RAPD bantlarının bulunma durumuna göre belirlenir. RAPD'ler dominant genetik markör olarak kabul edilir ve gen haritasının çıkarılmasında dikkate alınır (Çiftçi 2004).

Bu teknik için asıl sorun oluşan bant sayısının, kullanılan DNA'nın kalitesine, PCR sıcaklık profiline ve reaksiyon kondisyonuna bağlı olarak hassasiyet göstermesidir. Hatta bazı araştırmacılara göre RAPD parmak izi özelliğinin, kullanılan polimeraz enziminin tipine göre de farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Bu parametrelerin hepsi kontrol altına alınsa bile RAPD yönteminin diğer bir dezavantaj ise homozigot ve heterozigotluğun tespit edilememesidir (Çiftçi 2004).

RAPD markörleri genetik bağlantı haritalarının oluşturulması, gen işaretleme, çeşit (hat) tanımlaması, yerel çeşitler (hatlar) arası genetik farklılık ve filogenetik

araştırmalarda kullanılmaktadır. RFLP tekniğiyle karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde polimorfizm belirlenmesinden dolayı özellikle tür içi genetik çeşitlilik çalışmalarında da çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Karp & Edwards 1995).

#### **2.3.3.2.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP )**

Bu teknikte genomik DNA iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotit dizilişi sentetik olan adaptör DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik DNA'nın nükleotit dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'lar kullanımıyla spesifik DNA oğaltımı yapılır (Yıldırım & Kandemir 2001). Yöntem RFLP ile RAPD yöntemlerinin bir karışımı gibidir. RFLP'de olduğu gibi spesifik kesim yapan restriksiyon enzimleri ile kesim yapılır, bu kesim bölgelerine ait bilginin de kullanımı ile PCR yöntemi RAPD'de olduğu gibi genomun bilinmeyen bölgelerinde çoğaltım gerçekleştirilir.

#### **2.3.3.2.3. Simple Sequence Repeat (SSR)**

Mikrosatellitler genom içerisinde tekli, ikili, üçlü ya da dörtlü nükleotid permutasyonların herhangi biri şeklinde rasgele tekrarlanan (tandem repeated) kısa DNA sekanslarıdır (Ellegren 1993).

Mikrosatellitler ilk olarak insanlarda tanımlanmıştır. Daha sonra fareler ile çalışılmıştır (Litt & Luty 1989, Weber & May 1989, Love ve ark. 1990).

İlerleyen yıllarda domuzlarda ve sığırlarda da mikrosatellitler tespit edilmiştir. Bitkilerde birçok tür için oldukça önemli olan bu markörlerin başarılı bir şekilde izole edilmesi ve uygulanmasına başlamıştır (Johansson ve ark. 1992, Kemp ve ark. 1993).

Bitkiler âleminde ilk çalışmalar tarla bitkileri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu bitkiler ve çalışmalar şöyledir; soya bitkisi, pirinç, arpa ve buğday bahçe bitkilerinden ise zmde, orman ağaçlarından ise meşe, okalpts ve Swietenia humilis üzerinde çalışılmıştır (Zhao & Kochert 1993, Akkaya ve ark. 1992, Morgante & Olivieri 1993, Wu & Tanksley 1993, Maroof ve ark. 1994, Roder ve

ark. 1995, Thomas & Scott 1993, Dow ve ark. 1995, Byrne ve ark. 1996, White & Powell 1997). Mikrosatellit lokuslar kodominant markörlerdir yani heterozigotlar homozigotlardan ayırt edilebilir ve PCR (polymerase chain reaction) kullanımı ve allellerin jel üzerine seperasyonunun yapılmasıyla tüm genetik bilgilere ulaşmak mümkündür. Elde edilen bu veriler istatistik programlar aracılığıyla test edilerek söz konusu mikrosatellitin herhangi bir verim özelliği ya da genetik hastalıkla ilişkili olup olmadığı belirlenir (Ün ve ark. 2000).

#### **2.2.3.2.4. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)**

1980'den bu yana PCR teknolojisinin de yardımıyla genom analizlerinde önemli ilerlemeler oldu. Bu ilerlemeler hızlı ve az miktarda DNA gerektiren markör protokollerinin gelişmesini sağladı. RAPD' ler, SSR' lar (mikrosatellit) ve AFLP' ler yaygın kullanılan PCR tabanlı markörlerdir (Williams ve ark. 1990, Tautz 1989, Vos ve ark. 1995). Ancak her markörün avantajları ve dezavantajları vardır. RAPD'nin dezavantajı tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır. AFLP'nin dezavantajı ise yoğun çalışma ve yüksek maliyet gerektirmesidir. Mikrosatellitlerin dezavantajı ise çalışmaya başlayabilmek için ön bilgi gerektirmesidir. Çalışılacak olan moleküler markör tekniğinin seçimi ise hem tekniğin tekrarlanabilirliğine hem de kolay uygulanabilir olmasına bağlıdır. 1994'lerden bu yana diğer tekniklerin dezavantajları gidermek üzere geliştirilmiş yeni bir markör tekniği olan ISSR kullanılmaktadır. Bu yöntem, ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rasgele dağılımlarını esas alan ancak RAPD yöntemine göre çok daha hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

ISSR markörleri genetik çeşitliliğin belirlenmesinde filogenetik çalışmalarda, genom haritalarının oluşturulmasında ve evrim biyolojisinde birçok bitkide uygulanan bir tekniktir.

### 2.2.3.2.5. Brassicaceae Familyası üzerine yapılmış bazı moleküler çalışmalar:

*Fibigia clypeata* türü üzerinde yapılan moleküler bir çalışmada kloroplast DNA'ları incelenmiş ve dizi analizleri ortaya konulmuştur (Koch ve ark. 2007). *Alyssum* L. cinsinin hiperakümülatör türlerinden biri olan *Alyssum bertolonii* Desv.'nin populasyonları arasındaki genetik polimorfizm kloroplast mikrosatellit (cpSSR) bölgeleri incelenerek araştırılmıştır (Mengoni ve ark. 2003). *Alyssum* cinsinin hiperakümülatör olan ve hiperakümülatör olmayan türlerinin filogenetik akrabalığı ve geographic dağılımı nrDNA'nın ITS bölgelerinden yararlanılarak tespit edilmiştir (Mengoni ve ark. 2003).

*Arabidopsis thaliana* model organizma olarak bilinmesine rağmen bu türün orijini ve tarihsel evrimi hakkında çok az bilgi vardır. *Arabidopsis* populasyonları arasındaki moleküler akrabalık polimorfik kloroplast markörleri kullanılarak araştırılmıştır (Provan & James 2003).

*Arabis petraea* (L.) Lam. ve *Arabis lyrata* L. türlerinin mikrosatellit bölgelerindeki polimorfizm, *Arabidopsis thaliana* için tasarlanan primerler kullanılarak araştırılmıştır (Treuren ve ark. 1997).

Avrupa'nın üç farklı bölgesinden toplanan *Alliaria petiolaris* (Bieb.) Cav. & Grande örnekleri ile Kuzey Amerika'nın sekiz farklı bölgesinden toplanan örnekler arasındaki genetik polimorfizm ISSR primerleri kullanılarak araştırılmıştır (Meekins ve ark. 2001).

*Brassica alboglabra* Bailey, *Brassica bourgeauii* (Webb) O.Kuntze, *Brassica montana* Pourret türleri arasındaki ve bu türlerin *Brassica oleracea* L. türü ile akrabalık düzeyini tespit etmek için nrDNA ISSR markörü ile cpDNA'sı ise RFLP markörü ile çalışılmıştır (Hu ve ark. 1998). *Brassica oleracea*'nin dokuz yabancı populasyonu arasındaki genetik polimorfizm RFLP-PCR ve ISSR-PCR markörleri kullanılarak incelenmiştir (Panda ve ark. 2003).

Brassicaceae familyasının *Thelypodieae*, *Sisymbrieae*, *Brassicaceae*, *Lepididae*, *Arabideae* tribuslarına ait bazı üyeleri arasındaki filogenetik akrabalık mat K ve chs genleri kullanılarak araştırılmıştır (Koch ve ark. 2001).

Cruciferae familyasının en büyük cinslerinden biri olan *Lepidium* L. cinsinin türleri arasındaki varyasyon sırasıyla ITS ve cDNA'sı incelenerek araştırılmıştır (Mummenhoff ve ark. 2004). *Draba* cinsi içerisindeki taksonomik problemleri çözmek için morfolojik markörler, izoenzim markörleri ve RAPD markörleri kullanılmıştır (Scheen ve ark. 2002). *Fibigia clypeata*'nın trnL intron bölgeleri sekanslanmış ve bu bölgelerin gen sekansları NCBI gen bankasına verilmiştir.

*Lepidium* cinsinin trnT-trnL, trnL-trnF ve cpDNA trnL intron bölgeleri Mummenhoff ve ark. (2001) tarafından çalışılmıştır.

*Raphanus sativus* L. ve *Raphanus raphanistrum* türlerine ait yedi örnek arasındaki moleküler akrabalığın tespit edilmesi için RAPD yöntemi kullanılmıştır (Kamel ve ark. 2004).

Türkiye'de yetişen ve nikel hiperakümülatör özellik gösteren bazı *Alyssum* türleri arasındaki genetik uzaklık RAPD yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Açık ve ark. 2004).

12 *Brassica* örneği ile beş *Arabidopsis thaliana* örneği arasındaki genetik benzerlik ISSR primerleri kullanılarak tespit edilmiştir (Bornet & Branchard 2004).

Amerika'ya (ABD) endemik olan *Physaria belli* türünün populasyonları arasındaki genetik çeşitlilik ISSR primerleri kullanılarak tespit edilmiştir (Kothera ve ark 2007).

*Brassica* türleri (*B. napus*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. rapa*) ile *Arabidopsis*, *Camelina* Crantz, *Raphanus* L. ve *Sinapis* L. cinsleri arasındaki genetik akrabalık dokuz SSR primeri kullanılarak araştırılmıştır (Flannery ve ark. 2006).

Halofit bir tür olan *Thellungiella salsuginea* (Pallas) O.E.Schulz ve *T. halophila* (C.A.Meyer) O.E.Schulz'nın mikrosatellit bölgelerindeki polimorfizmleri araştırılmış ve Genepop 3.4 programı kullanılarak populasyonların genetik analizleri yapılmıştır (Gao ve ark 2008).

Kloroplast DNA'sının trnF ve trnL bölgeleri kullanılarak *Arabidopsis*, *Boechera*, *Rorippa* Scop., *Nasturtium* R.Br. ve *Cardamine* L. cinsleri arasındaki filogenetik akrabalık incelenmiştir (Koch ve ark. 2005).

25 *Rorippa* türü arasındaki filogenetik akrabalık kloroplast DNA'sının trnL intron ve trn L/F bölgeleri kullanılarak araştırılmıştır (Bleeker 2002).

Capparaceae ve Brassicaceae familyaları arasındaki genetik ilişki kloroplast DNA'sının trnL-trnF ve ndhF bölgeleri kullanılarak araştırılmıştır (Hall ve ark 2002).

*Cardamine pratensis* L. kompleksinin biyocoğrafik tarihini ve filogenetik akrabalığını aydınlatmak için bu türün örnekleri protein markörleri ve moleküler markörler (RAPD, ITS, kloroplast DNA'sının kodlanmayan bölgeleri) ile incelenmiştir (Franzke & Hurka 2000). Diğer bir çalışmada *Cardamine amara* L., *C. pratensis* L. ve *C. raphanifolia* Pourret türlerinin filogenetik akrabalığını araştırmak için ITS ve AFLP markörleri kullanılmıştır (Marhold ve ark. 2004).

*Crambe* L. cinsine ait 27 türün filogenetik akrabalığını aydınlatmak için ITS bölgeleri kullanılmıştır (Ortega ve ark. 1999).

*Raphanus sativus* türünün örnekleri arasındaki genetik polimorfizm RAPD, ISSR ve SRAP primerleri kullanılarak araştırılmıştır (Wang ve ark 2008)

*Cochlearia* L. cinsinin ve yakın cinslerinin filogenetik akrabalığını çözmek için ITS sekansları kullanılmıştır (Koch ve ark. 1999).

*Pachycladon* kompleksinin (*Cheesemania fastigiata*, *C. stellata*, *C. wallii*, *C. latisiliqua*, *Pachycladon novae-zelandiae*, *Ischnocarpus novaezelandiae*, *I. exilis*) genetik farklılığı AFLP markörleri ile incelenmiştir (Heenan & Mitchell 2002).

### 3. MATERYAL VE METOT

Türkiye *Fibigia* cinsine ait örnekler 2006–2008 yıllarının vejetasyon sezonunda, doğal olarak yetiştikleri farklı lokalitelerden toplandı. Arazi çalışmaları kapsamında toplanan bu örnekler üzerinde moleküler ve nümerik analizler ile polen ve tohum yüzeyi (SEM- mikromorfoloji) çalışmaları gerçekleştirildi.

Moleküler çalışmalarda kullanılacak örnekler arazi ortamında silika jel içerisine alındı ve DNA izolasyonuna kadar örnekler silika jel içerisinde muhafaza edildi. Moleküler çalışmalarda materyal olarak *Fibigia* cinsine ait beş taksonun farklı lokalitelerinden toplanmış 16 örneği kullanıldı. Ayrıca dış grup olarak *Physoptychis haussknechtii*, *Bornmuellera cappadocica*, *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* taksonları kullanıldı (Çizelge 3.1).

Polen ve tohum yüzeyi (SEM) çalışmaları için, araziden toplanan veya herbaryum materyali haline getirilen örneklerin çiçek ve meyvesi kullanıldı. Mikromorfolojik çalışmaların yapıldığı tüm örneklerin toplayıcı numarası ve lokaliteleri çizelge 3.2’de verildi.

**Çizelge 3.1.** Moleküler çalışmada kullanılan örneklerin adı, toplayıcı numarası ve lokalite bilgileri

Toplayıcı no.	Tür adı	Lokalite
M.A. 26	<i>Fibigia suffruticosa-1</i>	B9 Van: Ereğ Dağı, Güney yamaçlar, step, 03.07.2007
M.Fırat 10189	<i>Fibigia suffruticosa-2</i>	B9 Van: Ereğ Dağı, 2400 m, 21.07.2007
M.A. 25	<i>Fibigia macroptera-1</i>	B9 Van: Ereğ Dağı, Güney yamaçlar, step, 03.07.2007
M.Fırat 10188	<i>Fibigia macroptera -2</i>	B9 Van: Bahçesaray, Serkani mevki, 1800 m, 38°09.931’N, 042°48.515’E
A.Duran 7465	<i>Fibigia macroptera -3</i>	B7 Elazığ: Baskil, Dügüntepe köyünün 2 km güneydoğusu, eğimli yerler, 1440 m, 13.06.2007
S.Tuştaş 1007	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>anatolica</i>	C6 Hatay: İskenderun. Arsuz. Gözcüler Beldesi yukarısı, serpantin taşlı yerler, 1350 m, 07.07.2007
Ö.Çetin 1001	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata-1</i>	C6 Osmaniye: Osmaniye-Yarpuz arası, yol kenarı, İncebel mevki, <i>Pinus nigra</i> orman açıklığı, 13.08.2006

Ö.Çetin 1002	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i> -2	C6 Osmaniye: Osmaniye-Yarpuz arası, Cebelibereket köyü yukarısı, eğimli yerler
A.Duran 7595	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i> -3	C5/6 Adana: Feke, Bahcecik-Develi dağ yolu, 1700 m, 17.07.2007, <i>Pinus nigra</i> açıklığı
M.Öztürk 1271	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i> -4	B5 Kırıkkale: Delice, Bayraklı-Sarıkaya arası, Gâvur deresi, vadi içi, eğimli taşlı yerler, 800–1000 m, 25.06.2007
A.Duran 7583	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> -5	C5 Adana: Feke-Mansurlu yolu, 10. km, <i>Pinus brutia</i> açıklığı, 960 m, 17.07.2007
A.Duran 7481	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> -6	C6 Gaziantep: Nurdağı-Gaziantep arası, Gaziantep'e 25 km kala, bağ kenarları, 1040 m, 37°19.256'N, 40°45.934'E, 15.06.2007
A.Duran 7643	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> -7	C5 Niğde: Ulukışla, Çiftahan-Pozantı arası, 2. km, tren yolu kenarı, 1000 m, 01.08.2007
A.Duran 8191	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> -8	C3 Antalya: Termessos Milli Parkı, Müze-kale kapısı yolu, 650 m, 12.05.2007
M.Öztürk 1273	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> -9	B6 Sivas: Akdağmadeni-Yıldızeli arası, vadi içi, eğimli taşlı yerler, serpantin, 25.06.2007
A.Duran 7648	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i> -10	B5 Kayseri: Tomarza, Aslantaş köyü yolu, Aslantaş'a 5 km kala, kalker kayalık, 1650 m, 38°20.930'N, 36°03.720'E, 06.08.2007
A.Duran 5171	<i>Aurinia saxatilis</i> subsp. <i>orientalis</i>	B1 Balıkesir: Altınoluk, Toyran köyünden-Kaz Dağı, 900 m, kaya çatlağı, 19.05.2000
M.Ünal 9619	<i>Bornmuellera cappadocica</i>	B9 Van: Gevaş ilçesi, Artos Dağı, zirve yamaçları, alpin step, 2740 m, 38 33 707 E, 43 36 008 N
A.Duran 6612	<i>Physoptychis haussknechtii</i>	B7 Sivas: Divriği-Zara yolu, Divriği çıkışı, soldaki vadi içi, 1150 m, eğimli çakıllı yerler, 39°23.93'N, 38°04.84'E

**Çizelge 3.2.** Mikromorfolojik çalışmalarda kullanılan örneklerin adı, toplayıcı numarası ve lokalite bilgileri

Toplayıcı no	Tür adı	Lokalite
<b>Polen çalışmaları için kullanılan materyaller</b>		
A.Duran 5300	<i>Fibigia clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i>	C6 Hatay: Dört Yol, Topaktaş yaylası, Mığrı zirvesi, Alpin kat, taşlı yerler, 2200 m, 18.06.2000
M.Dinç&Y.Bağcı 2961	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i>	C4 Karaman: Ayrancı, Çatköy Dümbelek arası, Bolkar etekleri, vadi içi, <i>Juniperus</i> açıklığı, kayalık, 1900 m, 10.06.2007
S.Tuştaş 1006	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	C6 Adana: Saimbeyli, Yardibi Köyü, yol kenarı, kayalık, 31.07.2006
A.Ünal 102	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	C4 Konya: Konya-Karaman, Karadağ, Dambaşı mevki, <i>Quercus</i> ormanı, 1750 m
M.Ünal 5195	<i>F. macroptera</i>	B9 Van: Küçük Erek Dağının güney yamaçları, step, 2600 m 18.05.2007
A. Duran 5195	<i>F. suffruticosa</i>	B9 Muş: Malazgirt, Mezra köyü yolu, 10. km, volkanik taşlı yerler, 1640 m, 26.05.2000

Tohum yüzeyi çalışmaları için kullanılan materyaller		
S.Tuştaş 1006	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	C6 Adana: Saimbeyli, Yardibi Köyü, yol kenarı, kayalık, 31.07.2006
A.Duran 7643	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	C5 Niğde: Ulukışla, Çiftehane-Pozantı arası, 2. km, tren yolu kenarı, 1000 m, 01.08.2007
A.Duran 7509	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i>	B1 Balıkesir: Edremit, Kazdağı, Kızılkeçili köyü, Gölcük mevki, <i>Pinus nigra</i> açıklığı, 740 m, 39°39.473'N, 26°54.375'E, 06.07.2007
S.Tuştaş 1007	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>anatolica</i>	C6 Hatay: İskenderun, Arsuz, Gözcüler beldesi yukarısı, serpantin taşlı yerler, 1350 m, 07.07.2007
S.Tuştaş1004	<i>F. macroptera</i>	B9 Van: Erek Dağı, 2200 m, 09.08.2006
A.Duran 7672	<i>F. macroptera</i>	B6 Kayseri: Sarız-Yalak (Yeşilkent), Binboğa Dağı, 1850 m, step, taşlı yerler, 07.08.2007
S.Tuştaş 1003	<i>F. suffruticosa</i>	B9 Van: Erek Dağı, 2200 m, 09.08.2006

### 3.1. Moleküler Metot

#### 3.1.1. Sterilizasyon

Çalışılan materyallerin ve laboratuvarın sterilizasyonu moleküler biyoloji çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. İyi sterilize edilmemiş malzemelerle çalışmak kontaminasyona neden olabilir. Kontaminasyonu önlemek amacıyla DNA izolasyonu sırasında kullanılan havan, havan topuzu, spatullar ve diğer malzemeler alüminyum folyo kullanılarak bütünüyle sarıldı. Sterilizasyon yöntemi olarak kuru hava ile sterilizasyon seçildi ve alüminyum folyo ile kaplanan malzemeler Pasteur (Pastör) fırınında (Sterilizatör) 121 °C de 3 saat arasında sterilize edildi. Ayrıca laboratuvar tezgâhları çalışmaya başlamadan önce %70'lik alkol ile temizlendi.

