

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tehtid Altındaki *Centaurea lycaonica* Boiss.& Heldr. (Compositae)
Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi Üzerine Moleküler Bir
Çalışma

EDA ÖZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Konya, 2008

**T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Tehtid Altındaki *Centaurea lycaonica* Boiss.& Heldr. (Compositae)
Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi Üzerine Moleküler Bir
Çalışma**

EDA ÖZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 12.08.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. Kuddisi ERTUĞRUL
DURAL
(Danışman)**

**Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK
(Üye)**

**Doç. Dr. Hüseyin
(Üye)**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**Tehtid Altındaki *Centaurea lycaonica* Boiss.& Heldr. (Compositae)
Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi Üzerine Moleküler Bir
Çalışma**

Eda ÖZEL

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL
Temmuz 2008, 58 Sayfa

Jüri: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL
Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK
Doç. Dr. Hüseyin DURAL

Ülkemizde *Centaurea* cinsi içinde oldukça fazla sayıda lokal yayılış gösteren ve nesli tehdit altında endemik tür olmasına rağmen bu türlerin gen havuzlarının ne derecede genetik çeşitliliğe sahip olduğu hakkında hiçbir bilgi yoktur. Çalışmanın temel amacı, ilk olarak 1845 yılında Konya civarından keşfedilen ve şu anda tehlike altında olan *C. lycaonica* Boiss. & Heldr. türünün populasyon içi genetik çeşitliliğini moleküler yöntemlerle belirlemektir.

Bu çalışmada, Konya çevresinde yayılış gösteren lokal endemik türlerden birisi olan *C. lycaonica*'nın doğal populasyonundaki bireyler arasındaki genetik farklılık düzeyini belirlemek ve populasyon içerisindeki polimorfizmi tespit etmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde tek bir populasyondan rasgele örneklenen 30 birey üzerinde 6 RAPD markörü kullanılarak, toplam 84 adet bant elde edilmiştir. Bunlardan 61 tanesi polimorfik (% 73) ve 23 tanesi monomorfik (% 27) olarak tespit edilmiştir. Polimorfizm oranı OPG2 ve

OPB19 primerleri ile % 85, OPB17 ve OPB8 primerleri ile % 75 oranında tespit edilmiştir. En düşük polimorfizme sahip olan OPB7 primerinde bu oran % 46'dır.

Buna göre populasyon içindeki bireyler arasında toplam % 73 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bireyler arasında genetik çeşitliliğin yeterince yüksek olması onların doğal seleksiyona karşı gelecekte ciddi manada bir direnç sergileyeceğini gösterse de yakın gelecekte bu türlerin *in vivo* ve *in vitro* şartlar altında korunmaları gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Populasyon genetiği, Genetik seçiciler, *Centaurea lycaonica*, Endemik bitkiler, Türkiye.

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

A molecular Study on the Determination of the Genetic Diversity in the Population of the Threatened *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr. (Compositae)

ÖZEL, Eda

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

July 2008, 58 pages

Jury: Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK

Assoc. Prof. Dr. Hüseyin DURAL

Although the genus *Centaurea* has numerous local and threatened endemic species in our country, we have not any information on gene repository and the level of genetic diversity of these species. The aim of this study is to define the genetic diversity in the population of threatened *C. lycaonica* species, firstly discovered in 1845 in Konya region.

In this research, It was purposed to detect the level of genetic differences among individuals and to determine the polymorphism in natural population of *C. lycaonica*. For this goal, a total of 84 tracks were obtained using six RAPD markers on the randomly sampling of 30 individuals of the population. 61 tracks were polymorphic (73 %) and 23 tracks were monomorphic (27 %). The most

polymorphic ratio is 85 % in OPG2 and OPB19, the following primers are OPG17 and OPB8 (75 %). The lowest polymorphic ratio is 46 % in OPB7.

As a result, it was found out that the polymorphism ratio of individuals in this population was 73 %. Although this result showed that this population have well enough genetic resistance to survive in his area, it was necessary that these population should be preserved by *in vivo* and *in vitro* methods in future.

Key Words: Population genetics, Genetic markers, *Centaurea lycaonica*, Endemic plants, Turkey.

ÖNSÖZ

Bilim ve teknolojinin hızla geliştiği dünyamızda, doğal besin kaynaklarının azalması bilim adamlarını kuraklığa dayanıklı yeni türlerin üretilmesi hedefine yönlendirmiştir. Bu çalışmanın sadece *Centaurea* cinsi türleri için değil, tüm endemik doğal bitki türlerimiz için doğal ortamlarında korumaya yönelik iyi bir model olacağı düşünülerek; tehdit altındaki türlerin yok olma riskinin ve etkileyen faktörlerin kısa sürede tespit edilmesi, korunmaları noktasında en önemli adımların atılması, gittikçe kuraklaşan dünyada kserofit karaktere sahip yabancı gen kaynaklarımızın iyi korunması ve gelecek nesillere aktarılmasının açıklanması açısından önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