#### 3.1.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda hangi yöntemin kullanılacağı, çalışmanın amacı ve çalışılacak materyale göre belirlenir. Bu çalışmada DNA izolasyonu için 2XCTAB (cetil three metil amonyum bromid) ve Qiagen Kit metotları kullanıldı. Bu bölümde 2XCTAB ve Qiagen Kit yöntemlerinin DNA izolasyon basamakları ayrıntılı olarak verildi.

2XCTAB metodunda kullanılan ekstraksiyon çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanır:

2X CTAB Çözeltisinin Hazırlanması (125 ml)

NaCl	10.23 g
Tris 1M(pH=8)	12.5g
CTAB (cetil three metil amonyum bromid)	2.5g
EDTA (0.5 M)	5.0 ml
Sodyum bisülfid	0.63 g

Solüsyonun son hacmi deiyonize su ile 125 ml'ye tamamlandı. 2XCTAB solüsyonu izolasyonda kullanılmadan önce %1 hacim/hacim olacak şekilde  $\beta$ -mercaptoethanol ile karıştırıldı.

2X CTAB yöntemi ile gerçekleştirilen izolasyon aşamaları şöyledir;

1. Silika jel içerisinde saklanan materyaller hassas terazide 0.075 gr tartıldı.
2. Tartılan örnekler içi azot dolu havanlara ayrı ayrı konuldu.
3. Bu örnekler steril topuzlar aracılığı ile toz haline gelinceye kadar havanda ezildi.
4. Toz haline getirilen örnekler 2 ml'lik steril tüplere alındı.
5. Tüplerdeki örnekler üzerine 750  $\mu$ l 2XCTAB  $\beta$ -mercaptoethanol çözeltisinden ilave edildi.
6. Örnekler 65 derecelik blok ısıtıcıda 30 dakika bekletildi.
7. Blok ısıtıcıdan çıkarılan örneklerin üzerine 750  $\mu$ l kloroform: izoamil alkol (24:1) ilave edildi.
8. Örnekler santrifüj cihazına alınarak 25 °C'de, 7000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüje tabii tutuldu.
9. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı faz 1.5 ml'lik tüplere alındı.
10. Sıvı faz kısmı alınan tüplere tekrar 300  $\mu$ l kloroform: izoamil alkol (24:1) ilave edilerek 15000 rpm'de 5 dakika süreyle tekrar santrifüj edildi.

11. Tüplerin üst kısmında oluşan faz alınarak daha önceden alınan sıvı faza eklendi ve üzerlerine toplam hacmin 3/5 kadar izoamil alkol ilave edildi.
12. Oluşan yeni karışım tekrar 15000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. DNA pelleti oluşumu gözlendikten sonra pelleti düşürmeden tüplerdeki izoamil alkol döküldü.
13. Diplerinde DNA pelletleri bulunan tüplere 1 ml %70'lik etanol ilave edildi. Örnekler 5 dk süreyle 15000 rpm'de santrifüj edildi.
14. Tüplerdeki etilalkol DNA pelletine zarar vermeden tüplerden uzaklaştırıldı.
15. Kurumaya bırakılan pelletlerin üzerine daha sonra 100 µl 1XTE (Tris- EDTA Buffer) ilave edildi ve DNA'nın çözünmesi sağlandı.
16. Örnekler ağızları parafilmle sarılarak -20 derece derin dondurucuya kaldırıldı.

Qiagen Kit ile DNA izolasyon metodu çözeltisi aşağıda verilmiştir:

1. Silika jel içerisinde kurutulmuş her bir örnekten 0.04 g tartılarak bir havan içerisine kondu. Örneklerin üzerine sıvı azot dökülerek toz haline getirildi ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplere yerleştirildi.
2. Tüplere 400 µl Buffer AP1 ve 4 µl RNase stok çözelti eklendi ve tüpler vortekslendi.
3. Tüpler 65 °C sıcaklıkta 10 dakika bekletildi. Bu sırada tüpler 2 ya da 3 ters çevrilerek materyal iyice karıştırıldı.
4. Tüplere 130 µl Buffer AP2 eklendi ve karıştırıldıktan sonra 5 dakika buzun üzerinde bekletildi.
5. Tüpler 5 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Santrifüjden sonra karışım pipetle alınarak 2 ml'lik toplama tüpleri içerisindeki kolondan geçirildi ve 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Oluşan sıvı kısım pellet düşürülmeden yeni tüplere alındı.
8. Sıvı hacminin 1.5 katı kadar Buffer AP3/E eklendi ve karıştırıldı.
9. Elde edilen karışımdan 650 µl alınarak 2 ml'lik toplama türleri içerisindeki kolonlardan geçirildi ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan sıvı kısım tüplerden uzaklaştırılarak işlem tekrarlandı.
10. Santrifüjden sonra oluşan sıvı kısım ve toplama tüpleri atıldı.

11. Kolonlar 2 ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirilerek üzerine 500 µl Buffer AW eklendi ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Sıvı kısım uzaklaştırıldı.
12. Kolonlara 500 µl Buffer AW eklendi ve kolon membranının kuruması için 2 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi.
13. Kolonlar 1.5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı ve kolon membranı üzerine 100 µl Buffer AE eklendi. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Bu aşama tekrarlandıktan sonra tüpler içerisinde DNA çözeltisi elde edildi.

### 3.1.3. DNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Belirlenmesi

PCR çalışmalarının optimizasyonu ve standartlaştırılması için izolasyondan sonra DNA'ların kalitesi ve miktarı belirlenmelidir. DNA konsantrasyonları spektrofotometre ile hassas olarak ölçülebilir. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum absorbe etme özelliği taşıdığı için bu dalga boyundaki absorpsiyon derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür. DNA çözeltisi tarafından absorbe edilen UV ışınlarının miktarı doğrudan numunedeki DNA miktarına bağlıdır. Proteinler ise 280 nm dalga boyunda soğurum gösterirler. Buna göre, DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilecek değerler ile belirlenebilir. 260 nm OD ölçümünün 280 nm OD ölçümüne oranı DNA'da protein kontaminasyonu olup olmadığı hakkında bilgi verir.  $A_{260}/A_{280}$  oranının 1.8 ile 2.0 arasında olması beklenir. OD'nin 2.0'nin üzerinde olması protein kontaminasyonuna, 1.8'in altında olması da RNA kontaminasyonu olduğuna işaret eder. 1.0 birimlik bir optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir (Kesen 2008).

İzole edilen DNA çift iplikli ise, miktarının belirlenmesi için aşağıdaki formülden yararlanılır:

$$\text{DNA konsantrasyonu} = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{Sulandırım oranı} \times \text{Sabit Katsayı}$$

Ya da kısaca

$cDNA = A_{260} \times \text{Seyreltme Katsayısı} \times 50 \mu\text{g/ml}$

O.D.- Optik Dansite (260 nm’de okunan absorbans değeri).

S.K.- Sulandırma katsayısı.

50 - Çift iplikli DNA için her absorbanstaki  $\mu\text{g}$  DNA miktarı.

Çalışmamızda izole edilen örneklerin ölçümü Eppendorf marka 6131-Biophotometer cihazı ile yapıldı. Ölçümlerin kontrolünün yapılması için her örnek üç kez okundu. Ölçüm esnasında DNA örnekleri, 1  $\mu\text{l}$  DNA + 49  $\mu\text{l}$  su olacak şekilde 50 kat sulandırıldı.

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda DNA konsantrasyonu yüksek olan örnekler seçildi ve DNA konsantrasyonları 25 ng/  $\mu\text{l}$  olacak şekilde dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlardan eşit hacimde alınarak %1 lik agaroz jelde yürütüldü. Jel görüntüleri her bir örneğin DNA konsantrasyonunun eşit olduğunu destekledi.

### **3.1.4. PCR Bileşenlerinin Optimizasyonu**

#### **3.1.4.1. Primer Seçimi ve Konsantrasyonu**

Primerler kullanım amaçlarına göre 15–40 oligonukleotitten oluşan ve sentetik olarak hazırlanabilen tek iplikçikli spesifik DNA segmentleri olarak tanımlanabilir. DNA çoğaltımı esnasında primerler hedef DNA üzerinde kendine komplementer olan baz dizilerini bularak onlara bağlanır (Arda 2000). Primerlerin yapısında, GC bazların oranının belli bir seviyede bulunması ve primer uzunluğunun 18–30 baz çifti arasında olması amplifikasyonda nonspesifik bağlanmaları azaltır. Ayrıca PCR programında kullanılacak primerlerin  $T_m$  sıcaklığının doğru tespit edilmesi de çok önemlidir. Primerin  $T_m$  sıcaklığını hesaplamak için çeşitli formüller kullanılabildiği gibi bu sıcaklıklar primeri sentezleyen firmalar tarafından da hesaplanabilir.

Bu çalışmada yapılan ön denemeler sonucu polimorfik bant üreten ISSR primerleri seçilmiştir. Ayrıca firmadan gelen  $T_m$  sıcaklıklarının +5 ve -5 °C aralıkları

denenerek ideal Ta sıcaklığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ISSR primerleri ve sıcaklıkları çizelge 3.3’de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** ISSR amplifikasyonunda kullanılan primerler.

Primer	Primer Sekans	T <sub>m</sub> (°C)	SIZE (bp)	GC%	T <sub>an</sub>
ISSR M1	(AGC) <sup>6</sup> -G	63.1	19	68.4	63
ISSR M2	(ACC) <sup>6</sup> -G	63.1	19	68.4	63
ISSR M3	(AGC) <sup>6</sup> -C	63.1	19	68.4	63
ISSR M4	(CA) <sup>10</sup> -C	59.8	21	52.4	59
ISSR M5	(GA) <sup>9</sup> -C	56.7	19	56.7	56
ISSR M7	(AG) <sup>9</sup> -C	56.7	19	52.6	56
ISSR M8	(AC) <sup>9</sup> -G	56.7	19	52.6	56
ISSR M9	(AC) <sup>8</sup> -CG	56.0	18	55.6	55
ISSR M10	(AC) <sup>8</sup> -CCT	54.8	18	52.8	53
ISSR M11	(CAC) <sup>5</sup>	53.3	15	66.7	66
ISSR M12	(GACAC) <sup>4</sup>	61.4	20	60.0	61
ISSR M13	(CA) <sup>6</sup>	44.8	14	53.6	53
ISSR M14	(CA) <sup>6</sup> -RG	43.4	14	50.0	43
ISSR M15	(CA) <sup>8</sup> -AG	53.7	18	50.0	53
ISSR M16	(AC) <sup>8</sup> -GC	56.0	18	55.6	56
ISSR M17	CAG-(CA) <sup>8</sup>	56.7	19	52.6	56
ISSR M18	CGT-(CA) <sup>8</sup>	56.7	19	52.6	56

#### 3.1.4.2. Magnezyum Konsantrasyonu

Magnezyum konsantrasyonu primerin bağlanmasında, denatürasyonda, ürün spesifikliğinde, primer-dimer oluşumunda ve enzim aktivitesini etkilemede önemli rol oynar. Bu nedenle reaksiyonda önemli bir bileşeni oluşturur.

Bu çalışmada ticari olarak satılan ve konsantrasyonu 25 mM olan stok çözeltiler kullanıldı. Değişik Mg oranlarıyla yapılan PCR denemeleri sonucunda reaksiyon başına 2.5 µl Mg kullanılmasına karar verildi.

#### 3.1.4.3. Deoksiribonükleozid Tri Fosfat Konsantrasyonu

DNA sentezi sırasında serbest deoksiribo nükleozid tri fosfatlara ihtiyaç duyulmaktadır. dNTP’ler ya tek tek ya da mix halinde ticari olarak sağlanabilir.

dNTP'nin yüksek saflıkta bulunması, pH'nın 7 olması ve dNTP karışımında her bir nükleotitten eşit hacimde bulunması PCR çalışmalarında önemlidir. Bu çalışmada pH=7 olan 100 µM'lik her bir nükleotitten eşit miktarlarda alınarak hazırlanmış karışımdan tüp başına 0.4 µl kullanıldı.

#### **3.1.4.4. 10 X *Taq* DNA Polimeraz Tamponu**

Bu çalışmada MgCl<sub>2</sub> ve *Taq* DNA polimeraz enzimi ile set halinde gelmiş olan Bioron marka 10 X reaksiyon tamponundan reaksiyon başına 2.5 µl kullanıldı.

#### **3.1.4.5. *Taq* DNA Polimeraz Enzimi**

Bu çalışmada Bioron marka *Taq* DNA polimerazdan reaksiyon başına 0.3 µl kullanıldı.

### **3.1.5. PCR UYGULAMASI**

#### **3.1.5.1. PCR Karışımının Hazırlanması**

PCR'nin temel bileşenlerinin ve DNA konsantrasyonunun optimizasyonu yapıldıktan sonra PCR çalışmalarına başlandı. PCR çalışmalarında 0.2 ml'lik RNase ve DNase-free tüpler kullanıldı. Tüplere sırasıyla numara verildikten sonra 4 µl DNA ve 21 µl hazırlanmış olan PCR karışımı ilave edildi. PCR karışımı hazırlamak için RNase ve DNase-free 2 ml'lik tüpler kullanıldı. PCR karışımının hazırlanması ve dağıtılması buz üzerinde ve steril kabinde yapıldı. PCR karışımının kullanılan kimyasallar ve miktarları çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** PCR karışımının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları

PCR bileşenleri	PCR bileşenlerinin miktarı (tek tüp için)
DNA (25 ng/μl)	3 μL
Buffer (10x)	2.5 μL
dNTP karışımı (25 mM)	0.4 μL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 μL
Primer (50 pmol/ μl)	0.5 μL
Taq polimeraz (5 ünite/ μl)	0.3 μL
ddH <sub>2</sub> O (Steril)	15.8 μL

### 3.1.5.2. PCR Şartlarının Optimizasyonu

ISSR çalışmaları primerin yapışma ısısı üzerine odaklanan ve istenmeyen bağlanmaları azaltan Touch-Down PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. PCR 95 °C'de 3 dk denatürasyon ile başlayıp 94 °C'de 1 dk denatürasyon ve 72 °C'de 2 dk uzama evresini içeren 20 döngü ile devam etti. Bu döngüler esnasında her bir döngünün sıcaklığı 0.5 °C azaltılarak sıcaklık primerlerin bağlanma sıcaklığına düşürüldü. 20 döngünün tamamlanması ile 94 °C'de 1 dk denatürasyon ve 72 °C'de 2 dk uzama evresini içeren 20 döngü daha gerçekleştirildi. 72 °C'de 10 dk bağlanmanın tamamlanması ile PCR çalışması tamamlandı.

### 3.1.6. Elektroforez Uygulamaları ve Agaroz Jel Elektroforezi

Çalışmamızda kolay dökülebilir olması, örnekleri denatüre etmemesi nedeniyle agaroz jel kullanıldı. Ayrıca yürütme tamponu olarak TBE buffer seçildi. Elektroforez çalışmalarına başlamadan önce elektroforez çalışmasında kullanılacak stok çözeltiler hazırlandı.

### 3.1.6.1. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Stok Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.1.6.1.1. Jel Yükleme Tamponları

Jel yükleme tamponları üç amaç için kullanılır:

1. Örnek yoğunluğunu artırarak DNA'nın kuyulara batmasını sağlamak,
2. Örneğe renk vererek yükleme işlemini kolaylaştırmak,
3. İçerdikleri boyanın bir elektrik alanında tahmin edilen oranda anoda doğru hareket etmesini sağlayarak örneklerin katettiği mesafeyi tahmin etmek

Jel yükleme tamponu olarak bromofenol mavisi ve ksilen syanol FF boyalarını içeren 6X Jel Yükleme solüsyonu kullanıldı (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** 6X Jel Yükleme solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar

- 10 mM Tris-HCl
- %0.03 xylene cyanol FF
- %0.03 bromophenolblue
- %60 gliserol
- 60 mM EDTA

#### 3.1.6.1.2. DNA Bantlarının Boyanması

Elektrofrezle ayrılan DNA bantlarını görmenin en kolay yolu, DNA'yı boyamaktır. Bu amaçla flüoresans bir boya olan ve yaygın olarak kullanılan etidyum bromide kullanıldı. Ethidium bromidin ışık görmemesi için hazırlandıktan sonra alüminyum folya ile sarılı tüplerin içerisinde saklandı. Ayrıca çalışma esnasında çok dikkatli kullanıldı ve çalışma ortamına bulaşması engellendi.

#### 3.1.6.1.3. Yürütme Tamponu

Yürütme tamponu olarak TBE buffer kullanıldı (Çizelge 3.6). Buffer 10X stok çözelti halinde hazırlandı ve çalışma esnasında 1X olacak şekilde saf su ile sulandırıldı.

**Çizelge 3.6.** Tris-borik asit- EDTA çözeltisinin hazırlanması

10 X TBE tampon çözeltisi (1 litre için)	Miktar
Tris	108 gr
Borik Asit	55 gr
EDTA	50 ml

**3.1.6.2. Agaroz Jel Hazırlama ve Jel Görüntüleme**

1. 4 gr agaroz 200 ml 1X TBE tamponu içeren erlene ilave edildi ve mikrodalga fırına kondu.
2. Agaroz eridikten sonra soğumaya bırakıldı.
3. Çözelti içerisine 1.2 µl etidyum bromid eklendi ve ethidium bromidin jel içerisinde homojen karışması sağlandı.
4. Hazırlanan agaroz çözeltisi, taraklar yerleştirildikten sonra elektroforez tabağına boşaltıldı. Pipet ucu yardımıyla tabak içerisinde oluşan hava kabarcıkları alındı. Oda sıcaklığında 30–45 dakika katılaşmaya bırakıldı.
5. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı, tabak içerisinde tampon sıvının bulunduğu elektroforez tankına yerleştirdi. Tampon jelin en az 1 mm üzerinde olacak şekilde ayarlandı.
6. DNA örneklerinin bulunduğu 0.2 µl'lik eppendorf tüpe 6X jel yükleme tamponundan 3 µl ilave edildi ve boyanın PCR ürünü içerisinde karışması sağlandı. PCR ürünü ve boya karışımı mikropipet yardımıyla jel içerisindeki kuyucuklara boşaltıldı.
7. Elektroforez tankının kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynakları takıldı. Örnekler 60 volt akımda 2–3 saat yürütüldü.
8. 20 dakika aralıklarla transsilüminatörde jelden görüntü alındı.

**3.1.7. ISSR Bantlarının İstatistikî Analiz Programları İle Değerlendirilmesi**

Agaroz jel elektroforezi sonunda elde edilen bant desenleri, polaroid film üzerinde görüntülenerek kuvvetli, tekrarlanabilir ve polimorfik olan bantlar

değerlendirilmeye alındı. Taksonların karşılaştırılmasında, bantlar var (1) veya yok (0) esasına göre değerlendirildi. Genotipler arasındaki genetik uzaklıkları ifade eden dendrogram, NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1) programı ile gerçekleştirildi.

### **3.1.7.1. Kümeleme Analizi (Cluster Analysis-UPGMA)**

Son yıllarda biyologlar tarafından sıklıkla kullanılan kümeleme analizi bireyleri sahip oldukları bazı özelliklere göre aynı küme veya aynı grupta birleştiren bir metottur (Pınarkara 2007).

### **3.1.7.2. Temel Koordinatlar Analizi (Principal Coordinate Analysis)**

Bu yöntem bireyler arasındaki benzerlik ya da farklılıklara dayalı olarak kullanılan çok değişkenli bir istatistikî analiz metodudur. Benzerlik ya da farklılık matrisleri kullanılarak analizler gerçekleştirilir (Pınarkara 2007).

## **3.2. NÜMERİK METOT**

Türkiye’de doğal olarak yetişen *Fibigia* cinsine ait beş takson ile *Physoptychis haussknechtii* ve *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* üzerinde yapılan incelemeler sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesiyle taksonomik değer taşıyan 48 karakter belirlendi. Bu karakterler 7 x 48’lik veri tablosu şeklinde düzenlendi (Çizelge 3.7). Dış morfolojide kullanılan metrik karakterler için her bir türün ideal olarak belirlenmiş on örneği üzerinde yapılan ölçümlerin ortalamaları kullanıldı. Yapılan ölçümlerin aritmetik ortalamaları hesaplandı. Daha sonra bu değerler nümerik çalışmalar IBMpc’ler için yazılmış olan NTSYS-pc versiyon 2.1 programına aktarıldı ve veriler standardize edildikten sonra taksonların filogenetik yakınlıklarını yansıtan dendrogram oluşturuldu.

Çizelge 3.7. Nümerik taksonomide kullanılan morfolojik karakterler

No	Karakter	Karakter özelliği	No	Karakter	Karakter özelliği
	<b>Habit ve Tüy</b>		24	Çiçek sapı	Yükselici-0 Dik-1
1	Habitus	Yarı çalı-0 Otsu-1 Yarı çalı-otsu-2	25	Sepal	Tabanda kesecikli değil -0 Tabanda kesecikli-1
2	Kümelenme durumu	Kümeli-0 Kümeli değil-1	26	Sepal uzunluğu	mm
3	Dallanması durumu	Dallanmış-0 Dallanmamış-1	27	Sepal genişliği	mm
4	Tüyler	Çoğunlukla yıldızsı-0 Çoğunlukla bifurkat-1 Basit, çatalı, yıldızsı-2	28	Sepal tüy durumu	Bifurkat ve yıldızsı-0 Sadece yıldızsı-1 Çoğunluk bifurkat-2
			29	Petal rengi	Sarı-0 Menekşe-1
			30	Petal uzunluğu	mm
5	Gövde	Dik-0 Yükselici-1	31	Petal genişliği	mm
	<b>Yaprak</b>		32	Petal şekli	Ters yumurtamsı-0 Ters yumurtamsı- spatulat-1 Ters mızraksı-2
6	Taban yaprakları	Kalıcı-0 Kalıcı değil-1	33	Petal ucu	Küt-0 Hafif emerginat- küt-1
7	Taban yapraklar	Rozet formda-0 Rozet formda değil-1	34	Dış stamen	Kanatlı-0 Kanatlı-1
8	Taban yaprak kenarı	Düz-0 Düz ve dişli-1	35	Anter şekli	Ovate-0 Oblong-1
9	Taban yaprak uzunluğu	cm	36	Kotiledon	Inkumbent-0 Akumbent-1
10	Taban yaprak genişliği	mm	37	Stigma	İki loblu-0 Kapitat-1
				<b>Meyve</b>	
11	Taban yaprakların şekli	Ters mızraksı- spatulat-0 Dikdörtgens ters mızraksı-1 Dar ters mızraksı-2 Ters yumurtamsı- ters mızraksı-3	38	Meyve uzunluğu	cm
			39	Meyve genişliği	cm
			40	Meyve tüy durumu	Meyve tüysüz-0 Meyve tüylü-1
12	Taban yaprak ucu	Küt-0 Sivri-1	41	Meyve tüy şekli	Kısa yıldızsı tüylü-0 Bifurkat tüylü-1 Uzun basit ve bifurkat tüylü-2 Tüysüz-3
13	Taban	Belirgin-0	42	Meyve özelliği	Yassılaştırılmış-0

	yaprakların orta damarı	Belirgin değil-1			Şişkin-1 Bir dereceye kadar şişkin-2
14	Taban yaprakların tüy durumu	Yoğun tüylü-0 Yoğun tüylü değil-1			
15	Gövde yaprakları uzunluk	cm	43	Meyve şekli	Globose-0 Geniş eliptik-yuvarlak-1 Yumurtamsı-dikdörtgenimsi-2 Ters yumurtamsı-3
16	Gövde yaprakları genişlik	mm			
17	Gövde yaprak kenarı	Düz-0 Dişli-1			
				<b>Tohum</b>	
18	Gövde yaprak şekli	Dikdörtgensiz-0 Dar ters mızraksı-1 Şeritsiz-2	44	Her lokulustaki tohum sayısı	Bir-üç-1 Altı-sekiz-2 İki-dört-3 Üç-altı-4 10 yada daha fazla-5
19	Gövde yaprak ucu	Küt uçlu-0 Sivri uçlu-1 Acuminate-2			
	<b>Çiçek</b>		45	Tohum kanadı varlığı	Kanatlı-0 Kanatlı-1
20	Brakte durumu	Brakteli-0 Braktesiz-1			
21	Çiçek durumu uzunluğu	cm	46	Tohum kanat genişliği	Tohuma eşit-0 Tohumdan geniş-1 Tohumdan dar-2 Kanatlı-3
22	Çiçek durumu dallanması	Dallanmış (panicle)-0 Dallanmamış (raceme)-1			
23	Çiçek sapı uzunluğu	cm	47	Tohum rengi	Kahverengi-0 Yeşil- gri-1
			48	Tohum kanat yapısı	Mat-0 Şeffaf-1

### 3.3. MİKROMORFOLOJİK METOT

Araziden toplanarak herbaryum materyali haline getirilen çiçekli örneklerden Wodehouse metoduna göre polen preparatları hazırlanmıştır. Bu çalışmada Erdtman'ın palinolojik terminolojisi kullanılmıştır (Erdtman 1952, Wodehouse 1935).

#### 3.3.1. Polenlerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Wodehouse metoduna göre hazırlanan polen preparatları Olympus BX-51 araştırma mikroskobu ile incelenerek polen tanımlamaları yapılmıştır.

#### Wodehouse Metodu

1. Anterlerden alınan polenler temiz bir lam üzerine konuldu.
2. Üzerine reçine ve yağların erimesi için 2–3 damla %96'lık alkol damlatıldı.
3. Preparat ısıtıcı üzerinde alkol uçana kadar bekletildi.
4. Bazık fuksin eklenmiş gliserin-jelatin karışımından bir miktar alınıp polenlerin üzerine koyularak erimesi sağlandı.
5. Polenlerin dağılması için temiz bir iğne ile karıştırıldı.
6. Üzerine lamel kapatıldı.

Polenlerin mikroskopta yapılan morfolojik incelemeleri sonucunda polenlerin tanımları aşağıda belirtilen morfolojik özellikler dikkate alınarak yapılmıştır;

Polen tipi: polen üzerindeki apertürlerin şekil ve dizilişlerine göre verilen isim.

Polen şekli: Polar eksenin (P) ekvatorial eksene (E) bölünmesiyle bulunur.

Apertür: Ekzin üzerindeki yarıkçık (kolpat), delikçik (porat) veya hem yarıkçık hem de delikçik (kolporat)'ten meydana gelen olgun bir polende borucuğun salındığı zayıf kısımlardır.

Porların polar yöndeki uzunluğu (Plg) ile ekvatorial yöndeki uzunluğu (Plt) belirlendi.

### 3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Metodu

Türlere ait polen ve tohum örnekleri taramalı elektron mikroskobunda incelendi. Polenler için topladığımız örnekler ve çiçekli herbaryum materyalleri kullanıldı. Polenler stereo mikroskop altında üzerinde çift taraflı yapışkan bant bulunan stablar üzerine yerleştirildi. Aynı şekilde türlere ait olgun tohumlar da stablar üzerine yerleştirildi. Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde Poleron SC7620 sputter coater cihazıyla 9 A° kalınlığında altınla kaplanarak SEM ile taramaları yapıldı ve dijital resimleri çekildi.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. *Fibigia* cinsi taksonlarının genel özellikleri

Çok yıllık, otsu veya nadiren yarı çalimsı, dik veya yükselici,  $\pm$  yoğun yıldızsı, veya karışık basit-yıldızsı tüylü; gövde hafif açılı, yapraklı; yapraklar ters mızraksı veya ters yumurtamsı, tabanda daralmış, en alttakiler genellikle kısa saplı; yaprak kenarları tam, dalgalı (sinuat) veya düzensiz dişli veya loplu. Çiçeklenme seyrek dallı, başlangıç formu yoğun şemsiyemsi salkım (korimbus) oluşturur, çoğu zaman en üst gövde yaprakları çiçeklenmeyi geçer, ana eksen (rachis) döllenme sonrasında hızlı uzar; sepaller dik, dar dikdörtgensel veya yumurtamsı, tabanda sakkat; petaller sarı veya morumsu-kırmızı, dar ters yumurtamsı, tabana doğru dereceli olarak daralır, fakat klavani daralmaz; stamenler 6, dış filamentler çoğu zaman küçük dişli, içtekiler uca doğru belirgin genişlemiş ve yassılaştırmış; ovaryum dar yumurtamsı, 4-18 ovüllü; stigma kapitat. Silikula büyük, eliptik veya hemen hemen dairemsi, yassılaştırmış; valveler çoğu zaman yoğun pilos tüylü; septum parlak, kağıtsı; tohumlar hemen hemen dairemsi, kahverengi, yassılaştırmış, çoğu zaman kenarları belirgin kanatlı.

### Türkiye *Fibigia* cinsinin infragenerik sınıflandırması:

#### Section. *Fibigia*

*F. clypeata*

*F. macroptera*

#### Section. *Purpureae* A.Duran & Ö.Çetin Sect. nov.

Sepaller kısmen veya tamamen kırmızımsı-menekşe. Petaller kırmızı-morumsu. Yapraklar düz kenarlı, alt gövde yaprakları uzun petiollü, petiol 2.5–9 cm uzunluğunda. Silikula genişlemiş ters yumurtamsı ve tüysüz.

Type: *F. suffruticosa* (Vent.) Sweet

### *Fibigia* Cinsine Ait Türlerin Teşhis Anahtarı

1. Petaller morumsu-kırmızı; silikula tüysüz ..... **suffruticosa**
1. Petaller sarı; silikula açıkça tüylü

2. Silikula geniş eliptikten dairesele kadar, en az 14 mm genişliğinde; tohum kanadı tohumdan daha geniş ..... **macroptera**
2. Silikula dikdörtgen-eliptikten yumurtamsı-dikdörtgene kadar, genellikle 14 mm'den dar; tohum kanatlarının genişliği tohum genişliğinden az veya en fazla tohum genişliği kadar ..... **clypeata**

**Fibigia clypeata (L.) Medik.**

Çok yıllık otsu, tabanda odunsu. Gövde dik, 25–90 cm uzunluğunda, kümeli (2–7), çiçeklenme bölgesinde dallanmamış veya 2-3 dallı, yoğun bifurkat, trifit ve yıldızsı tüylü, bifurkat tüyler yıldızsı tüylerden genellikle daha uzun. Gövde yaprakları tabanda yoğun; alt gövde yaprakları mızraksı lineardan-dikdörtgenimsiye kadar, 3–6 x 0.4–1.2 cm (petiol dahil), kenarlar düz veya hafifçe dişli, uç ± obtuz, ana damar belirgin, kısa yıldızsı tüylü; orta ve üst gövde yaprakları lineardan ters mızraksıya kadar, petiolsüz, kenarları düz veya hafifçe dişli, kısa yıldızsı tüylü, uç obtuzdan akuta kadar. Çiçeklenme rasemöz, çiçekler braktesiz veya en alttaki birkaçı brakteli veya bütünüyle brakteli, brakte pediselden uzundur. Pedisel ± dik, (2-)3–5 mm uzunluğunda, bütünüyle yoğun yıldızsı tüylü. Sepaller 6–7 x 1.8–2.5 mm, yıldızsı tüylü, içtekiler hafif keseli (sakkat). Petaller dar ters mızraksı, 11–13 x 2–2.5 mm, sarı; dudak dar ters mızraksı, (5)6–7 mm; klav 5–6 mm, sepali geçmez. Dış filamentler aşağıda tek yönde kısa dişli veya dişsiz, iç filamentler dişsiz, 6–7 mm uzunluğunda; anterler ± linear, 1.5–2 mm uzunluğunda, sarımsı. stilus 1.5–3 mm, yoğun yıldızsı tüylü, kalıcı; ovaryum yoğun kısa basık yıldızsı tüylü. Silikula dikdörtgenimsiden hafif yumurtamsıya kadar, olgunlukta açılır, 17–32 x 10–15 mm, yoğun kısa yıldızsı tüylü veya kısa yıldızsı ve uzun basit, bifurkat tüylü, sık tüylerden dolayı grimsi beyaz görünüşte; septum bütünüyle zarsı. Bölmeler 6–9 tohumlu, her bir bölme içinde tohumlar iki sıralı, tohumlar kahverengi, kanatlarla birlikte 4–5 mm çapında, kanatsız 2–3.6 mm çapında, kanatlar zarımsı, 1.2–1.4 mm genişliğinde.

**Fibigia clypeata** türü iki alttüre (subsp.) ayrılır. Bu alttürlere ve anahtarı;

1. Gövde 30 cm den daha uzun; silikula dikdörtgensel-eliptikten ovat-oblonga kadar, en fazla 12 mm genişliğinde ..... subsp. **clypeata**
1. Gövde 30 cm den kısa, silikula hafif ovat, en az 13 mm genişliğinde..... subsp. **anatolica**

**Fibigia** subsp. **clypeata** iki varyeteye ayrılır. Bu varyeteler ve anahtarı;

Silikula kısa yıldızlı tüylü ..... var. **clypeata**

Silikula kısa yıldızlı, uzun basit ve bifurkat tüylü ..... var. **eriocarpa**

### **Fibigia macroptera** (Boiss.) Boiss.

Çok yıllık otsu, taban kısmı kısmen yarı çalimsı. Gövde  $\pm$  dik, 15–32 cm uzunluğunda, kümeli (3–7), nadiren tek, çiçeklenme bölgesinde dallanmamış veya nadiren 1–2 dallı, genellikle yıldızlı tüylü ve birkaç (seyrek) trifit tüylü. Alt gövde yaprakları dikdörtgensel veya ters yumurtamsı ya da ters mızraksı, 1.5–6 x 0.4–1 cm (petiol dahil), kenar düz, uç obtuz, yoğun kısa yıldızlı tüylü; orta ve üst gövde yaprakları dar dikdörtgensel, petiolsüz, kısa yıldızlı tüylü, genellikle düz, nadiren bir iki dişli. Çiçeklenme rasemöz, çiçekler braktesiz. Sepaller 7–8 x 2–2.5 mm, yıldızlı tüylü, içteki sepaller kesecikli. Petaller 9.5–10.5 x 1.5–2 mm, sarı. Dış filamentler dişsiz, 6–6.5 mm uzunluğunda, iç filamentler 6.5–7 mm uzunluğunda. Ovaryum yoğun kısa yıldızlı tüylü, meyve pediseli kısa yıldızlı ve uzun trifit tüylü, 2–4 mm uzunluğunda,  $\pm$  dik. Silikula yassılaştırmış, genişçe eliptikten yuvarlağa kadar, olgunlukta açılır, 20–30 x 13–20 mm, yoğun kısa yıldızlı tüylü; septum bütünüyle zarsı. Tohum kanatla birlikte 8–12 mm çapında, kanatsız 3–5 mm çapında, kanatlar zarımsı, 5–7 mm genişliğinde.

### **Fibigia suffruticosa** (Vent.) Sweet.

Çok yıllık otsu, taban kısmı kısmen yarı çalimsı. Gövde  $\pm$  dik. 25–50 cm uzunluğunda, zayıf kümeli (2–6), sertleşmiş eski yaprak kalıntıları tabanı örter, çiçeklenme bölgesinde dallanmamış veya nadiren 2–3 dallı, yoğun kısa yıldızsı tüylü. Alt gövde yaprakları dar ters mızraksıdan spatulata kadar, 5–18 x 0.5–1.5 cm (petiol dahil), kenar düz, petiol 2.5–9 cm uzunluğunda, orta ve üst gövde yaprakları linear ters mızraksıdan dikdörtgensiyeye kadar veya linear-mızraksı, kısa yıldızsı tüylü, düz kenarlı. Çiçeklenme rasemöz, bütün çiçekler braktesiz. Sepaller kısmen veya tamamen kırmızımsı-menekşe, 9–11 x 1.5–2 mm, yıldızsı tüylü. Petaller 12–16 x 3–4 mm, kırmızı-morumsu. Dış filamentler aşağıda tek yönde kısa dişli veya dişsiz, 5–7.5 mm, iç filamentler dişsiz, 7.5–10 mm. Ovaryum tüysüz. Meyve pediseli kısa yıldızsı tüylü, yükseliciden dike kadar, 6–24 mm uzunluğunda. Silikula genişlemiş ters yumurtamsı, 13–15 x 8–9 mm; septum bütünüyle zarsı. Tohumlar kahverengi, kanatlarla birlikte 4–8 mm çapında, kanatsız, 3–5 mm çapında, kanatlar yarı zarımsı, 1- 2.5 mm genişliğinde.

### **4.2. Mikromorfolojik Sonuçlar**

*Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonunun iki farklı lokaliteden toplanan örneklerinin polenleri SEM ile çalışıldı. İncelenen polenlerin yüzey ornamentasyonunun retikulate ve apertür tipinin de trikolpat olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). Wodehouse yöntemine göre hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda ölçümleri yapıldı. Polar eksen (P) 35.55  $\mu$ m, ekvatorial eksen (E) 29.91  $\mu$ m olarak ölçüldü. P/E oranı 1.18'dir ve polenler subprolate'dir. *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonunun iki farklı lokaliteden toplanmış tohum örnekleri SEM ile çalışıldı. Tohum yüzey ornamentasyonunun retikulate olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).

*Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa* taksonuna ait SEM ile incelenen polenlerin trikolpat olduğu tespit edildi. Polen yüzey ornamentasyonu retikulatedir (Şekil 4.1). Polar eksen (P) 25.6  $\mu$ m ve ekvatorial eksen (E) 15.54  $\mu$ m'dir. P/E oranı 1.64 ve polenleri subprolate şekildedir. *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa*

taksonunun iki farklı lokaliteden toplanmış tohumlar SEM ile incelendi ve tohum yüzeyi ornamentasyonu retikulate-pentagonal olarak gözlemlendi (Şekil 4.3).

*Fibigia clypeata* subsp. *anatolica* taksonuna ait polen apertür tipinin trikolpat olduğu tespit edildi. Polen ve tohum yüzeyi ornamentasyonunun retikulate olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2– 4.4). P/E oranı 1.8 ve polenleri subprolate şekildedir.