Yüksek lisans çalışmam süresince her zaman destek ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a, her konuda desteğini gördüğüm, bilgi, beceri ve yorumlarından faydalandığım Dr. Tuna UYSAL'a, moleküler çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan Yrd. Doç.Dr. Emine ARSLAN'a, çalışma materyalimin toplanması esnasında ki yardımlarından dolayı Yrd. Doç.Dr. Osman TUGAY'a, Selçuk Üniversitesi 07201015 nolu proje ile çalışmamda maddi destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri kordinatörlüğüne (BAP) ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Her zaman ve yüksek lisans çalışmalarım süresince sabırlarını, maddi ve manevi olarak yardımlarını benden esirgemeyen başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

2008, Konya

Eda ÖZEL

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. <i>Centaurea lycaonica</i> Boiss.& Heldr.	13
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Sterilizasyon	21
3.3. Metot	21
3.3.1. DNA İzolasyonu	21
3.3.2. DNA Konsantrasyonunun Tayini	22
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	25
3.3.4. Optimizasyon.....	25
3.3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonun bütün örneklerle uygulanması ..	27
3.4. DNA Bantlarının Skorlanması	32
3.5. Veri Analizi	32
4. DENEY SONUÇLARI	34
4.1. Genotipler Arasındaki Genetik Farklılıklarının Saptanması	34
4.2. Elde edilen Dendrogramların Değerlendirilmesi	36
4.2.1. OPG2 Primerinin Değerlendirilmesi	36
4.2.2. OPG17 Primerinin Değerlendirilmesi	37
4.2.3. OPB7 Primerinin Değerlendirilmesi	38

4.2.4. OPB8 Primerinin Değerlendirilmesi	39
4.2.5. OPB18 Primerinin Değerlendirilmesi	40
4.2.6. OPB19 Primerinin Değerlendirilmesi	41
4.2.7. Bütün Verilerin Değerlendirilmesi	42
5. TARTIŞMA ve ÖNERİLER	44
6. KAYNAKLAR	50
7. EKLER	57
7.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Malzemeler	57
7.2. Kullanılan Çözelti ve Solüsyonlar	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

AG: Ayırma Gücü

BSA: Bovin Serum Albumin

bp: Baz çifti

cM: Santimorgan

cm: Santimetre

CTAB: Setil Trimetil Amonyum Bromür

dATP: deoksi adenzin trifosfat

dCTP: deoksi sitidin trifosfat

dGTP: deoksi guanozin trifosfat

dk: Dakika

DNA: Deoksiribo nükleik asit

dTTP: deoksi timidin trifosfat

dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP

EDTA: Etilendiamin tetraasetikasit

EST: Expressed Sequence Tags

g: Gram

HCl: Hidroklorik asit

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat (Basit Sekanslar Arası Tekrarlar)

IUCN: Dünya Koruma Birliği

kg: Kilogram

l: Litre

M: Molar

MA: Moleküler ağırlık

mA: Miliamper

MgCl₂: Magnezyum klorür

ml: Mililitre

mM: Milimolar

mtDNA: Mitokondrial DNA

NaCl: Sodyum klorür

ng: Nanogram

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pg: Pikogram

PIC: Polymorphism Information Content (Polimorfik bilgi içeriği)

PVP: Polivinilpirolidon

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rasgele Çoğaltılmış DNA polimorfizmi)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

rpm: Dakikadaki döngü

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

SSR: Simple Sequence Repeat (Basit Sekans Tekrarları)

T : °C cinsinden sıcaklık

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris/borat/EDTA (tampon çözeltisi)

Tm: Erime sıcaklığı

Tris: Tris (hidroksil metil) aminometan

Tris-HCl: Tris hidroklorür

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (Ölçülmemiş Grupların Aritmetik Ortalaması)

UV: Ultraviyole

v/v: Hacim / Hacim

V: Volt

w/v: Ağırlık / Hacim

W: Watt

β-ME : Beta-Mercaptoethanol

μl: Mikrolitre

μM: Mikromolar

1. GİRİŞ

Bir ülkenin en önemli doğal kaynaklarından birisi de bitki örtüsüdür. Bu nedenle her ülke kendi florasına ait bitkileri tespit etmekte, onlar üzerinde dokümantasyon, gen kaynaklarının belirlenmesi, değerlendirilmesi ve bitkilerin doğal ortamlarında korunması gibi benzer konularda çalışmalar yapmaktadır (Uysal 2006).

Türkiye, bitki çeşitliliği bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir. Bu oluşumun en önemli nedenleri; iklim farklılıkları, topografik, jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilikler, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükseklik ve ekolojik farklılıklardır (Atalay 1994). Türkiye florasının ilginçliği, bu farklılıkların sonucu olarak meydana gelen tür zenginliğinin yanı sıra, çok sayıda endemik tür içermesinden de kaynaklanmaktadır (Özel 2002).