*Fibigia suffruticosa* türüne ait polen apertür tipinin trikolpat olduğu tespit edildi (Şekil 4.2). Polar eksen (P) 35.59 µm, ekvatorial eksen (E) 25.49 µm'dir. P/E oranı 1.64 ve polenler subprolate şekildedir. Polenlerin yüzey ornamentasyonu retikulatedir. *Fibigia suffruticosa* türünün tohum yüzeyinin retikulate-pentagonal olduğu tespit edildi (Şekil 4.4).

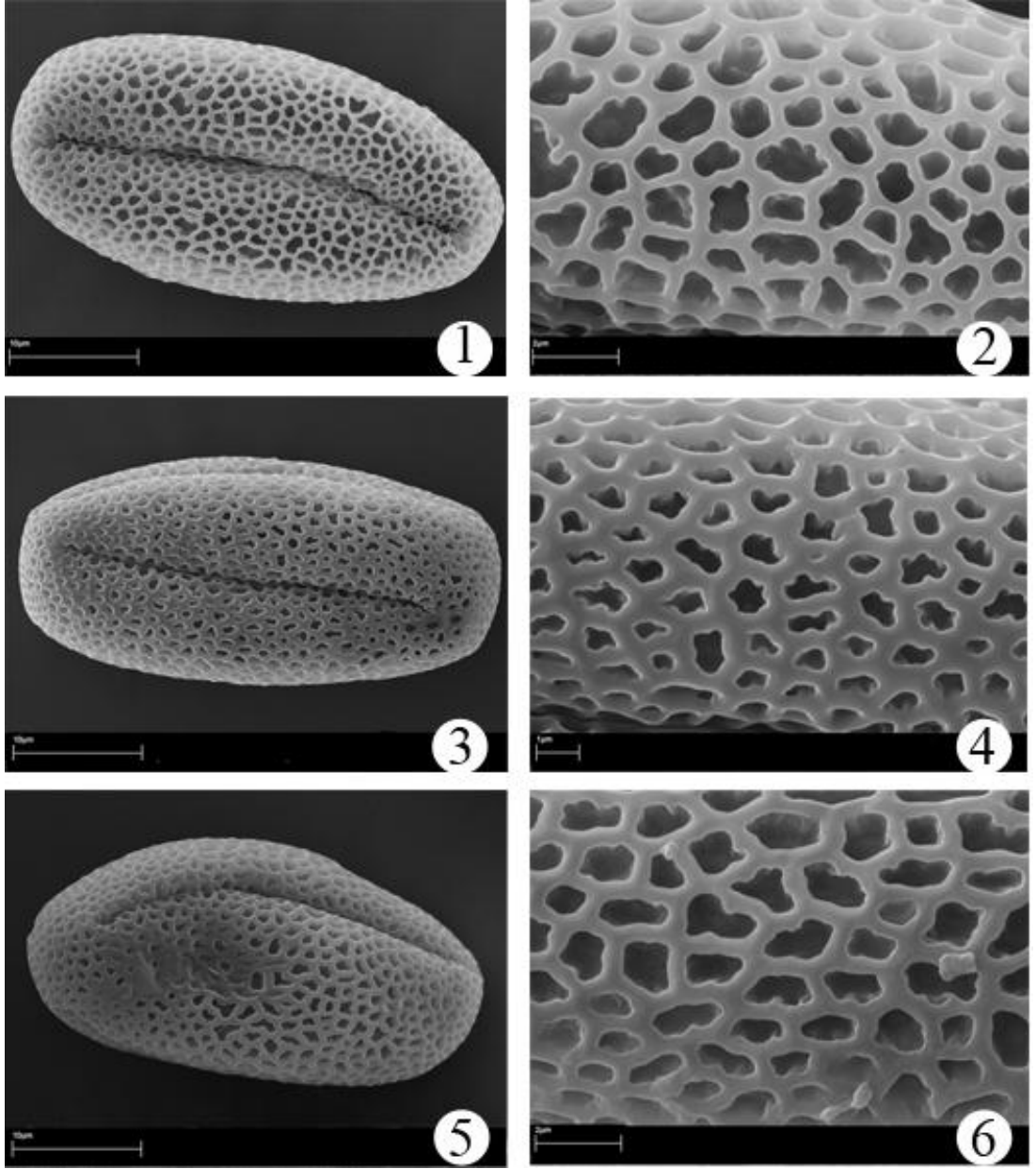
*Fibigia macroptera* türüne ait polenler trikolpattır (Şekil 4.2). Polar eksen (P) 40.01 µm, ekvatorial eksen (E) 31.35 µm'dir. P/E oranı 1.27 ve polenler subprolate şekildedir. Polenlerin yüzey ornamentasyonu retikulatedir. *F. macroptera* türünün iki farklı lokaliteden toplanmış örneklerinin tohum yüzey ornamentasyonu retikulate olup düzensiz rektangular ya da quadrangular görünüş hâkimdir (Şekil 4.4).

Brassicaceae familyası üyelerinin polen büyüklüğü, şekli, apertür sayısı çok fazla değişiklik göstermez. Bu familyanın üyelerinin polen yapısı genellikle trikolpattır ve yüzey ornamentasyonu retikulatedir (Erdtman 1972; Reile 1992; El Ghazali 1993). Ayrıca bu familyaya ait taksonların polen şekli genellikle prolatedir. Ancak bazı taksonlarda polen şekli subprolate ve prolate-spheroidaldir.

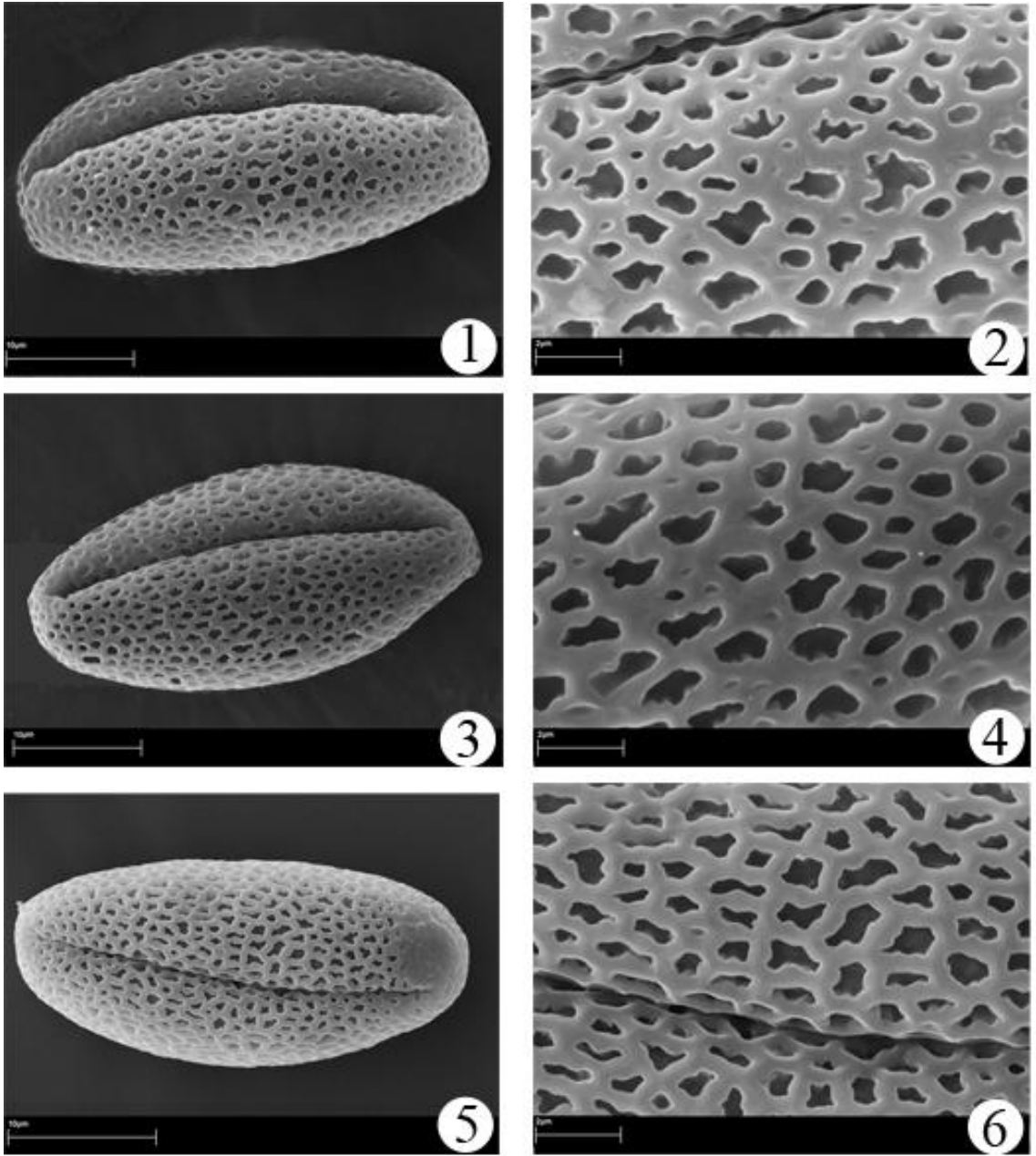
İnceoğlu ve Karamustafa (1977) Alyssum cinsine ait dört türün polen özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışmada polen tipinin trikolpat olduğu belirtilmiştir. Ayrıca polen şekli subprolate, subprolate-prolate ve prolate olarak tespit edilmiştir.

*Alyssum obtusifolium* türü üzerine yapılan bir çalışmada bu türün polen tipinin trikolpat olduğu, polen şeklinin ise subprolate olduğu rapor edilmiştir (Orcan & Binzet 2003).

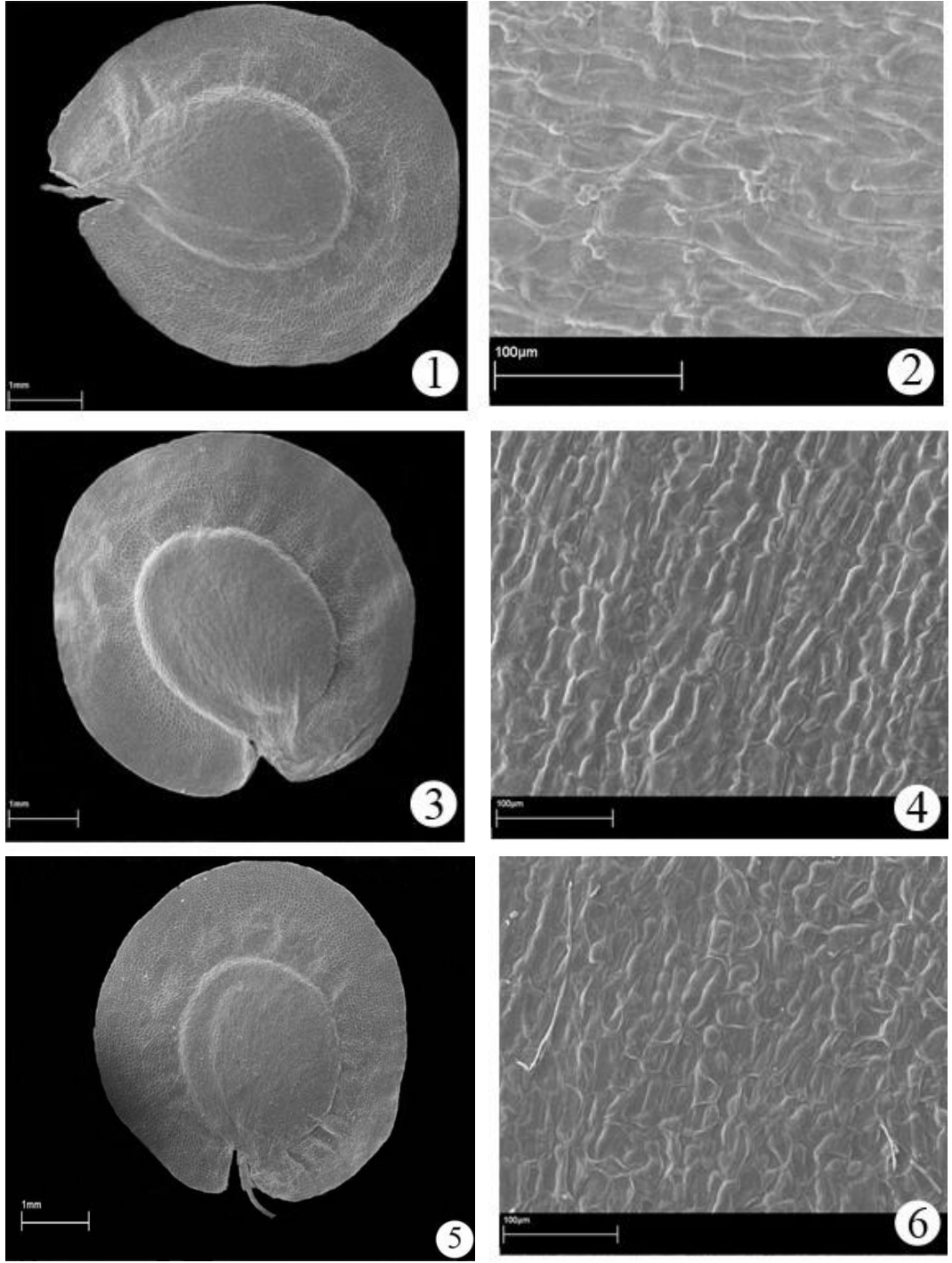
Bu tez çalışmasında incelenen taksonlar da mikromorfolojik özellikleri bakımından karşılaştırıldığında bu taksonların polen ve tohumlarının mikromorfolojik özellikleri taksonları ayırt edebilecek farklılıklara sahip değildir. *Fibigia* cinsine ait taksonların polenlerinin yüzey ornamentasyonunun retikulate olduğu ve polen tipinin trikolpat olduğu gözlemlendi. Işık mikroskobu ile yapılan ölçümler sonucunda polenler subprolate olarak belirlendi. Ayrıca *Fibigia* cinsinin tohum yüzey ornamentasyonunun retikulate olduğu belirlendi.



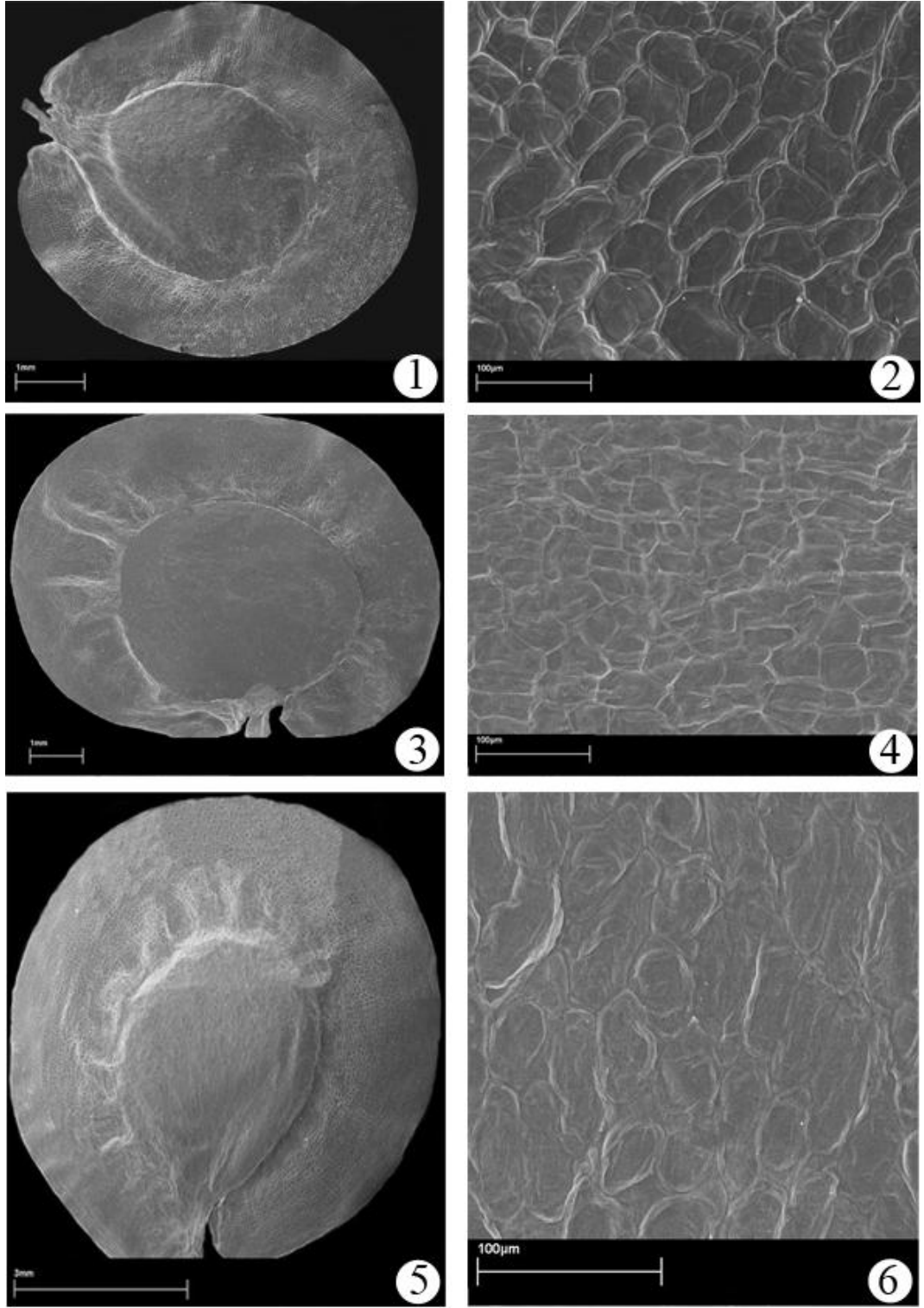
**Şekil 4.1.** *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa* taksonunun polen SEM görüntüsü: **1.** Genel görüntü, **2.** Detaylı görüntü. *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonunun polen SEM görüntüsü: **3,5.** Genel görüntü, **4,6.** Detaylı görüntü.



**Şekil 4.2.** *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica* taksonunun polen SEM görüntüsü: **1.** Genel görüntü, **2.** Detaylı görüntü. *Fibigia macroptera* türünün polen SEM görüntüsü: **3.** Genel görüntü, **4.** Detaylı görüntü. *Fibigia suffruticosa* türünün polen SEM görüntüsü: **5.** Genel görüntü, **6.** Detaylı görüntü.



**Şekil 4.3.** *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonunun tohum yüzeyi SEM görüntüsü: **1.** Genel şekli, **2.** Detaylı görüntü. *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa* taksonunu tohum yüzeyi SEM görüntüsü: **3,5.** Genel şekli, **4,6.** Detaylı görüntü.



**Şekil 4.4.** *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica* taksonunun tohum yüzeyi SEM görüntüsü: **1.** Genel şekli, **2.** Detaylı görüntü. *Fibigia suffruticosa* türünün tohum yüzeyi SEM görüntüsü: **3.** Genel şekli, **4.** Detaylı görüntü. *Fibigia macroptera* türünün tohum yüzeyi SEM görüntüsü: **3.** Genel şekli, **4.** Detaylı görüntü.