Ülkemizde, son yıllarda hızlı bir şekilde gelişme gösteren sanayileşme ve şehirleşme faaliyetleri, tarım alanlarının genişletilmesi ve aşırı otlatma, çorak alanların ıslah edilmesi, tarımsal mücadele ve çevre kirlenmesi, orman yangınları, yurtdışına ihraç edilmesi ve yurtiçinde kullanılması, doğal ekosistemlere yerli olmayan istilacı türlerin getirilmesi özellikle dar yayılış alanına sahip olan bitkiler üzerinde olumsuz etkiler yapmaktadır (Boşgelmez 2005).

Gerek bitki biyoçeşitliliği, gerekse yüksek endemizm oranı ve bu bitkilerin karşı karşıya oldukları tehlikeler göz önüne alındığında ülkemize ait güncel koruma stratejilerinin belirlenmesi gereği ortaya çıkmaktadır. Birçok önemli ve endemik bitki türünün yeterince korunması, tehlike altına girmemesi veya yok olmaması konusunda araştırmacılara bu anlamda büyük sorumluluklar düşmektedir.

Dünya genelindeki çevre sorunları, başlangıçta yakın çevre açısından ele alınmış; daha sonraki yıllarda, ülke, kıta ve küresel düzeydeki yaklaşımlar, ön plana çıkmıştır. Çevresel etki değerlendirme yöntemi geliştirilerek, biyolojik zenginliklerin korunması, sürdürülebilir kullanımın gerçekleştirilmesi, türlerin ve habitatların muhafazası amacıyla çalışmalar başlatılmıştır. Biyolojik çeşitliliğin korunması, tüm ülkelerin ortak sorumluluğu altında olduğu için, çeşitli sözleşmeler hazırlanmıştır;

özellikle de, 1970–1980 yılları arasında, uluslararası doğa koruma aktiviteleri belirgin şekilde artmıştır. Ülkemiz de, bunların önemli bir bölümüne taraf olmuştur (Boşgelmez 2005).

Bitki türlerinin içerdiği çeşitlilik bakımından Dünyada, türlerin ana vatanı olarak 8 gen merkezi bulunmakta ve ikisi ülkemiz üzerinde çakışmaktadır. Ülkemizde 5 ayrı mikrogen merkezinin bulunması ülkemizin bitkisel çeşitlilik ve gen kaynakları bakımından önemini kanıtlar. Bu çeşitliliğin muhafazası amacı ile 1964’de dünyadaki ilk ülkelerden biri olarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından çalışmalara başlanmıştır. Ülkemiz 1992 yılında imzalanan “Biyolojik Çeşitlilik Anlaşması” çerçevesinde “Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Eylem Planı” içerisinde bitki genetik kaynaklarının muhafazası ile yükümlüdür. Buna göre biyoçeşitliliğin azalmasına yol açmayacak şekilde ve oranda kullanımı, böylece bugünkü ve gelecekteki nesillerin ihtiyaçlarını karşılama ve muhafaza etmesi gerekmektedir. Türkiye’de biyoçeşitliliğin korunmasında daha çok nesli tehdit altında olan türler ile endemik türlerin korunmasına ağırlık verildiği görülmektedir (Demirayak 2002).

Dünyada yetişen bitki türlerinin; özellikle dar ve sınırlı yayılış alanına sahip endemiklerin korunmaları konusunda son yıllarda ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda taksonların uluslar arası tehlike sınıflarından hangisine ait olduğu belirlenerek, koruma amaçlı alınacak önlemlerde öncelik çok baskı altında olup nesli kaybolma tehdidi altında olanlara verilmektedir. Bu amaçla ülkemizde yapılan ilk çalışmada ülkemizde tehdit altındaki nadir ve endemik bitki türleri IUCN’in eski tehlike sınıflarına göre listelenmiştir (Ekim ve ark. 1989). Bu liste 2000 yılında yeni IUCN tehlike sınıflarına göre yeniden düzenlenmiştir. Buna göre çeşitli tehdit kategorilerinin oluşturulması ve bu kategorilere giren taksonların belirlenmesinin yanı sıra, sözü edilen bitkilerle ilgili olarak ayrıntılı biyolojik çalışmalar yapılması ve korunmalarına ilişkin alışlagelmiş ya da alternatif yöntemlerin oluşturulması, araştırmacıların üzerinde durması gereken önemli bir konudur (Ekim ve ark. 2000).

Koruma çalışmaları sırasında bitki isimlerinin yanında bitkinin yayılışı, populasyon genişliği ve yapısı, ekolojik istekleri, fizyolojik toleransı, döllenme sistemi, tozlaşma ve yayılma ekolojisi, çimlenme fizyolojisi, fide ve gelişmiş

devrelerindeki rekabet derecesi ve hatta popülasyondaki böcekler gibi popülasyon yaşamının devamı ile ilgili birçok konu hakkında ayrıntılı bilgi gerekir (Ekim ve ark. 2000).

Bitki biyoçeşitliliği ile korumadaki ilk amaç ve açık hedef bitki türlerindeki korunmuş bölgelerin sürdürülmesi ve yok olma riskindeki türlerin devamlılığın sağlanmasıdır. Uzun dönemdeki yaklaşımlar yabancı bitkilerin korunması ve çoğaltılmasıdır (Maxted 2003).

Nadir taksonların korunması için alınan kararlar, onların hayatta kalmasını en iyi şekilde etkileyen genetik değişkenliği içeren biyolojik ve diğer faktörleri anlamayı gerektirdiği halde genellikle koruma yönetimi kararları onların genetik değişkenliği veya ekolojisi hakkında yeterli bilgi olmaksızın hızlı bir şekilde yapılmakta ve bu tip çalışmalardan düşük verim alınmaktadır (Godt ve ark. 1995). Bu nedenle koruma yönetiminde öncelik gerektiren, özellikle nadir türlerde genetik çalışmalardır. Genetik çeşitlilik ölçümlerinin sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda geliştirilen çağdaş koruma önlemleri klasik koruma yöntemlerinin ortaya koyamadığı veya belirleyemediği tehdit unsurlarını ortaya çıkarmakta ve sorunların kısa vadede çözülmesine imkân tanımaktadır (Boşgelmez 2005).

Endemik ve nadir türler tipik olarak düşük seviyede genetik çeşitlilik sergiler (Hamrick ve Godt 1989). Bu genetik çeşitliliğin kaybı; çevresel değişimlere, demografik faktörlere ve diğer sebeplere maruz kalıp nesli tükenen türlerden kaynaklanır (Ellstrand ve Elam 1993).

Genetik çeşitlilik çalışmaları; birden fazla sayıda popülasyonu bulanan türler için, var olan genetik farklılığın temellerinde daha iyi popülasyonları seçmek için, tek bir popülasyondan bilinen türlerde ise genetik farklılık düzeyini açıklamak ve kurtarılması beklenen türlerin canlılığının ve neslinin devamının sağlanması için yapılır. Çeşitli yöntemlerle çevresel ve biyolojik faktörler altında genetik yapı belirlenebilir ve karakterize edilebilir (Escudero ve ark. 2003). Genetik çeşitlilik, değişen çevreye karşı popülasyonların varlığını devam ettirmesi için önemli bir faktör olarak düşünülür ve temel bir unsur olarak tanımlanır (Nei ve Kumar 2000).

Sınırlı sayıda olan doğal kaynaklarımızdaki genetik çeşitliliğin korunması ve gerektiğinde verimli bir şekilde kullanımları için bünyelerindeki genetik varyasyonun belirlenmesi gerekir. Popülasyon genetiği, popülasyonlardaki fertlerin

benzerlik ve farklılıklarının kaynaklarını araştıran bir genetik alt dalıdır. Bilim adamları populasyon genetiğinin metot ve prensiplerini kullanarak canlı topluluklarının genetik yapısı, genlerin populasyonlardaki dağılımlı, belirli gen ve genotip frekanslarının populasyonlarda nasıl ve neden korunduğu, bazı genotip frekanslarının neden zamanla sona erdiğini ya da kaybolduğunu, populasyonlar ve jenerasyonlar arası gen akışının belirlenmesi ile ilgili birçok araştırma yapmaktadırlar. Bu bilgiler evrimsel sürecin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Bir populasyon içinde birden fazla gen veya fenotipik özellik varsa, o populasyonun polimorfik olduğu söylenir ve polimorfizm genetik markırlarla belirlenir (Aygün 2006). Polimorfizm, DNA'daki yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve parça yerleşmeleri ile meydana gelir ve genleri, onların düzenlenmelerini, biyokimyayı, gelişmeyi, morfolojiyi, davranışı etkileyeceğinden evrim sürecinde fenotipik varyasyonun da kaynağıdır (Britten 1986). Bireyin fenotipik ve/veya genotipik özelliklerini saptayan genetik işaretler genetik markır olarak tanımlanır ve hem protein hem de DNA sekansındaki varyasyonu açığa çıkaran ölçülebilir, belirlenebilir bir karakterdir (Aygün 2006).

Varyasyonları tespitinde sitolojik veriler, izoenzimler, tohum depo proteinleri gibi biyokimyasal işaretleyiciler ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) gibi moleküler işaretleyiciler başarıyla kullanılmaktadır (Stuber 1992).

Son yıllarda bitki araştırcıları tarafından çok yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar, kaynağını kendilerinin üretildiği bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA'lardan aldığı için, bitki populasyonundaki çeşitlilik veya o populasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilir (Gülşen ve Mutlu 2005). Bu markırlar yardımıyla araştırmacılar morfolojik olarak çok benzerlik gösteren tür, çeşit veya tipler ve ebeveynleri hakkında kesin bilgiler elde edebilmektedirler (Karaca 2002).

Çalışmada kullandığımız RAPD markırları genellikle 10bp uzunluğunda ve nükleotid dizilimi rasgele seşitmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanmaktadır.