### 4.3. NÜMERİK SONUÇLAR

*Physoptychis haussknechtii*, *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* ve Türkiye *Fibigia* cinsi taksonlarında taksonomik değer taşıyan 48 morfolojik karakter belirlendi. Bu taksonlarının nümerik sınıflandırılmasında kullanılan karakterlerin 7 (takson) x 48 (karakter)'lik veri matrisi, çizelge 4.1'de verildi. Fenogram oluşturulurken sürekli ve kesikli dataların (0 ve 1 olanlar) ayrı ayrı matrisleri oluşturuldu ve bu matrislerden de ağırlıkları ölçüsünde oluşturulan ortak matrise göre fenogram elde edildi. Belirlenen karakterlerin NTSYS paket programında değerlendirilmesi ile oluşturulan fenogram kapsamında *Fibigia* taksonlarının ve kullanılan dış gruplarının fenetik taksonomiye dayalı filogenetik ilişkileri tespit edildi (Şekil 4.5).

Çizelge 4.1. Taksonların nümerik taksonomisinde kullanılan karakterlerin değerleri

Karakter no	F. macroptera	F. suffruticosa	F. clypeata ssp. cly. var. clypeata	F. clypeata ssp. cly. var. eriocarpa	F. clypeata ssp. anatolica	Aurinia	Physoptychis
1	0	2	2	2	0	2	1
2	1	1	1	1	1	0	0
3	1	1	1	1	1	0	1
4	0	0	0	2	0	0	0
5	1	1	1	1	0	1	0
6	0	0	0	0	0	1	0
7	1	1	1	1	1	0	0
8	0	0	1	1	1	1	0
9	3	13	4	3	2	5.5	3
10	0.7	1.5	0.8	0.4	0.5	0.6	0.4
11	1	2	3	3	3	2	2
12	0	1	0	0	0	1	0
13	0	1	0	0	0	0	1
14	1	1	1	1	1	1	0
15	3.5	10	4	3	3	3	1.5
16	5	10	8	13	4	0.2	0.1
17	1	0	1	1	1	1	0
18	0	1	2	2	2	1	1
19	0	2	0	0	0	1	1
20	1	0	1	1	1	0	0
21	1	1	2	2	1	1	1
22	0	0	0	0	1	0	0
23	0.5	1.2	0.3	0.5	0.1	0.6	1
24	0	0	0	0	0	0	0
25	1	1	1	1	1	0	1
26	9	10	5	5	5	3.5	5
27	2	2	2	2	2	1.5	3
28	1	1	0	0	0	1	1

29	0	1	0	0	0	0	0
30	10	16	12	12	12	6	6
31	2	4	2	2	2	4	3
32	1	1	2	2	2	1	0
33	1	1	0	0	0	1	0
34	1	1	1	1	1	0	1
35	1	1	1	1	1	0	1
36	1	1	1	1	1	0	1
37	1	1	1	1	1	0	0
38	3	1,3	2,5	2	3	0,5	0,3
39	2	1	1	1	1,5	0,3	0,4
40	1	0	1	1	1	0	1
41	0	3	0	2	0	3	0
42	0	2	0	0	0	0	1
43	1	3	2	2	2	1	0
44	4	3	2	2	5	1	1
45	0	0	0	0	0	0	1
46	1	2	0	0	0	1	3
47	0	0	0	0	0	0	1
48	1	0	0	0	0	0	0

Alyssea tribusu ülkemizde on cins ile temsil edilmektedir. *Fibigia* cinsini nümerik sınıflandırılmasında dış grup olarak Alyssea tribusundan *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* ve *Physoptychis haussknechtii* türleri kullanılmıştır.

NTSYS programında gerçekleştirilen nümerik analiz sonuçlarına göre fenogramda dört kladın oluştuğu görülür. Fenogramın en dış kladına, dış grup olarak kullanılan *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* taksonu yerleşmiştir. *Aurinia saxatilis* taksonu silikulasının çok küçük (4–5 x 4–6 mm) ve orbicular-eliptik olması ile *Fibigia* taksonlarından kolaylıkla ayrılır. Ayrıca silikulasının tüysüz olması yalnızca *F. suffruticosa* türü ile benzerlik göstermesine rağmen, diğer *Fibigia* taksonlarından bu yönüyle de ayrılır. *Aurinia saxatilis* dış grup taksonu olarak öngörülmüş ve fenogramda ayrı bir dal (klad) oluşturmuştur.

*Physoptychis* cinsi dünyada üç tür ile temsil edilmektedir. Bu tez çalışmasında ikinci dış grup olarak ülkemiz için endemik olan *P. haussknechtii* türü kullanılmıştır. Oluşturulan fenogramın diğer kladına *P. haussknechtii* türü yerleşmiştir. Bu tür ayrı bir klad oluşturmakla birlikte, *Aurinia saxatilis* taksonuna göre *Fibigia* cinsine daha yakın konumda yer almıştır. *Physoptychis haussknechtii* türü boyunun daha kısa, yaprak kenarlarının düz, yalnızca yıldızsı tüylü olması ve meyvesinin globose şekli ile *Fibigia* taksonlarından ayrılır. *Physoptychis haussknechtii* türü de öngörüldüğü gibi fenogramda ayrı bir dal (klad) oluşturmuştur.

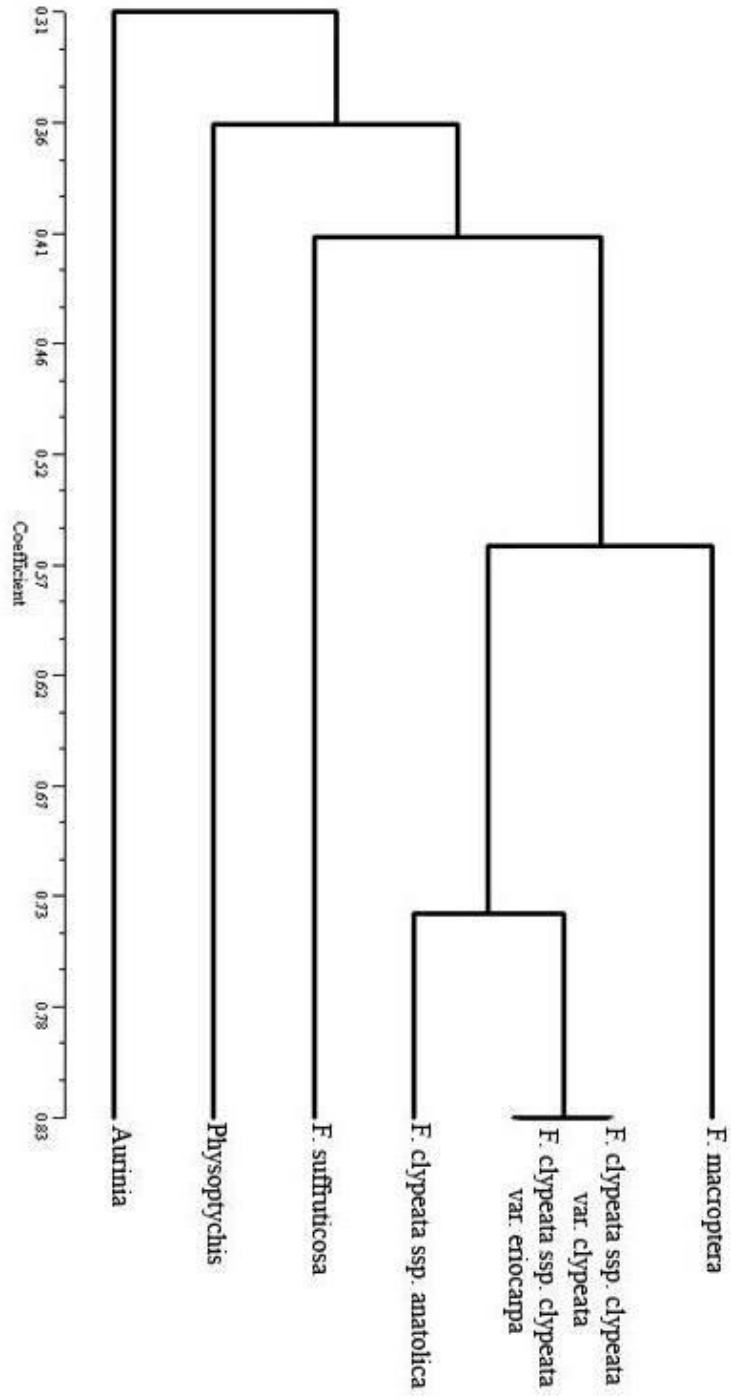
Fenogramın diğer bir kladını ise *Fibigia suffruticosa* türü oluşturmaktadır. Bu tür morfolojik olarak diğer *Fibigia* taksonlardan oldukça farklılık göstermektedir. *Fibigia suffruticosa* türü petallerinin morumsu-kırmızı renkte, pediselinin daha uzun, silikulasının tüysüz ve ters yumurtamsı olması özellikleri ile *Fibigia* cinsinin diğer taksonlarından kolaylıkla ayrılır. *F. suffruticosa* türü, bu cinsin petal rengi sarı olmayan ve meyvesi tüysüz olan tek taksonudur. *Fibigia suffruticosa* türü, dış grup olarak kullanılan *Physoptychis* ve *Aurinia* taksonlarına göre, *Fibigia* cinsinin diğer taksonlarına daha yakındır. Ancak fenogramda *Fibigia* cinsinin diğer taksonlarından anlamlı bir şekilde uzaklaşarak ayrı bir dal (klad) oluşturmuştur. Diğer morfolojik özellikleri ile birlikte nümerik ve moleküler sonuçlarda dikkate alınarak *F.*

*suffruticosa* türünün *Fibigia* cinsi altında yeni bir seksiyon (sect. *Purpureae*) içinde değerlendirilmesi uygun görülmüştür.

Fenogramdaki diğer bir klad, *F. suffruticosa* dışında kalan *Fibigia* cinsinin diğer taksonlarından oluşturur. *F. macroptera* ve *F. clypeata* taksonlarının oluşturduğu bu klad iki subklada ayrılır. Subkladların dallarında birisini *F. macroptera* türü, diğer subkladı ise *F. clypeata*'nın tür altı taksonları oluşturur. *F. macroptera* türü silikulasının daha geniş, tohum kanatlarının büyük ve zarsı olması karakterleri ile *F. clypeata* taksonundan ayrılır. Fenogramda da *F. macroptera* ve *F. clypeata* taksonlarını aynı kladın farklı dallarına yerleşmiş olması, farklı türler olduğunu doğrulamaktadır.

Türkiye Florasında tür düzeyinde temsil edilen *F. eriocarpa* türü, Irak ve Filistin Floralarında *F. clypeata* türünün varyetesi düzeyine indirgenmiştir. Bu çalışmada da *Fibigia eriocarpa* türü varyete düzeyinde değerlendirilmiştir. *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa* taksonu, *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonundan silikulasının uzun basit ve furkat tüylü olması ile ayrılır. Bu fenogramda birbirine en fazla benzerlik gösteren var. *clypeata* ve var. *eriocarpa* taksonlarıdır. Bu sonucu bu varyetelerin morfolojik karakterleri de desteklemektedir.

Bilim dünyasına yeni bir alttür olarak tanıtılan *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica* subsp. *nov.* taksonu habit olarak *Fibigia macroptera* türüne, taksonomik değeri olan karakterleri bakımından *Fibigia clypeata* türüne benzerdir. Subsp. *anatolica* bitki boyunun kısa ve silikulasının büyük olması ile *F. macroptera* türüne, tohum sayısı ve tohum kanat genişliğinin dar olması ile *F. clypeata* türüne benzer. Nümerik analiz sonucu göre oluşturulan fenogramda bu taksonun subsp. *clypeata* taksonuna yakın olduğu görülür. Ayırıcı morfolojik karakterler ile fenogramdaki yerleşim arasında korelasyon vardır.



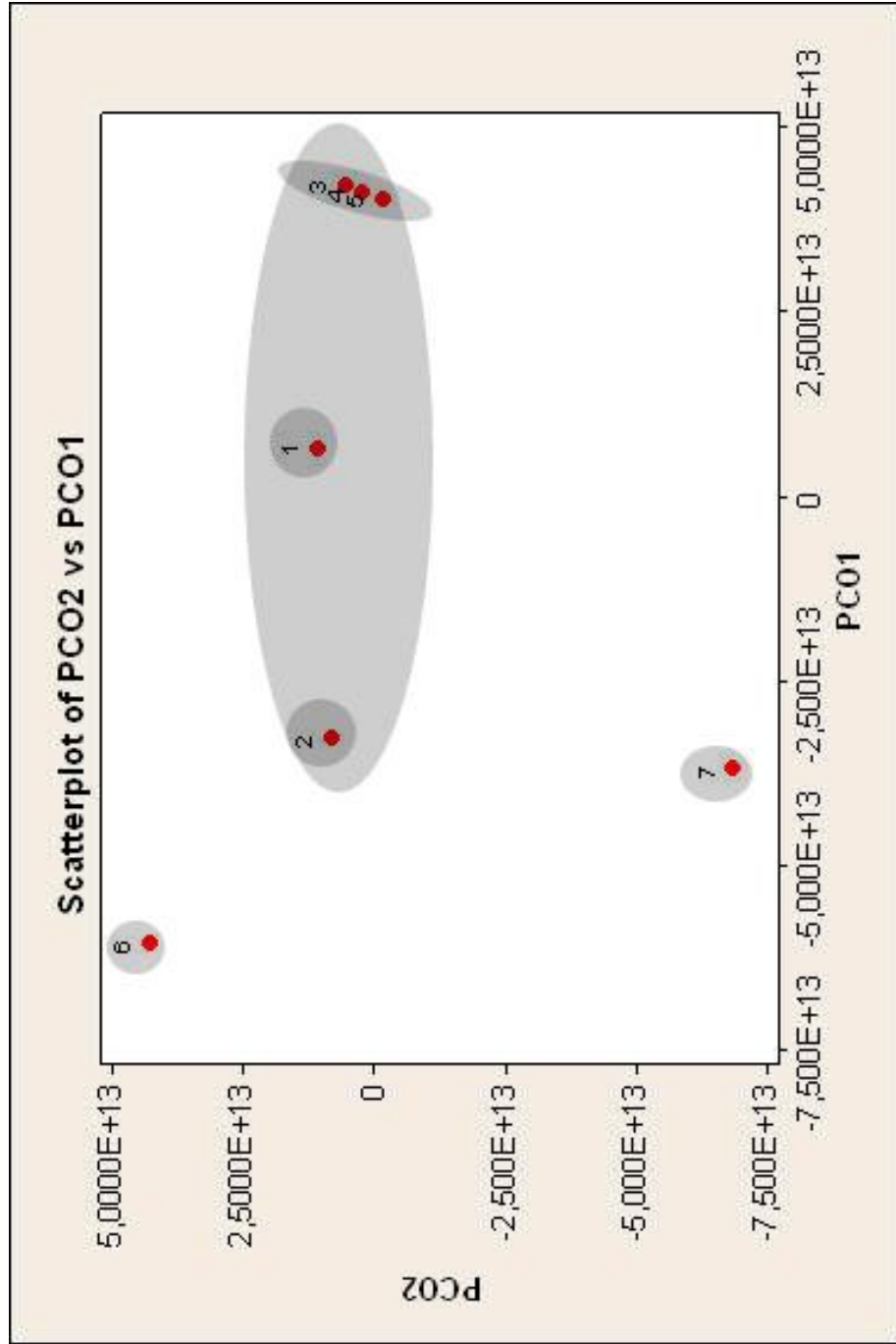
**Şekil 4.5.** *Fibigia* cinsi ve dış grupların nümerik sınıflandırılması sonucu elde edilen fenogram

### Nümerik verilerin PCO analiz sonuçları

*Fibigia* cinsine ait taksonlar ile dış grup olarak kullanılan *Physoptychis haussknechtii* ve *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* taksonlarına ait sayısal değerler, SM benzerlik katsayısı kullanılarak koordinat eksenlerine yerleşmeleri PCO üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.6.).

Şekil 4.6’da görüldüğü gibi dış grup olarak kullanılan *Physoptychis* ve *Aurinia* taksonları birinci eksenin (PCO1) soluna yerleşmişlerdir. Ayrıca *Fibigia suffruticosa* türü de bu eksenin solunda yer almıştır. Birinci eksenin sağına ise *F. clypeata*’ya ait alt taksonlar ile *F. macroptera* türü yerleşmiştir. *F. macroptera* türü nümerik fenogramda olduğu gibi PCO düzleminde de *F. clypeata*’ya ait taksonlara yakın konumda yer almıştır. *Fibigia suffruticosa* türü ise diğer *Fibigia* taksonlarına oldukça uzak bir konumda yerleşmiştir. Ayrıca grafik üzerinde *F. suffruticosa* türü dış grup olarak kullanılan taksonlara özellikle de *Physoptychis haussknechtii* türüne yakın yerleşmiştir. *F. suffruticosa* türü, *Fibigia* cinsine ait diğer türlerin merkezleştiği alandan uzaklaşarak ayrı bir grup oluşturduğu anlaşılmaktadır. Bu durum daha önce belirtildiği gibi *Fibigia* cinsi içinde ayrı bir seksiyon olarak değerlendirilmesine desteklemektedir. Fenogramda görülen dört farklı kladın PCO düzlemine de aynı şekilde farklı kladlar olarak yerleştikleri görülür. Fenogram ile PCO sonuçları arasında bir korelasyonun olduğu açıkça görülmektedir.

İkinci eksen göre de *Fibigia* cinsi taksonları ve dış grup olarak kullanılan türlerin PCO düzlemindeki önceki paragrafta vurguladığımız ilişkileri desteklemektedir (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.** *Fibigia* cinsi ve dış grupların SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenini üzerinde dağılımı. 1- *Fibigia macroptera*, 2- *Fibigia suffruticosa*, 3- *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata*, 4- *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa*, 5- *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica*, 6- *Aurinia*, 7- *Physoptychis*.

#### 4.4. Moleküler Sonuçlar ve Tartışma

*Fibigia* cinsine ve dış gruplara ait taksonların farklı lokalitelerden toplanan örnekleri 2X CTAB yöntemi ile izole edilerek,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  ve  $A_{260}/A_{280}$  ve DNA konsantrasyon değerleri Eppendorf marka biofotometre ile okunmuştur. Elde edilen değerler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** *Fibigia*, *Bornmuellera*, *Aurinia*, *Physoptychis* taksonlarının biyofotometrede okunan DNA değerleri

Toplayıcı no	Takson adı	C	$A_{260}$	$A_{280}$	$^{260}/_{280}$	$^{260}/_{230}$
M.A. 26	<i>Fibigia suffruticosa</i>	1366,2	27,3	12,9	1,47	0,73
M.Fırat 10189	<i>Fibigia suffruticosa</i>	344,8	6,8	4,106	1,68	1,08
M.A. 25	<i>Fibigia macroptera</i>	1105,8	22,11	14,9	1,48	0,71
A.Duran 7465	<i>Fibigia macroptera</i>	300,3	6,005	4,16	1,44	1,04
MF 10188	<i>Fibigia macroptera</i>	390,8	7,8	4,6	1,67	1,19
S.Tuştaş 1007	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>anatolica</i>	117,8	2,3	1,5	1,54	0,87
Ö.Çetin 1001	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i>	1436,8	28,7	20,1	1,43	0,81
Ö.Çetin 1002	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i>	219,3	4,38	3,20	1,37	0,75
A.Duran 7595	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i>	1108,1	22,16 2	14,6	1,51	0,76
M.Öztürk 1271	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>clypeata</i>	326,3	6,52	4,83	1,35	0,62
A.Duran 7583	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	190,4	3,80	3,10	1,23	0,62
A.Duran 7481	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	161,9	3,23	2,42	1,34	0,74
M.Öztürk 1273	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	274,3	5,48	3,08	1,78	1,13
A.Duran 7643	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	325,9	6,51	4,75	1,37	0,63
A.Duran 8191	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	317,3	6,34	4,02	1,58	0,91
A.Duran 7648	<i>F. clypeata</i> subsp. <i>clypeata</i> var. <i>eriocarpa</i>	487,2	9,74	6,69	1,46	0,73
M.Ünal 9619	<i>Bornmuellera cappadocica</i>	95,5	1,91	1,12	1,71	0,96
A.Duran 5171	<i>Aurinia saxatilis</i> subsp. <i>orientalis</i>	41,7	0,83	0,49	1,67	1,37
A.Duran 6612	<i>Physoptychis haussknechtii</i>	1056	21,12	14,06	1,5	0,72

Toplam sekiz taksona ait 19 örnekten DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA konsantrasyonu biofotometre ile okunarak dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlar %1 'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** DNA dilüsyonları yapılan örneklerin agaroz jele yükleme numaraları: 1, 11- *F. suffruticosa*. 2, 5, 6- *F. macroptera*. 3, 4, 7, 8- *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata*. 12, 13, 14, 15, 16, 17- *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa*. 9- *F. clypeata* subsp. *anatolica*. 10- *Physoptychis haussknechtii*. 18- *Bornmuellera cappadocica*. 19- *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis*.

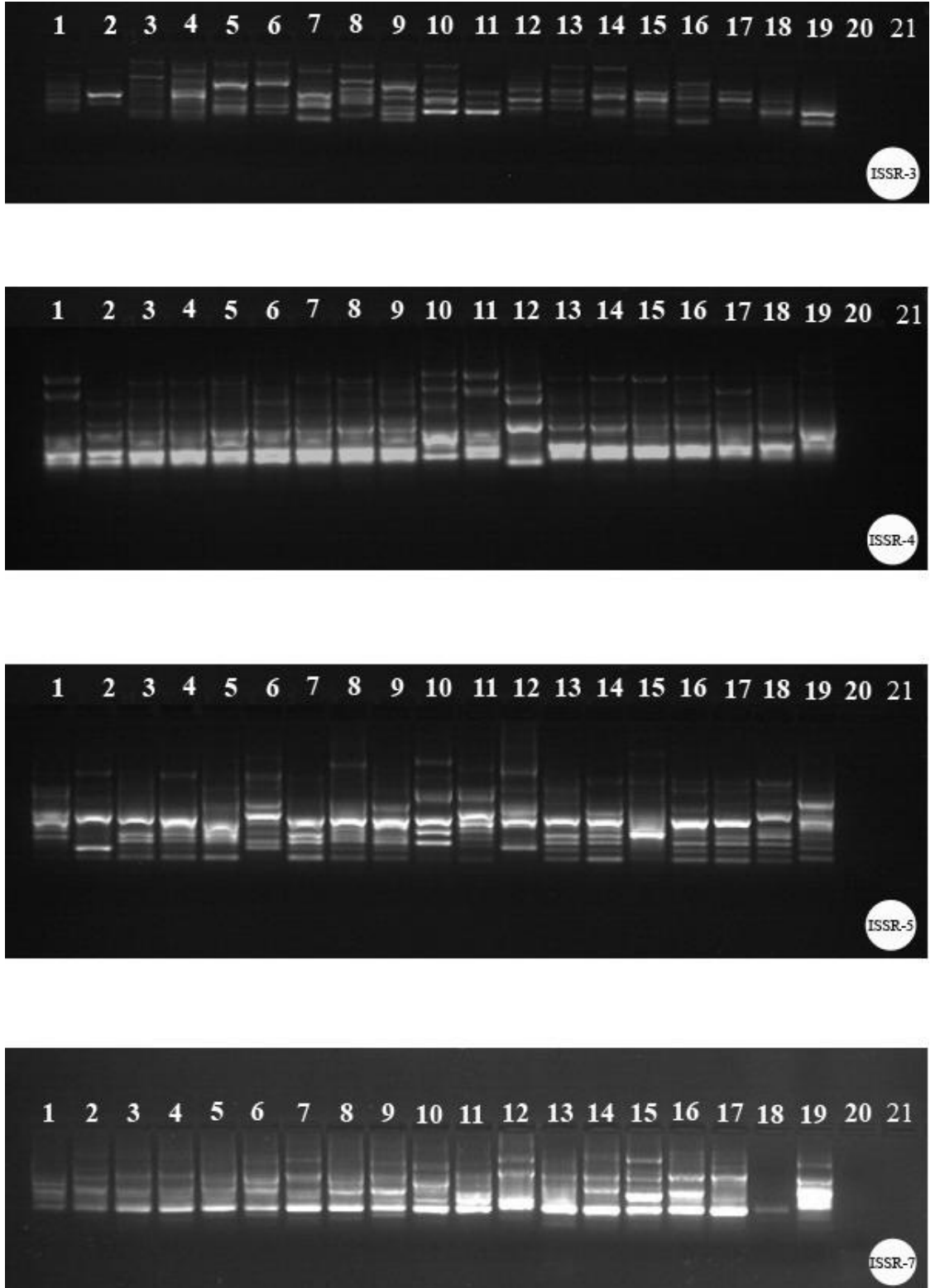
#### ISSR Amplifikasyonu Sonuçları

Bu tez çalışması kapsamında toplam 18 ISSR primeri denenmiştir. Bu primerlerden sekizinde amplifikasyon olmadığı gözlenmiştir. Geriye kalan 10 primerde ise skorlanabilir DNA bandı üretilmiştir. Toplam 138 bant elde edilmiş ve bu bantlardan 135'sinin polimorfik, üçünün ise monomorfik olduğu tespit edilmiştir. Toplam polimorfizm oranı %97 olarak hesaplanmıştır. En fazla bandı ISSR 4 ve ISSR 5 primerleri üretmiştir. Ancak ISSR 5 primerinin üç bandı monomorfik olarak değerlendirilmiştir. En az bandın ISSR 11 primerinde üretildiği gözlenmiştir. Elde edilen bantlar değerlendirilerek, taksonların moleküler yakınlıklarını gösteren bir dendogram elde edilmiştir. Bu çalışmada *Physoptychis haussknechtii*, *Bornmuellera cappadocica* *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* taksonları dış grup olarak kullanılmıştır.

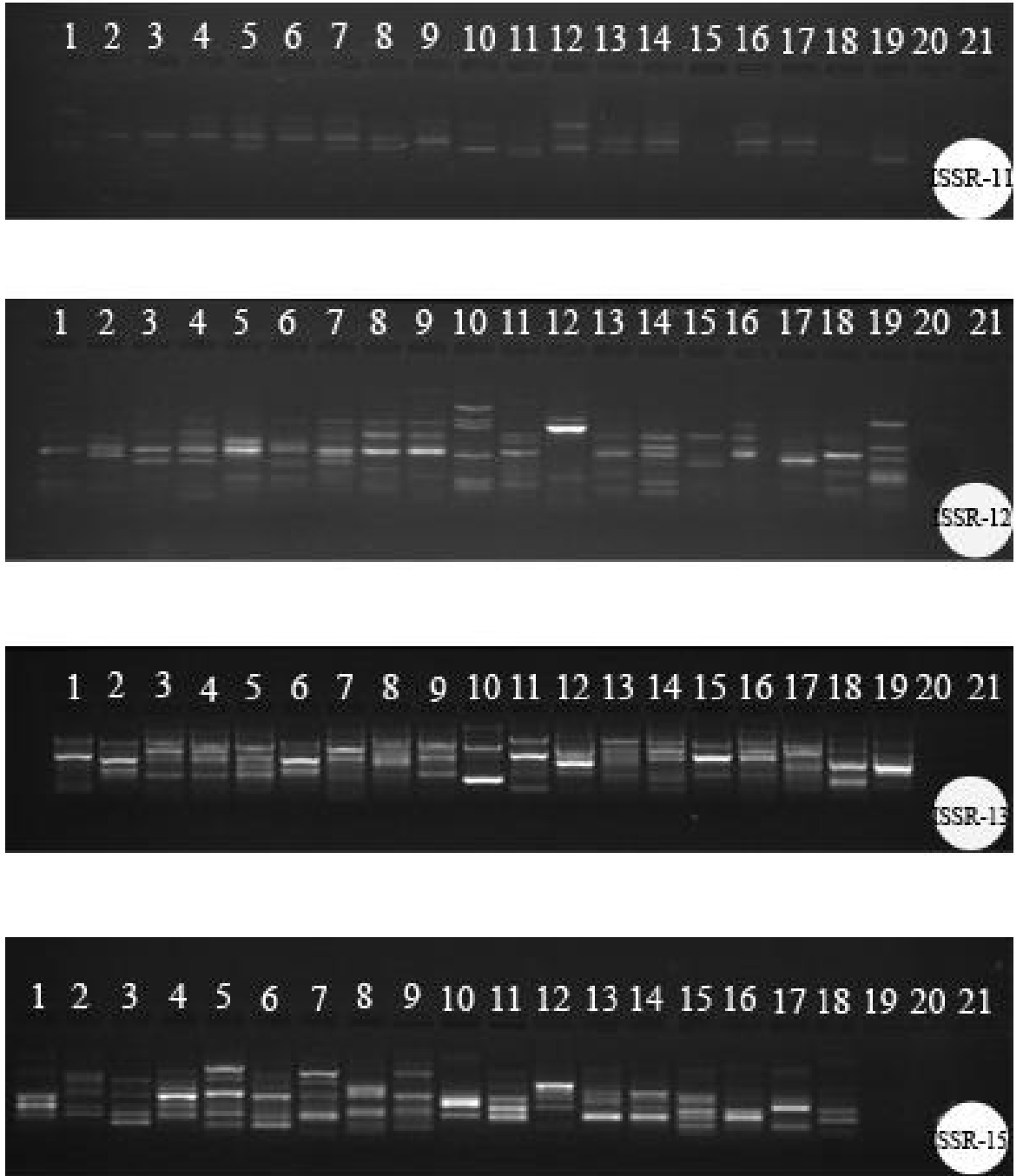
**Çizelge 4.3.** ISSR amplifikasyonları sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları

<b>Primer adı</b>	<b>Toplam bant sayısı</b>	<b>Polimorfik bant sayısı</b>	<b>Polimorfizm oranı (%)</b>
<b>ISSR 3</b>	16 bant	16 bant	% 100
<b>ISSR 4</b>	21 bant	21 bant	% 100
<b>ISSR 5</b>	21 bant	18 bant	% 85
<b>ISSR 7</b>	12 bant	12 bant	% 100
<b>ISSR 11</b>	6 bant	6 bant	% 100
<b>ISSR 12</b>	10 bant	10 bant	% 100
<b>ISSR 13</b>	15 bant	15 bant	% 100
<b>ISSR 15</b>	15 bant	15 bant	% 100
<b>ISSR 16</b>	14 bant	14 bant	% 100
<b>ISSR 17</b>	8 bant	8 bant	% 100
<b>ISSR 1</b>	Amplifikasyon yok		
<b>ISSR 2</b>	Amplifikasyon yok		
<b>ISSR 6</b>	Amplifikasyon yok		
<b>ISSR 8</b>	Amplifikasyon yok		
<b>ISSR 9</b>	Amplifikasyon yok		
<b>ISSR 10</b>	Amplifikasyon yok		
<b>ISSR 14</b>	Amplifikasyon yok		
<b>ISSR 18</b>	Amplifikasyon yok		
<b>Toplam</b>	<b>138 bant</b>	<b>135 bant</b>	<b>% 97</b>

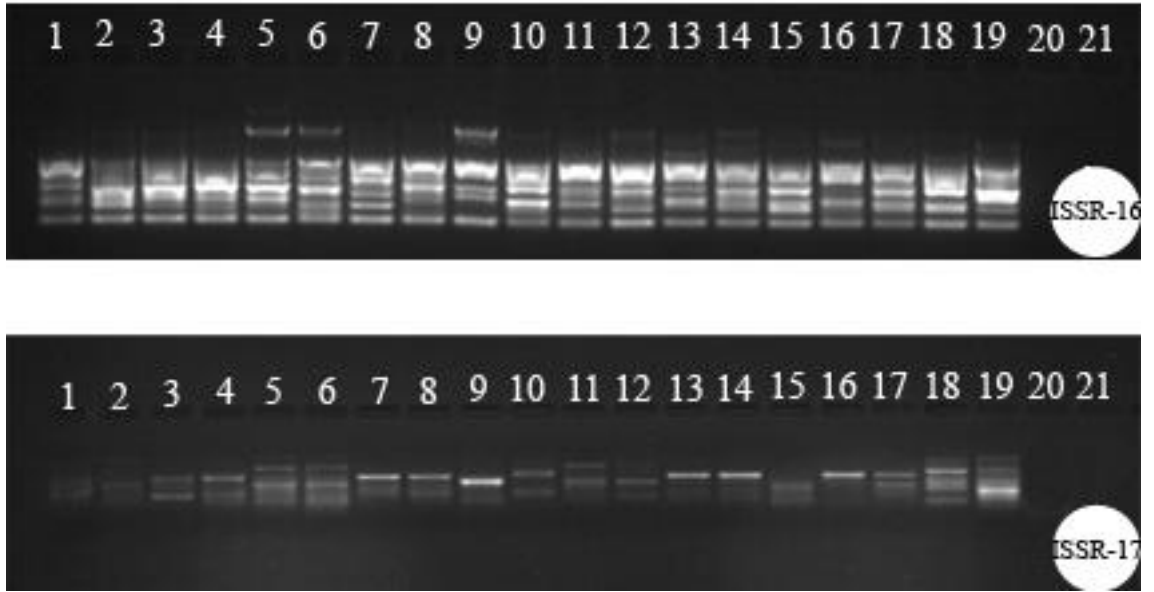
ISSR primerleri kullanılarak amplifiye edilmiş DNA'ların skorlanabilir 10 farklı jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10). Bu şekillerdeki numara sırası ile dilüsyonları yapılan örneklerin agaroz jele yükleme numara sıraları aynıdır (Bak Şekil 4.7).



**Şekil 4.8.** Taksonların ISSR 3, 4, 5, 7 nolu primerler ile PCR amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü



**Şekil 4.9.** Taksonların ISSR 11, 12, 13, 15 nolu primerler ile PCR amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü



**Şekil 4.10.** Taksonların ISSR 16, 17 nolu primerler ile PCR amplifikasyonundan elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü

Bu çalışmada skorlanan bantların NTYSc-pc 2.1 istatistik programında analizi ile genetik benzerlik ve uzaklık matrisi oluşturularak dendogramı elde edilmiştir. Örneklerinin yetersizliği nedeniyle nümerik sınıflandırmada kullanılmayan *Bornmuellera* cinsinin filogenetik pozisyonunu moleküler sonuçlarla karşılaştırmak mümkün olmamıştır.

ISSR primerlerinin PCR amplifikasyonu ile elde edilen moleküler verilerin değerlendirilmesiyle oluşan dendogramda beş kladın olduğu görülür (Şekil 4.11).

Dendogramda kladların ikisini dış gruplar olarak kullanılan *Aurinia saxatilis* subsp. *orientalis* ve *Bornmuellera cappadocica* taksonları oluşturur (Şekil 4.11). Warwick ve ark.'nın (2008) genomik DNA'nın ITS sekanslarını kullanarak *Alyssea* tribusu üzerine yaptıkları bir çalışmada da bu taksonların *Fibigia* cinsinden ayrı kladlar oluşturdukları görülür.

Dendogramda *Fibigia suffruticosa* türüne ait örnekler bir klad oluştururken *Fibigia clypeata* ve *Fibigia macroptera* türüne ait örnekler dendogramda ayrı bir klad oluşturacak şekilde yerleşmiştir. Bu çalışmada *F. suffruticosa* türünün farklı lokalitelerden toplanmış iki örneği çalışılmıştır. *F. suffruticosa* türünde petallerin kırmızımsı-menekşe renkte olması, silikulasının tüysüz ve genişlemiş ters yumurtamsı olması karakterleri ile *Fibigia* cinsinin diğer taksonlarından kolaylıkla ayrılmaktadır. Yine Warwick ve ark.'nın (2008) yaptıkları çalışmada *F. suffruticosa* türü dendogramda *Physoptychis haussknechtii* türüne daha yakın yer almıştır. Bu çalışmada da *Physoptychis haussknechtii* ve *F. suffruticosa* türlerinin kladları bir birbirine yakın konumda yer aldığı görülür (Şekil 4.11).

*Fibigia macroptera* ve *F. clypeata* türlerinin oluşturduğu klad iki subklada ayrılmaktadır. Bu türler petallerinin sarı ve silikulasının tüylü olması ile benzerlik gösterirler. Ancak *Fibigia macroptera* türü silikulasının ve tohum kanatlarının geniş olması ile *F. clypeata* türünden ayrılır. Bu iki tür dendogramda da bir klad oluşturarak yakın konumda yerleşmiştir.

Bu araştırmada *F. macroptera* türünün üç farklı lokaliteden toplanmış örnekleri çalışılmıştır. *F. macroptera* türünün Ereğ Dağından toplanmış iki örneği dendogramda birbirine daha yakın yer almıştır. Ancak coğrafi olarak diğer iki örneğe oldukça uzak olan Elazığ'dan toplanan örnek ise aynı türün farklı populasyonlarındaki varyasyonu anlamlı şekilde yansıtmaktadır.

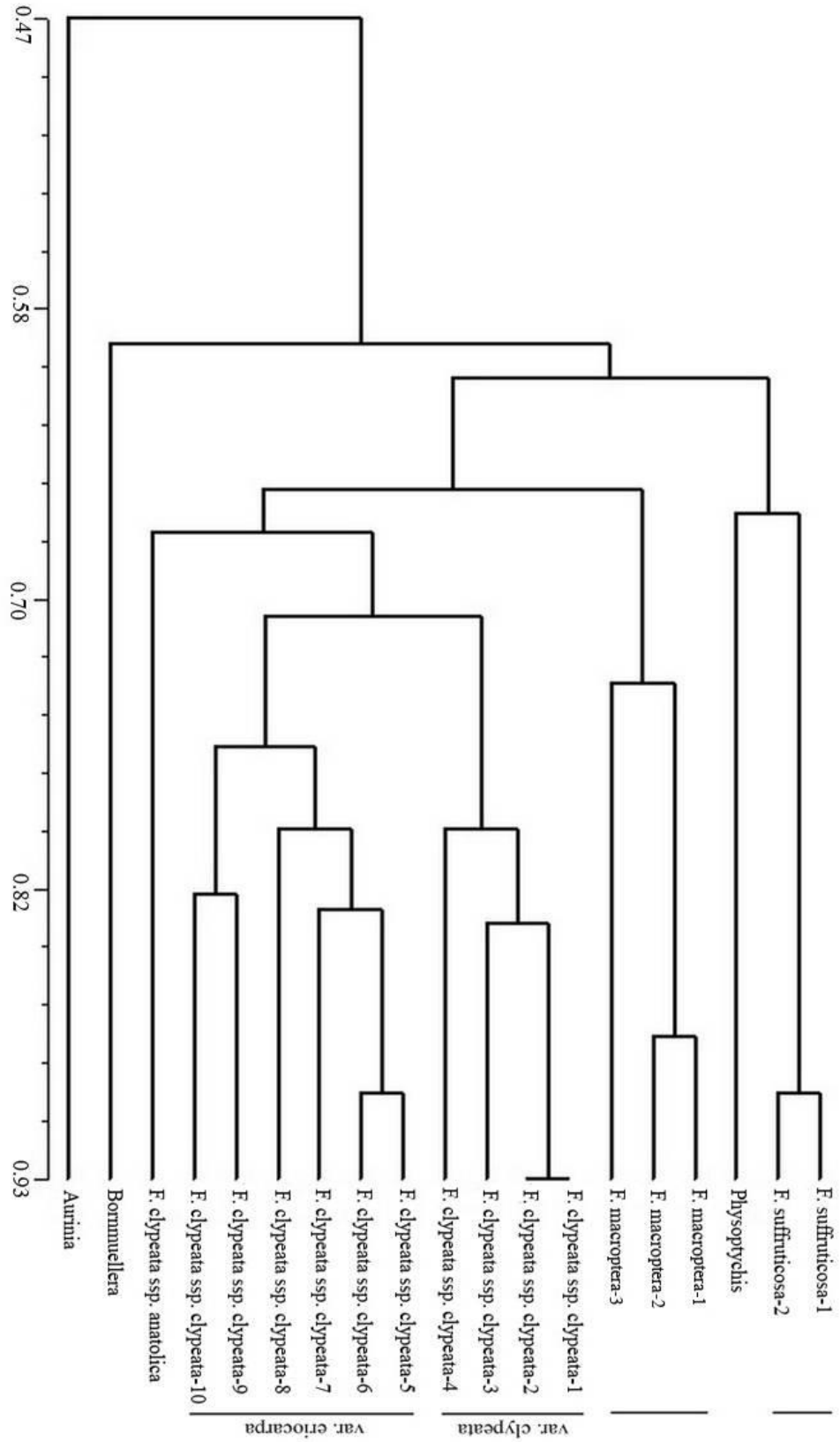
*Fibigia clypeata* taksonlarının oluşturduğu kladda ise *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica* taksonu, *F. clypeata*'nın diğer taksonlarından ayrılarak bir dal oluşturur. Subsp. *anatolica* taksonu fizyonomik olarak *F. macroptera* türü ile benzerlik gösterir. Ancak morfolojik karakterlerle birlikte, nümerik ve moleküler verilerin kullanılması ile oluşturulan fenogram ve dendogramlarda subsp. *anatolica* taksonunun, *F. clypeata* türü altında yer almasını desteklemektedir.