Bu primerler tasarlanırken primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha fazla olmasına dikkat edilir (Gregor ve ark. 1994). Teknik, çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, daha az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kaliteli DNA ile çalışılabilmesi, radyoaktif madde kullanımını gerektirmemesi gibi bir takım avantajlara sahiptir (Yıldırım ve Kandemir 2001, Karaca 2002, Temizkan ve Arda 2004). Ayrıca polimorfizm oranı diğer tekniklerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir (Whitkus 1994). Ancak RAPD markırlarının bazı dezavantajları vardır. Bunlardan biri RAPD markörlerinin dominant olması nedeni ile heterozigot bireyleri saptayamaması bu yöntemi kısıtlayan en önemli etkenlerdir (Altinkunt 2001). Diğer de RAPD markırlarının tekrarlanabilirliğinin, PCR ve DNA tespiti sırasında şartların tam olarak kontrol edilememesi nedeniyle düşük olmasıdır (Harris 1999). RAPD verilerinin tekrarlanabilirliği için amplifikasyon reaksiyonlarının her bir basamağının dikkatli bir şekilde optimize edilmesi gerekir (Michelia and Bova 1997).

Bu çalışmada, Konya çevresindeki biri tip lokalitesi olmak üzere sadece iki lokaliteden bilinen, ülkemiz için dar yayılışlı endemik bir tür olan ve EN (tehlikede) kategorisinde yer alan *C. lycaonica* populasyonundaki genetik çeşitlilik tespit edilerek ileride yapılacak olan koruma çalışmalarına katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Asterales tüm dünyada çiçekli bitkiler arasında 26000'den fazla tür sayısı ile en zengin ordolardan birisidir (Lundberg 2001). Yaklaşık 1600 cins, 23000 türden oluşan *Compositae* familyası çiçekli bitki familyaları içinde tür sayısı bakımından en büyük familyadır (Wagstaff ve Breitmieser 2002). *Compositae* familyasının dördüncü büyük cinsi olan *Centaurea* cinsi tüm dünyada 400 civarında tür içerir (Wagenitz ve Hellwing 1996). *Centaurea* cinsi Türkiye Florası'nın 5. cildinde 172 türle temsil edilmektedir (Wagenitz 1975). Floranın yayınlanmasından sonra eklenen türlerle toplam sayı 180'e çıkmıştır (Uysal 2008). Bu türlerde endemizm oranı %61.6'dır. (Martin ve ark. 2006)

Dittrich (1968a), *Centaurea* cinsi akenleri üzerine yapmış olduğu morfolojik araştırmalar neticesinde bu cinse ait seksiyonların tipik aken yapılarına sahip olduklarını ve seksiyonlar arasında önemli farklılıkların olduğunu tespit etmiştir.

Dittrich (1968b), *Carduaceae* ve *Centaureinae* altoymağı türlerinin aken yapılarını incelemiş ve bu altoymağın 3 farklı hilum tipine sahip olduğunu bildirmiştir. Bunlar; lateral (*Centaurea montana* L.), caudatum (*Centaurea ruthenica* Lam.), basal tip *Rhaponticum carthamoides* (Wild.) Iljin'dir.

Centaurea cinsinde yapılan monografik çalışmalara göre Türkiye ve komşuları Irak, İran ve Transkafkasya bölgeleri *Centaurea* cinsi için ana farklılaşma merkezidir. Bu durumu özellikle tür ve seksiyon sayısının fazla oluşu destekler. *Centaurea* taksonları açısından Türkiye'nin Asya bölümüyle Balkan Yarımadasını karşılaştıran rapora göre Türkiye'nin cins sayısı Balkan yarımadasının iki katından daha fazla bulunmuştur. Bu iki alan arasında yaygın biçimde yayılış gösteren tür sayısının 25 civarında olmasını da şaşırtıcı bulmuştur (Wagenitz 1975). Bu durum ülkemizin *Centaurea* cinsi için ana farklılaşma ve gen merkezi olduğunu açıkça göstermektedir.

Tuzlacı (1978), Güney Balkan'larda yayılış gösteren *Centaurea amplifolia* Boiss.& Heldr. türünün Türkiye'deki varlığını tespit etmiş ve tanıtıcı özelliklerini vermiştir.

Kaya (1985), *Centaurea derdereifolia* Wagenitz ve *C. saligna* (C. Koch) Wagenitz türlerini taksonomik, ekolojik ve palinolojik olarak incelemiştir.

Kaya (1987), endemik *Centaurea derderiifolia* Wagenitz ve *C. saligna* (C. Koch) Wagenitz türlerinin iç ve dış morfolojik özellikleriyle birlikte, her iki türü iç morfolojileri yönünden karşılaştırmıştır.

Kuş (1991), *Centaurea amasiensis* Bornm. ve *C. amplifolia* Boiss.& Heldr. türlerinin genel özelliklerini vermiş, morfolojik ve anatomik yapıları detaylı olarak tanıtmıştır.

Pehlivan (1996), *Centaurea cariensis* Boiss. , *C. consanquinea* DC, *C. deflexa* Wagenitz, *C. dichora* Boiss & Heldr. , *C. haradjianii* Wagenitz, *C. inexpectata* Wagenitz, *C. lycia* Boiss. , *C. olympica* C. Koch, *C. pinetorum* Hub-Mor., *C. wiedemanniana* Fisch & Mey. türlerinin polen morfolojilerini ışık mikroskobu kullanarak incelemiştir.

Pınar ve İnceoğlu, (1996), *Centaurea triumfettii* All. Grup A, B, C polen morfolojilerini ışık ve elektron mikroskobunda karşılaştırmalı olarak incelemiştir.

Kaya ve ark. (1996), Türkiye'nin bazı endemik *Centaurea* türleri üzerine polen incelemeleri yapmışlardır. Çalışmalarında *Centaurea drabifolia* subsp. *austro-occidentalis* Wagenitz türünün polen tipinin üç oluklu ve şeklinin küresel olduğunu tespit etmişlerdir.

Garcia-Jacas ve İlarıslan (1997), *Centaurea* cinsinin Türkiye'de yetişmekte olan bazı türlerini karyolojik olarak incelemiş ve kromozom sayılarını vermiştir.

Garcia-Jacas ve ark. (1998), Batı Asya'da yayılış gösteren bazı *Centaurea* türlerinin kromozom sayılarını ortaya koymuştur.

Yaman (1998), *Centaurea solstitialis* subsp. *pyracantha* (Boiss.) Wagenitz ve *C. pestalozzae* Boiss. türleri üzerinde morfolojik ve palinolojik çalışmalar yapmıştır.

Villodre ve Garcia-Jacas (2000), *Centaurea alba* L., *C. aucheri* (DC) Wagenitz, *C. behen* L. , *C. calcitrapa* L. , *C. diffusa* Lam. , *C. diluta* Aiton, *C. eriophora* L. , *C.fragilis* Duricu, *C. glastifolia* L. , *C. macrocephala* Muss. & Puschk, *C. melitensis* L. , *C. nigra* L. , *C. pulchella* Ledeb, *C. pullata* L. , *C. pungens* Pomel, *C. sulphurea* Willd., türlerinin polen analizlerini elektron mikroskobu kullanarak yapmıştır.

Wagenitz ve Hellwig (2000), Önceden *Centaurea* cinsine ait bir seksiyon

olan *Psephellus* (Cass.) DC. morfolojik, anatomik, palinolojik ve karyolojik araştırmalar neticesinde elde edilen bilgilere dayalı olarak cins kategorisine yükseltilmiştir. Bu cinsle birlikte aynı zamanda *Psephelloideae* (Boiss.) Sosn. *Hyalinella* Tzvel., *Aetheopappus* (Cass.) O. Hoffm, *Amblyopagon* (DC.) Sosn., *Heterolophus* Cass., *Czerniakovskya* Czerep., *Odontolophoideae* Tzvel, *Odontolophus* Cass., *Xanthopsis* (DC.) Tzvel., *Uralepis* DC. ve *Sosnovskya* Takht. seksiyonlarına ait toplam 75 tür (Özellikle Türkiye ve İran'dan) *Centaurea* cinsinden ayrılmıştır.

Villodre ve Garcia-Jacas (2000), *Centaurea* cinsinin *Jacea* seksiyonuna ait türlerin palinolojik çalışmasını yapmış, bu türlerin Elektron Mikroskobu fotoğraflarını vermiştir.

Ochsmann (2000), polimorfik bir cins olan *Centaurea*'nın geniş bir grubunun (Sect. *Acrolophus*) 600'e yakın türünün sadece klasik metotlarla sınıflandırmasını yapmıştır.

Kaya ve ark. (2000a), endemik *C. zeybekii* Wagenitz türünün morfolojik, anatomik ve palinolojik incelemesini yapmıştır.

Kaya ve ark. (2000b), endemik *Centaurea calolepis* Boiss. , *C. ensiformis* P. H. Davis., *C. kilea* Boiss., *C. lycia* Boiss. , *C. reuterana* var. *phrygia* Boiss. , *C. solstitialis* subsp. *pyracantha* (Boiss.) Wagenitz türlerinin polen morfolojilerini ışık mikroskobunda incelemiştir.

Porras ve Munoz (2000), *C. melitensis* L. türünün kleistogam kapitulumu üzerine bir çalışma yapmışlardır.

Tornadore ve ark. (2000), *C. nobilis* (Groves) Brullo, *C. leucadea* Lacaíta, *C. Japigica* (Lacaíta) Brullo türleri arasındaki sistematik ilişkiyi DNA analizi ve tohum morfolojilerini çalışmışlardır.

Kaya ve ark. (2000a), birçok endemik *Centaurea* türünün morfolojik, anatomik ve palinolojik çalışmalarına yer vermiş, polen morfolojilerini ışık mikroskobu kullanarak incelemişlerdir.

Kapusuz (2000), *Centaurea cyanus* L., *C. behen* L., *C. calcitrapa* L., *C. iberica* Trev., ve *C. jacea* L. Türkiye'de kullanılan tıbbi bitkiler arasında yer almakta olduğunu dilegetirmiştir.