*F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonuna ait farklı lokalitelerden toplanmış dört örnek dendogramda zayıf bir grup oluşturur. *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa* taksonu da diğer varyeteden zayıf bir grup oluşturarak ayrılır. Oluşan bu grupların var. *eriocarpa* ile var. *clypeata* taksonlarının ayrımını varyete düzeyinde yeterince desteklemektedir. Dendogramda var. *clypeata* taksonunun Akdeniz örnekleri ile Kırıkkale örneği arasında benzerliğin farklılaştığı görülür (Şekil 4.11 ).

Var. *eriocarpa* silikulasının kısa yıldızsı, uzun basit ve bifurkat tüylü olması ile var. *clypeata* taksonundan ayrılır. Dendogramda da bu varyetelerin örnekleri farklı gruplar oluşturur. Var. *eriocarpa* taksonunun Türkiye'nin güneyinden toplanmış örnekleri ile Sivas ve Kayseri'den toplanmış örnekler kendi aralarında alt gruplar oluşturarak ayrılırlar (Şekil 4.11).

Türkiye *Fibigia* cinsi taksonlarının morfolojik karakterlerine göre yapılan sınıflandırma ile moleküler verilerin kullanılarak oluşturulduğu dendogram arasında bir korelasyonun olduğu görülür. Dış grup olarak kullanılan *Physoptychis haussknechtii* türünün daha belirgin bir klad ile *Fibigia* cinsinden ayrılması beklenirdi. Ancak *Fibigia* cinsinin morfolojik karakterleri yönüyle diğer türlerinden

oldukça farklı bir türü olan *F. suffruticosa* ile yakın konumda kladlarda yer alması da beklenen bir durum olarak değerlendirildi.



**Şekil 4.11.** *Fibigia* cinsi ve dış grupların ISSR amplifikasyonları sonunda elde edilen dendrogram

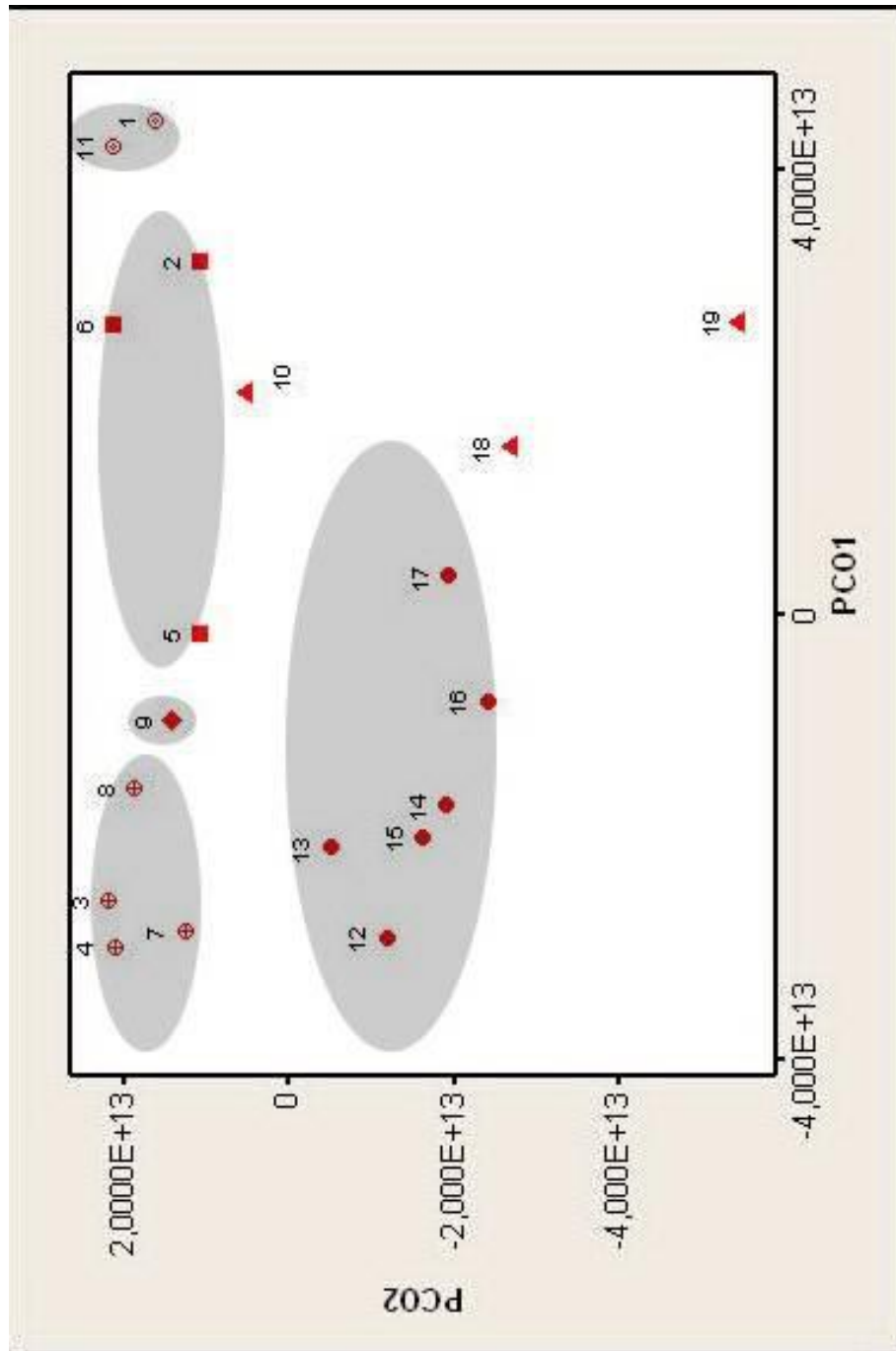
### Moleküler Verilerin PCO Analiz Sonuçları

Türkiye *Fibigia* cinsi taksonları ile birlikte *Aurinia*, *Bornmuellera* ve *Physoptychis* cinslerini temsil eden taksonlar, SM benzerlik katsayısı kullanılarak PCO analizi yapılmıştır. Taksonların koordinat eksenlerine göre dağılımları şekil 4.12’de verilmiştir.

PCO analizi düzleminde görüleceği gibi dış grup olarak kullanılan cinsler, *Fibigia* cinsine ait taksonlardan bir dereceye kadar uzaklaşmışlardır (Şekil 4.12). Dış grup olarak kullanılan *Physoptychis* PCO düzleminde *Fibigia* taksonlarına yakın konumda yer alırken, diğer dış gruplar daha uzağa yerleşmiştir. *Fibigia sufruticosa* diğer *Fibigia* taksonlarından ayrı bir grup oluşturmuştur. *Fibigia macroptera* örnekleri ise *F. sufruticosa* ile *F. clypeata* türleri arasında yer almaktadır.

*F. clypeata* türünün alttür ve varyeteleri kendi aralarında bir grup oluşturarak birinci eksenin sol tarafına yerleşmişlerdir. İkinci eksene göre *Fibigia clypeata* kompleksi iki gruba ayrılmıştır. *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonuna ait örnekler eksenin üst kısmında toplanmasına rağmen *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa* taksonuna ait örnekler eksenin alt kısmına yerleşmiştir.

Bilim dünyası için yeni olan *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica* taksonu PCO analiz sonuçlarına göre *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonu ile *F. macroptera* türü arasında yerleşim göstermiştir.



**Şekil 4.12.** *Fibigia* cinsi ve dış grupların SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenini üzerinde dağılımı. ⊕ *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa*. ●, *Fibigia clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata*. ◆, *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica*. ■, *Fibigia macroptera*. ⊙, *Fibigia suffruticosa*. 10▲, *Physoptychis*, 18▲ *Bornmuellera*, 19▲ *Aurinia*.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezin moleküler çalışmaları kapsamında, Türkiye *Fibigia* cinsine ait taksonların farklı lokalitelerden toplanmış örneklerinin ISSR primerleri ile PCR amplifikasyonu yapılarak filogenetik ilişkileri yansıtan dendogramı oluşturuldu. Ayrıca *Fibigia* cinsi taksonlarının taksonomik değeri olan karakterleri tespit edildi ve bu karakterler NTSYS paket programı ile değerlendirilerek fenogram oluşturuldu. Bunlara ilave olarak *Fibigia* cinsine ait taksonların tohum yüzeyleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile polenleri ise SEM ve ışık mikroskobu ile çalışıldı.

Türkiye Florasına göre *Fibigia* cinsi ülkemizde dört tür ile temsil edilmektedir. *Fibigia* üzerine sonraki yıllarda yapılan bazı taksonomik çalışmalar kapsamındaki değerlendirmelere göre *Fibigia* cinsi ülkemizde üç tür ve beş taksonla temsil edilmektedir (Townsend & Guest 1980, Tuştaş 2008). *Fibigia* cinsi üzerine yapılan morfolojik bir çalışmada *F. clypeata* subsp. *anatolica* taksonu bilim dünyası için yeni bir takson olarak tanıtılmıştır (Tuştaş 2008).

Bu tez kapsamında, Türkiye *Fibigia* cinsi taksonlarının filogenetik ilişki düzeyleri ilk kez moleküler veriler kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca *Fibigia* cinsinin yakın cinslerle olan konumu da araştırılmıştır. Moleküler verilerin değerlendirilmesi ile oluşan dendogramda *Fibigia* cinsine ait taksonların tür ve tür altı düzeyde ayrıldıkları açıkça görülmektedir. Morfolojik karakterler yönüyle birbirinden belirgin olarak ayrılan taksonların, moleküler dendogramda birbirinden uzak konumlarda, farklı gruplar oluşturmaktadır. Dış grup olarak kullanılan *Bornmuellera*, *Aurinia* ve *Physoptychis* cinslerine ait türler, *Fibigia* cinsi taksonlarından ayrılarak farklı kladlara yerleşmişlerdir. *Fibigia* cinsinin diğer türlerinden morfolojik olarak en farklı taksonu kabul edilen *F. suffruticosa* türü ise, dış grup olarak kullanılan *Physoptychis haussknechtii* türüne yakın ayrı bir klada yerleşmiştir. Diğer *Fibigia* taksonları ise birbirlerinden farklı taksonlar olduğunu doğrulayacak bir dağılımı göstermiştir. *F. macroptera* örnekleri ise bir subklad üzerinde ve *F. clypeata* taksonlarına daha yakın konumda yer almıştır.

*Fibigia clypeata* kompleksinde yer alan alttür ve varyeteler ise kendi aralarında alt gruplar oluşturarak ayrılmışlardır. Ayrıca meyve özelliği bakımından *F. macroptera* türüne benzeyen ve bilim dünyası için yeni bir alttür olarak değerlendirilen *Fibigia clypeata* subsp. *anatolica* taksonu da *F. clypeata* subsp. *clypeata* taksonuna yakın konumda yer almıştır.

Warwick ve ark. (2008) tarafından *Alysseae* tribusuna ait 85 türün filogenetik akrabalık durumu ribozomal ITS bölgeleri kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmada *Fibigia clypeata*, *F. macroptera*, *F. suffruticosa* taksonlarına ait örnekler kullanılmıştır. Maximum likelihood ve maximum parsimony analizine göre oluşturulan dendogramda *F. clypeata* ve *F. macroptera* aynı kladın subkladlarında yer almasına rağmen *F. suffruticosa* ayrı bir kladda yer almıştır. Bizim çalışma sonuçlarımızda, Warwick ve ark. (2008)'nin sonuçları ile korelasyon göstermektedir.

Warwick ve ark. (2008) *Alysseae* tribusu ile ilgili yaptıkları aynı çalışmada *Physoptychis caspica* türü, *F. suffruticosa* türüne dendogramda daha yakın konumda yer almıştır. Aynı çalışmada kullanılan *Bornmuellera* ve *Aurinia* cinsine ait örneklerde *Fibigia* cinsine daha uzak konumda yer almışlardır. Warwick ve ark. (2008) çalışmasında *Fibigia* cinsine yakın konumda yer alan cinsler ile bizim çalışmamızda kullanılan dış grupların dendogramdaki konumları arasında paralellik vardır. Aynı çalışmada üç *Fibigia* taksonundan ikisinin monofiletik olduğu belirtilmiştir. Yine bu çalışmada *Fibigia* cinsinin monofiletik durumunu belirlemek için çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Nümerik analizlere göre oluşturulan fenogram incelendiğinde yine *Fibigia* taksonlarının dış gruplardan ayrı bir klad oluşturduğu görülür. Moleküler dendogramda olduğu gibi *F. suffruticosa* türü diğer taksonlardan ayrı bir dal oluşturmuştur. Silikulasının ve tohum kanatlarının daha geniş olması ile *F. clypeata* taksonlarından ayrılan *F. macroptera* türü, nümerik dendogramda da ayrı bir kladda yer almıştır.

*Fibigia* cinsi üzerine yapılan mikromorfolojik çalışmalar literatür bilgileri ile uyumlu çıkmıştır. Polen ve tohum yüzeyi ornemantasyonu retikulate olarak belirlenmiştir. Ayrıca polenlerin trikolpat ve prolate olduğu gözlenmiştir. *Fibigia* cinsinin mikromorfolojik yapısında türleri ayırt etmeye yetecek farklılıkların bulunmadığı ortaya konmuştur.

Sonuç olarak *F. macroptera* türü hem moleküler hem de fenetik dendogramda *F. clypeata* taksonlarına daha yakın konumda yer almıştır. *F. clypeata* taksonları da kendi arasında tür altı düzeyde bir ayrım göstermiştir. *F. clypeata* subsp. *anatolica* taksonu diğer *F. clypeata* taksonlarından ayrı bir dalda yer almıştır. *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *eriocarpa* taksonu da *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* örneklerinden ayrılmış ve aynı zamanda bu taksonun ülkemizin güneyinden toplanmış örnekleri aynı subkladın farklı bir dalında toplanmıştır. *F. clypeata* subsp. *clypeata* var. *clypeata* taksonunun bütün örnekleri aynı kladda toplanmış ancak coğrafi olarak farklı lokalitelerden toplanmış örnekler farklı subkladda yer almıştır. Morfolojik olarak ta diğer *Fibigia* türlerinden belirgin biçimde ayrılan *F. suffruticosa* türü, moleküler ve fenetik dendogramda da ayrı bir klad üzerinde yer almıştır. *F. suffruticosa* türünün *Fibigia* cinsi içerisinde yeni bir seksiyon (**Section. Purpureae**) altında değerlendirilmiştir. Böylece *Fibigia* cinsi iki seksiyona ayrılmış ve *F. macroptera* ve *F. clypeata* taksonları *Eufibigia* seksiyonu altında yer almış ve yeni bir seksiyon olan *Purpureae* seksiyonunada *F. suffruticosa* türü aktarılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

Açık, L., Babaoğlu, S., Çelebi, A., Adıgüzel, N. 2004. Molecular Analysis of Turkish *Alyssum* L. (Brassicaceae) Species by RAPD-PCR and SDS-PAGE Methods. G.U. Journal of Science 17(3): 25–33.

Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B. 1992. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. Genetics 134: 1131–1139.

Al-Shehbaz, I.A. 1984 The Tribes of Cruciferae (Brassicaceae) in the Southeastern United States. J. Arnold Arbor. 65: 343–373.

Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A., Kellogg, E.A. 2006. Systematics and Phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an Overview. Pl. Syst. Evol. 259: 89–120.

Al-Shehbaz, I.A., Mutlu, B., Dönmez, A.A. 2007. The Brassicaceae (Cruciferae) of Turkey, Updated. Turk J Bot. 31: 327–336

Appel, O., Al-Shehbaz, I.A. 2003. Cruciferae. In: Kubitzki K. (ed.) The Families and Genera of Vascular Plants. Vol. 5, 75–174. Springer, Berlin Heidelberg.

Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayın.

Atalay, İ. 1994. Türkiye Vegetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir I. baskı.

Avise, J.C. 1994. Molecular Markers. Natural History and Evolution. Chapman & Hall. International Thomson Publishing, New York. 3–359.

Aytuğ, B. 1971. İstanbul Çevresi Bitkilerinin Polen Atlası. 70–75. İstanbul: Kutulmuş Matbaası.

Bağcı, E. & Çakır, T. 2005. *Verbascum natolicum* (Fisch. & Mey. ) Hub.-Mor. (Scrophulariaceae)'a Ait Taksonomik Karakterler Üzerinde Gözlemler. Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 17 (1): 151–163.

Bailey, C.D., Koch, M.A., Mayer, M., Mummenhoff, K., O'Kane, S.L., Warwick, S.I., Windham, M.D., Al-Shehbaz, I.A. 2006. Toward a Global Phylogeny of the Brassicaceae. Molecular Biology and Evolution 23 (11): 2142–2160.

Baytop, T. 1994. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları. 578. Ankara.

Beilstein, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Kellogg, E.A. 2006. Brassicaceae Phylogeny and Trichome Evolution. Am. J. Bot. 93: 607–619.

Bleeker, W., Weber-Sparenberg, C., Hurka, H. 2002. Chloroplast DNA Variation and Biogeography in the Genus *Rorippa* Scop. (Brassicaceae). *Plant Biol.* 4: 104–111

Bornet, B. & Branchard, M. 2004. Use of ISSR Fingerprints to Detect Microsatellites and Genetic Diversity in Several Related Brassica taxa and *Arabidopsis Thaliana*. *Hereditas* 140: 245–248.

Boskoviç, R. & Tobutt, K.R. 1996. Correlation of Styler Ribonuclease Zymograms with Incompatibility Alleles in Sweet Cherry. *Euphytica* 90: 245–250.

Bothmer, R., Van., Jacobsen, N., Baden, C., Linde-Laursen, I., Jorgensen, R.B. 1991. An Ekogeographical Study of the Genus *Hordeum*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genopools. 7. Int. Board for Plant Genetic Resources, Rome.

Botstein, D., White, R., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Of Human Genet.* 32: 314–331.

Bouloumoy, S.J. 1930. Flore du Liban et De La Syrie, Vigot Freres.

Bovenhuis, H. & Meuwissen, T. 1996. Detection and Mapping of Quantitative Trait Loci. Animal Genetics and Breeding Unit, University of New England Armidale.

Bretting, P.K. & Widrechner, M.P. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. *Hort. Sci.* 30: 1349–1356.