Kaya ve ark. (2001), *C. hypoleuca* DC, *C. nigrifimbria* (C. Koch) Sosn. , *C. pulcherrima* Willd. var. *pulcherrima*, *C. stenolepis* Kerner, *C. triumfetti* All. , *C. Urvillei* DC subsp. *urvillei* türlerinin polen morfolojilerini çalışmıştır.

Susanna ve Garcia Jacas (2001), *Centaureainae* altoymağında yapmış oldukları moleküler çalışmalarında *Centaurea* cinsinde yer alan *Psephellus* seksiyonunu ayrı bir cins olarak teklif etmişlerdir. Avrupada şu anda cins olarak değerlendirilen *Psephellus* Türkiye florasında hala *Centaurea* cinsine ait bir seksiyon olarak tasnif edilmiş durumdadır. Araştırmacılar aynı zamanda elde ettikleri moleküler verilere göre bu alt oymağın *Jacea*, *Cyanus*, *Acrocentron* ve *Carthamus* olmak üzere dört büyük gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Bu gruplar içerisinde birbirlerine en yakın olanları *Cyanus* ve *Jacea* gruplarıdır.

Genç ve Kaya (2002), endemik *Centaurea tosiensis* Freyn & Mint üzerinde morfolojik, anatomik ve palinolojik çalışmalar yapmıştır.

Ertuğrul ve ark. (2004), *Centaurea* cinsine ait bazı morfolojik karakterlerin evrimi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda aken, brakte ve apendajlarının seksiyonların ayrılmasında temel karakterler olabileceği belirtmişlerdir. Ancak bu çalışmada apendaj yapılarının ara formlar sergilediği ve oldukça çeşitlilik gösterdiğini tespit edilmişlerdir.

Romaschenko ve ark. (2004), *C. crysantha* Wagenitz, *C. calolepis* Boiss, *C. alexandrina* Delile, *C. iconensis* Hub-Mor. , *C. deflexa* Wagenitz, *C. kotschy* (Boiss. Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz, *C. pinardii* Boiss. , *C. aladaghensis* Wagenitz, *C. cataonica* Boiss. & Hausskn. , *C. kurdica* Reichardt, *C. behen* L., *C. rigida* Banks & Sol. , *C. sarandinakiae* N. B. Illar *semijusta* Juz. , *C. sterilis* Stev. , *C. Vankovii* Klokov, *C. antitauri* Hayek, *C. donetzica* Klokov, *C. proto-gerberi* Klokov, *C. pseudoleucolepis* Kleopow, *C. cheirolepidioides* Wagenitz, *C. cherirolopha* (Fenzl) Wagenitz, *C. isaurica* Hub-Mor. türlerine ait kromozom sayılarını yayınlamışlardır.

Atar (2006), *C. kilaea*'da aken ve papusların *C. cuneifolia*'ya göre daha büyük, gövde yapraklarının daha sık ve grimsi renkte olduğu tespit edilmiştir. İki türde de polenlerin trikolporat; ancak *C. kilaea* polenlerinin *C. cuneifolia*'dan daha büyük olduğu saptanmıştır.

Uysal (2006), Türkiye *Centaurea* (Asteraceae) Cinsi *Cheirolepis* (Boiss.) O. Hoffm. Seksiyonunun Morfolojik, Karyolojik ve Moleküler Revizyonunu yaparak seksiyonun temel kromozom sayısını $x=9$ olarak belirlemiş ve çalışılan gruba özgü genetik kodu genom analizleri ile ortaya koymuştur. Yakın seksiyonlardan *Pteracantha* Wagenitz ve *Plumosipappus* (Czerep.) Wagenitz seksiyonları sinonim yapmış ve *Cheirolepis* seksiyonunun sınırlarını genişletmiştir.

Uysal ve ark. (2008), çalışmamızda konusu olan *Centaurea lycaonica* türünün mensubu olduğu *Phalolepis* seksiyonunun tüm Akdeniz fitocoğrafik bölgesi boyunca yer alan Yunanistan, Kıbrıs, İtalya, İspanya başta olmak üzere Avrupa ülkelerinde yaklaşık 45 türle temsil edilen oldukça büyük ve önemli bir seksiyon olduğunu belirtmişlerdir. Türkiye’de bu seksiyon 10 türle temsil edilmekte olup (Davis 1975) türlerinin büyük bir kısmı lokal endemik olduğunu dilegetirmişlerdir. Türkiye’de yer alan türlerin tamamına yakın kısmı kserofit karakterli olup genellikle habitat olarak kireçtaşı veya kalker kayalıkları tercih etmekte olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca *Centaurea* cinsine ait bazı türler özellikle İtalya gibi Avrupa ülkelerinde geleneksel olarak tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. *C. scabiosa* L. ve *C. cyanus* L. gibi türlerden elde edilen droglar özellikle soğuk algınlığına karşı kullanılmaktadır. Ayrıca yaralanma sonucu meydana gelen acıyı azaltmak ve tedavi etmek amacıyla biberle karıştırılmak suretiyle kullanılmaktadır. Kuvvet verici ve diüretik olarak kullanılmakla birlikte kanser tedavisinde kullanılmaları da söz konusudur (Grieve 1995, Flamini ve ark. 2001). Yurdumuzda bir çok türü olan bu cinse, genellikle peygamber çiçeği, gökbaş, çoban kaldıran, kotankıran, zerdali diken, acımık, deligöz diken, sarıbaş, kötürüm, adları verilmektedir (Baytop 1997).