Brochmann, C. 2008. Pollen and Seed Morphology of Nordic *Draba* (Brassicaceae): Phylogenetic and Ecological Implications. *Nordic Journal of Botany* 12: 657–673.

Bush, N.A. 1939. Flora of the U.S.S.R, volume VIII, Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR. Moskova-Leningrad.

Byrne, M., Marquez-Garcia M.I., Üren, T., Smith, D.S., Moran, G.F. 1996. Conservation and Genetic Diversity of Microsatellite Loci the Genus *Eucalyptus*. *Aust. J. Bot.* 44: 331–341.

Ceyhan, C.O. 2005. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Kulübü Gazetesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Basın Yayın Kulübü. 2: 4

Cullen, J. 1965. *Fibigia* Medik. in: Davis, P.H. (ed.). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. 1: 356–358. Edinburgh University Press, Edinburgh.

Çiftçi, Y. 2004. Balıkçılık ve Su Ürünlerinde Kullanılan Genetik Markır Sistemleri- II. Yunus Araştırma Bülteni. 2: 13–16.

Davis P.H. (ed.) 1965. Cruciferae Flora of Turkey and the East Aegean Island 1: 248–495. Edinburgh, Edinburgh University Press.

Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K (eds.) 1988. Cruciferae Flora of Turkey and the East Aegean Island (supplement) 10: 232–235. Edinburgh, Edinburgh University Press.

De Candolle, A. P. 1821. Cruciferae. Systema Naturale 2: 139–700.

De Leonardis, W., De Santis, C., Fichera, G., Padulosi, S., Zizza, A. Seede 1996. Morphology of Some Taxa Belonging to Genus *Diplotaxis* D.C. and *Eruca* Miller. In: Padulosi, S., Pignone D. 1996. Rocket: A Mediterranean crop for the world.

Dirmenci, T., Satıl, F., Tümen, G. 2005. A New Record for the Flora of Turkey: *Iberis saxatilis* L. (Brassicaceae). Turk J Bot. 29: 471–474.

Dirmenci, T., Satıl, F., Tümen, G. 2006. A New Species of *Matthiola* R. Br. (Brassicaceae) from Turkey. Bot J Linn Soc 151: 431–435.

Doğan C. & İnceoğlu Ö. 1990. Türkiye'nin Bazı *Isatis* L. Taksonlarının Polen Morfolojisi. Doğa-Tr J of Botany 14: 12–31.

Dow, B.D., Ashley, M.V., Howe, H.F. 1995. Characterization of Highly Variable (GA/CT)n Microsatellites in the Bur Oak (*Quercus macrocarpa*). Theor. Appl. Genet. 91: 137–141.

Duran A., Ünal F., Pınar M. 2003. The Revision of the Genus *Hesperis* L. in Turkey. TÜBİTAK (Project No: TBAG–1748).

Duran, A. & Ocak, A. 2005. *Hesperis turkmendaghensis* (sect. *Hesperis*) (Cruciferae /Brassicaceae), a New Species from the Central Anatolia Region Turkey. Bot J Linn Soc 147: 239–247.

Ellegren. H. 1993. Genome Analysis with Microsatellite Markers. Dissertation. Department of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Science.

Erdtman, G. 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. Chronica Botanica Col., Waltham, Massachusettes.

Ergül, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera*. L. cvs.) Genomic DNA Parmak İzi Analiz ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi.

Facciola, S. 1990. A Source Book of Edible Plants. Kampong Publications.

Flannery, M.L., Mitchell, F.J.G., Coyne, S., Kavanagh T.A., Burke, J.I., Salamin, N., Dowding, P., Hodkinson, T. R. 2006. Plastid Genome Characterisation in *Brassica* and Brassicaceae Using a New Set of Nine SSRs. Theor Appl Genet 113: 1221–1231.

Franzke A. & Hurka H. 2000. Molecular Systematics and Biogeography of the *Cardamine pratensis* Complex (Brassicaceae). *Plant Syst. Evol.* 224 : 213–234.

Gao, D., Wang, Q., Wu, Y., Xu, H., Yu Q., Liu, J. 2008. Microsatellite DNA Loci from the Typical Halophyte *Thellungiella salsuginea* (Brassicaceae) *Conserv Genetics* 9: 953–955.

Gaspar, T.H., Penel, C.L., Thorpe, T., Grappin, H. 1982. Chemistry and Biochemistry of Peroxidases (T.H. Gaspar, C.L. Penel, T. Thorpe and H. Grappin Eds.). *Peroxidases (1970-1980), a Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants*. Univ. of Geneve, p. 10–60.

German D.A. & Al-Shehbaz I. 2008. Five Additional Tribes (*Aphragmeae*, *Biscutelleae*, *Calepineae*, *Conringieae*, and *Erysimeae*) in the Brassicaceae (Cruciferae). *Harvard Papers in Botany*, Vol. 13, 1: 165–170.

Gülen, H., Küden, A., Krebs, S.L., Arora, R. 2002. Armut ve Ayvada Nişasta Jel Elektroforez Tekniğine Göre Peroksidaz İzoenzim Analizleri İçin En Uygun Yöntemin Belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*. 16: 191–200.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. (Eds) 2000. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement)*, vol. 11. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.

Hall, J.C., Sytsma K.J., Iltis, H.H. 2002. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae Based on Chloroplast Sequence Data. *Am. J. Bot.* 89(11): 1826–1842.

Hayek, A. 1911. Entwurf Eines Cruciferensystemes Auf Phylogenetischer Grundlage. *Beihefte Botanisches Centralblatt* 27: 127–335.

Hedge, I.C. 1976. A Systematic and Geographical Survey of the Old World Crcuferae. In: Vaughan J.G., Macleod A.J., Jones B.M.G. (eds.). *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*, 1–45. Academic Press, London.

Hedrick. U.P. 1972. *Sturtevant's Edible Plants of the World*. Dover Publications.

Heenan, P.B. & Mitchell, A.D. 2002. Genetic variation within the *Pachycladon* (Brassicaceae) complex based on fluorescent AFLP data. *Journal of The Royal Society of New Zealand* 32(3): 427–443.

Hsieh., T.H. 2005. *Rorippa sylvestris* (L.) Bess., a Newly Naturalized Mustard Species in Taiwan. *Taiwania*, 50(4): 297–301.

Hu, J., J., Sadowski, J., Osborn, T.C., Landry, B.S., Quiros, C.F. 1998. Linkage Group Alignment from Four Independent *Brassica oleracea* RFLP maps. *Genome*, 41: 226–235.

İnceoğlu, Ö., Karamustafa, F. 1977. The pollen morphology of plants in Ankara region II. Cruciferae. *Comm Fac Sci Üniv Ank Series C2* 21(6): 111–118.

Janchen, E. 1942. Das System der Cruciferen. *Osterreichische Botanische Zeitschrift* 91: 1–21.

Johansson, M., Ellegren, H., Andersson, L. 1992. Cloning and Characterization of Highly Polymorphic Porcine Microsatellites. *J. Hered.*, 83: 196–198.

Kamel, E.A., Hassan, H.Z., El-Nahas, A.I., Ahmed, S.M. 2004. Molecular Characterization of Some Taxa of the Genus *Raphanus* L. (Cruciferae=Brassicaceae). *Cytologia* 69(3): 249–260.

Karp, A. & Edwards, K.J. 1995. Techniques for the Analysis, Characterization and Conservation of Plant Genetic Resources. Reports of an IPGRI work shop, Rome, Italy.

Kemp, S.J., Brezinsky, L., Teale, A.J. 1993. A Panel of Bovine, Ovine and Caprine Polymorphic Microsatellites. *Animal Genet.* 24: 363–365.

Kesen, N. 2008. Anadolu orijinli yabancı buğdayların RAPD-PCR yöntemi ile genetik akrabalıklarının belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Khalik, K.A., van der Maesen L.J.G., Koopman W.J.M., Van den Berg R.G. 2002. Numerical Taxonomic Study of Some Tribes of Brassicaceae from Egypt. *Plant Systematics and Evolution.* 223 (3–4): 207–221

Khan, R. 2004. Studies on the Pollen Morphology of the Genus *Arabidopsis* (Brassicaceae) from Pakistan. *Pak. J. Bot.* 36(2): 229–234.

Khan, R. 2005. Studies on the Pollen Morphology of the Genus *Sisymbrium* and Monotypic Genera *Atelanthera* and *Arcyosperma* (Brassicaceae) from Pakistan. 2005. *Pak. J. Bot.* 37(1): 15–22.

Koch, M., Haubold B., Mitchell T. 2001. Molecular Systematics of the Brassicaceae: Evidence from Coding Plastidic *Matk* and Nuclear *Chs* Sequences. *Am. J. Bot.* 88: 534–544.

Koch, M., Mummenhoff, K., Hurka, H. 1999. Molecular Phylogenetics of *Cochlearia* (Brassicaceae) and Allied Genera Based on Nuclear Ribosomal ITS DNA Sequence Analysis Contradict Traditional Concepts of Their Evolutionary Relationship. *Plant Syst. Evol.* 216: 207–230

Koch, M.A. & Kiefer, C., 2006. Molecules and Migration: Biogeographical Studies in Cruciferous Plants. *Pl. Syst. Evol.* 259: 121–142.

Koch, M.A., Dobes, C., Kiefer, C., Schmickl, R., Klimes, L., Lysak, M.A. 2007. Supernetwork Identifies Multiple Events of Plastid *trnF* (GAA) Pseudogene Evolution in the Brassicaceae. *Mol. Biol. Evol.* 24: 63–73.

Koch, M.A., Dobes, C., Matschinger, M., Bleeker, W., Vogel, J., Kiefer, M., Mitchell-Olds, T. 2005 Evolution of the *trnF*(GAA) Gene in *Arabidopsis* Relatives and the Brassicaceae Family: Monophyletic Origin and Subsequent Diversification of a Plastidic Pseudogene. *Mol. Biol. Evol.* 22(4):1032–1043.

Kothera, L., Richards, C.M., Carney, E.S. 2007. Genetic Diversity and Structure in the Rare Colorado Endemic Plant *Physaria bellii* Mulligan (Brassicaceae). *Conserv Genet* 8: 1043–1050.

Kunkel, G. 1984. *Plants for Human Consumption*. Koeltz Scientific Books.

Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Action Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397–401.

Love, J.M., Knight, A.M., Mcleer, M.A., Todd, J.A. 1990. Towards Construction of a High-Resolution Map of the Mouse Genome Using PCR Analysed Microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 21: 1111–1115.

Lowe, A.J., Hanotte, O., Guarino, L. 1996. Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: the Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter.* 107: 50–54.

Marhold K., Lihovaâ, J., Perny, M., Bleeker, W. 2004. Comparative ITS and AFLP analysis of diploid *Cardamine* (Brassicaceae) Taxa from Closely Related Polyploid complexes. *Annals of Botany* 93: 507–520.

Markert, C.L. & Moller, F. 1959. Multiple Forms of Enzymes: Tissues, Cytogenic and Species Specific Patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 45: 753–763.

Maroof, S.M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zang, Q., Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1994. Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 937–945.

Meekins, J.F., Ballard, H.E., Jr., McCarthy, B.C. 2001. Genetic Variation and Molecular Biogeography of a North American Invasive Plant Species (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae). *International Journal of Plant Sciences* 162 (1): 161–169.

Mengoni, A., Baker, A.J.M., Bazzicalupo, M., Reeves, R.D., Adıgüzel, N., Chianni, E., Galardi, F., Gabbrielli R., Gonnelli, C. 2003. Evolutionary Dynamics of Nickel Hyperaccumulation in *Alyssum* Revealed by ITS nrDNA Analysis. *New Phytologist*.

Mengoni, A., Gonnelli, C., Brocchini, E., Galardi, F., Pucci, S., Gabbrielli, R., Bazzicalupo, M. 2003. Chloroplast Genetic Diversity and Biogeography in the Serpentine Endemic Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist* 157: 349–356.

Morgante, M. & Olivieri, A.M. 1993. PCR-Amplified Microsatellites as Markers in Plant Genetics. *Plant J.*, 3(1): 175–182.

Mummenhoff, K., Ggemann, H.B., Bowman, J.L. 2001. Chloroplast DNA Phylogeny and Biogeography of *Lepidium* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 88(11): 2051–2063.

Mummenhoff, K., Linder, P., Friesen, N., Bowman, J.L., Lee, J.Y., Franzke, A. 2004 Molecular evidence for bicontinental hybridogenous genomic constitution in *Lepidium sensu stricto* (Brassicaceae) species from Australia and New Zealand. *Am. J. Bot.* 91(2): 254–261.

Olowokudejo, J.D. 1992. Taxonomic Significance of Leaf Indumentum Characteristics of the Genus *Biscutella* (Cruciferae). *Folia Geobotanica* 27(4): 401–417.

Orcan N. & Binzet R. 2003. The Anatomical and Palynological Properties of *Alyssum obtusifolium* Steven ex DC. (Brassicaceae). *Turk J Bot.* 27: 63–68.

Ortega, J.F., Fuertes-Aguilar, J., Go´mez-Campo, Ce´sar., Santos-Guerra, A., Jansen, R. K. 1999. Internal transcribed Spacer Sequence Phylogeny of *Crambe* L. (Brassicaceae): Molecular Data Reveal Two Old World Disjunctions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11(3): 361–380.

Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M. 2001. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 112–159. ISBN 975–6652–05–5. Konya.

Özhatay, N. & Kültür, S. 2006. Check-List of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey III. *Tr. J. Bot.* 30: 281–316.

Özyurt, S. 1992. Ekonomik Botanik. Erciyes Üniversitesi Yayınları No: 47. Kayseri.

Panda, S., Martin, J.P., Aguinagalde, I. 2003. Chloroplast and Nuclear DNA Studies in a Few Members of the *Brassica oleracea* L. Group Using PCR-PFLP and ISSR-PCR Markers: a Population Genetic Analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1122–1128.

Parmaksız, İ. 2004. *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonunun Türkiye’de Yetişen Türlerinde Genetik Çeşitliliğin RAPD Markörleri ile Analizi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora tezi.

Pınar, N.M., Adıgüzel, N., Geven, F. 2007. Seed Coat Acrosulpturing in Some Turkish *Aethionema* R.Br. (Brassicaceae). Pak. J. Botany 39(4): 1025–1036.

Pınarkara, E. 2007. Uyuşturucu Tipi Kenevir Genotiplerinin RAPD-PCR Metodu ile Karakterizasyonu ve Kullanılan İstatistiki Yöntemlerin Değerlendirilmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Provan, J. & James, J. 2003. Patterns of Cytoplasmic Variation in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) Revealed by Polymorphic Chloroplast Microsatellites Campanella. Systematic Botany, 28(3): 578–583.

Rechinger, K.H. 1968. Flora Iranica. Akademische Druck and Verlagsanstalt, Graz, Austria.

Roder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrels, M.E., Tanksley, S.D., Ganai, M.W. 1995. Abundance, Variability and Chromosomal Location of Microsatellites in Wheat, Mol. Gen. Genet. 246: 327–333.

Saiki, R.K., Scharf, S.J., Fabona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350–1355

Scheen, A.C., Evlen, R., Brochmann, C. 2002. A Molecular–Morphological Approach Solves Taxonomic Controversy in Arctic *Draba* (Brassicaceae). Canadian Journal Botany 80: 59–71.

Schulz, O.E. 1936. Cruciferae. In A. Engler and K. Prantl [eds.], Die natürlichen Pflanzenfamilien 17b, 227–658. Engelmann, Leipzig, Germany.

Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. 1998. Tohumlu Bitkiler Sistematiği, Ege Üniv. Basımevi, Bornova-İzmir.

Soller, M. & Beckmann, J. S. 1983. Genetic Polimorphism in Varietal Identification and Genetic Improvement, Theor. Appl. Genet. 67; 25–33.

Şimşek, I., Aytakin, F., Yeşilada, E., Yıldırım, Ş. 2002. Anadolu'da Halk Arasında Bitkilerin Kullanılış Amaçları Üzerinde Etnobotanik Bir Çalışma. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.

Tanksley, S.D. 1983. Molecular Markers in Plant Breeding. Plant Mol. Biol. Rep., 1(1); 3-8.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. Nucleic Acids Res 17(16): 6463–6471.

Thomas, M.R. & Scott, N.S. 1993. Microsatellite Repeats in Grapevine Reveal DNA Polymorphisms When Analysed as Sequence-tagged Sites (STSs). Theor. Appl. Genet. 86: 985–990.

Tohmé, G. & Tohmé, H. 2005. Jabal Rihane Reserve. *Aram Periodical* 17: 85–356.

Townsend, C.C. & Guest, E. 1980. *Flora of Irak*. Vol. 4: 951–958. Ministry of Agriculture & Agrarian Reform, Baghdad.

Treuren, R.V., Kuitinen, H., Kiirkkiinen, K., Baena-Gonzalez, E., Savolainen, O. 1997. Evolution of Microsatellites in *Arabis petraea* and *Arabis lyrata*, Outcrossing Relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* 14 (3): 220–229.

Tuštaş, S. 2008. Türkiye *Fibigia* Medik. Cinsinin Morfolojik ve Sitotaksonomik Yönden İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Tutin, T.G. & Heywood, V.H. 1964. *Flora Europaea*, Vol. I, II. Cambridge University Press, Cambridge.

Ün, C., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Schellander, K., 2000. Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları. *Hayvansal Üretim* 41: 9–14.

Van den Berg, B.M., Wijsman, H.J.W., Bianchi, F. 1983. Genetics of the Peroxidase Isoenzymes in *Petunia*. *Theor. Appl. Genet.* 66: 173–178.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995 AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.

Vural, C. & İnce, A. 1994. Kahramanmaraş Engizek Dağlarındaki Bazı Endemik Bitkilerin Polen Morfolojisi. XII. Ulusal Biyoloji Kongresi 267–271. Edirne.

Walter, M.H. 1992. Regulation of Lignification in Defence (T.Boller and F.Meins eds.). *Plant gene research-genes involved in plant defence*. Springer-Verlag 329–352.

Wang, L.L., Li-Ping, Z., Yi-Qin, G., Ming-Xia, W., Li-Ming, C., Jin-Lan, Y., Yan, W., Fan-Min, Y., Long-Zhi. 2008. DNA Fingerprinting and Genetic Diversity Analysis of Late-Bolting Radish Cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae* 116: 240–247.

Warwick, S.I., Sauder C.A., Al-Shehbaz I.A. 2008. Phylogenetic Relationships in the Tribe *Alysseae* (Brassicaceae) Based on Nuclear Ribosomal ITS DNA Sequences. *Botany*. 86: 315–336.

Weber, J.L. & May, P.E. 1989. Abundant Class of Hranan DNA Polymorphism Which can be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388–396.

Welsh, J., & McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213–7218.

White, G. & Powell, W. 1997 Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in *Smetenia Humilis* (Meliaceae); An Endangered Tropical Hardwood Species *Mol. Eco.* 16: 851–860.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6231–6235.

Wodehouse, R.P. 1935. *Pollen Grains*. Mc Graw, Hill New York.

Wu, K.S. & Tanksley, S.D. 1993. Abundance, Polymorphism and Genetic Mapping of Microsatellites in Rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225–235.

Yıldırım, A. & Kandemir, N. 2001. Genetik markörler ve analiz metodları. In: Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M. (ed.). 2001. *Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 112–159. ISBN 975–6652–05–5. Konya.

Yıldırım, Ş. 2001. The Chorology of the Turkish Species of Brassicaceae, Buddlejaceae and Buxaceae Families. *Ot Sistematik Botanik Dergisi* 8 (1): 141–171.

Zhao, X. & Kochert, G. 1993. Phylogenetic Distribution and Genetic Mapping of a (GGC)<sub>n</sub> Microsatellite from Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 21: 607–614.