RAPD tekniği, Moleküler sistematik, filogeni, populasyon genetiği ve genom haritalama çalışmalarında verimli bir şekilde kullanılmaktadır (Rafalski ve Tingey 1993, Burr 1994, Williams 1990, Welsh ve McClelland 1990, Chaparro ve ark. 1994, Parker ve ark. 1998, Skoula ve ark. 1999, Vazquez ve ark. 1999, Yıldırım ve Kandemir 2001, Temizkan ve Arda 2004). Genetik markörleri tanımlamada, gen kaynaklarının tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında, genetik uzaklığı belirlemede (Williams ve St. Clair 1993) ve genetik haritalama için (Kazan ve ark. 1993) kullanılabilirliğini araştırmacılar bildirmişlerdir.

Son yıllarda bitkilerle ilgili populasyon genetiği çalışmaları oldukça yoğunlaşmıştır..

Vazquez ve ark. (1999), *Sideritis pusilla* (Lamiaceae)'nin 15 populasyonunda RAPD markırı ile toplam genetik çeşitliliğin %68.8 olduğunu tespit etmişlerdir.

Tansley ve Brown (2000), tehlikedeki *Leucardendron elimense* (Proteaceae)'nin üç alt türü arasında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde RAPD markırını kullanılmışlar ve çeşitliliğin yüksek seviyede olduğu bulmuşlardır.

Oiki ve ark. (2001), endemik *Campanula microdonta* (Campanulaceae) populasyonları arasında RAPD varyasyonlarını araştırmışlar ve yüksek oranda RAPD mutasyonu bulmuşlardır.

Li ve ark. (2002), *Delphinium spp.*'nin üç türü arasındaki 22 veri arasında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde RAPD markırı kullanmışlar ve genetik akrabalığın 0.65-0.55 arasında olduğunu bulmuşlardır.

Mattner ve ark. (2002), Batı Avusturalya'da nadir endemik bir bitki olan *Hemigenia exilis* (Lamiaceae)'in 12 populasyonunda RAPD markırı kullanarak populasyonlar arasında genetik çeşitliliği 0.197-0.409 olarak bulmuşlardır.

Qiaoming ve ark. (2002), Güney Batı Çin'de tehlikedeki *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae)'in düşük seviyedeki genetik çeşitliliğini RAPD primeri ile belirlemişlerdir.

Madan ve ark. (2002), Negev çölündeki üç *Acacia raddiana* populasyonunda RAPD markırı kullanmışlar, yüksek farklılık ve kaybın populasyonların genetik çeşitliliği ve devamı için önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Loeffler ve Morden (2003), Havai adalarında endemik bir tür olan *Touchardia latifolia* (Urticaceae)'nin yedi populasyonunda RAPD markırı kullanılarak genetik çeşitliliğin düşük olduğunu bulmuşlar ve bunun genetik sürüklenmeden kaynaklandığını düşünmüşlerdir.

Besse ve ark. (2003), Mauritius adasında tehlikedeki sekiz endemik *Psiadia* türü arasında moleküler genetik akrabalıklarını belirlemiş, endemik olan bu türlerde RAPD analiz tekniği kullanmışlardır.

Zahreddine ve ark. (2004), Yüksek tehdit altında bulunan *Panacratium maritimum* (Amaryllidaceae)'un korunması için populasyonun dinamik ve moleküler

analizlerini yapmışlardır. RAPD markırı ile yüksek genetik çeşitlilik tespit etmişler ve IUCN kategorisine göre koruma stratejilerini belirlemişlerdir.

Babaoğlu ve ark. (2004), bazı *Alyssum* L. (Brassicaceae) türlerinin RAPD markırı ile inceleyerek tür içi polimorfizmin varlığını belirlemişlerdir.

Vilatersana ve ark. (2005), *Carthamus* (Asteraceae)'un seksiyonel sınıflandırmasında ortaya çıkan problemleri, moleküler yöntemlerden RAPD'i kullanarak çözmeye çalışmışlar ve yüksek taksonomik seviyelerde kullanılabilir olarak bulmuşlardır.

Sreekumar ve Renuka (2006), *Calamus thwaitesii* BECC. (Arecaceae)'de genetik çeşitliliğin RAPD markırları ile %85 olduğunu belirlemişlerdir.

Doğan (2006), ceviz genotipleri arasında genetik çeşitliliği saptamada ISSR ve RAPD tekniklerini kullanmıştır.

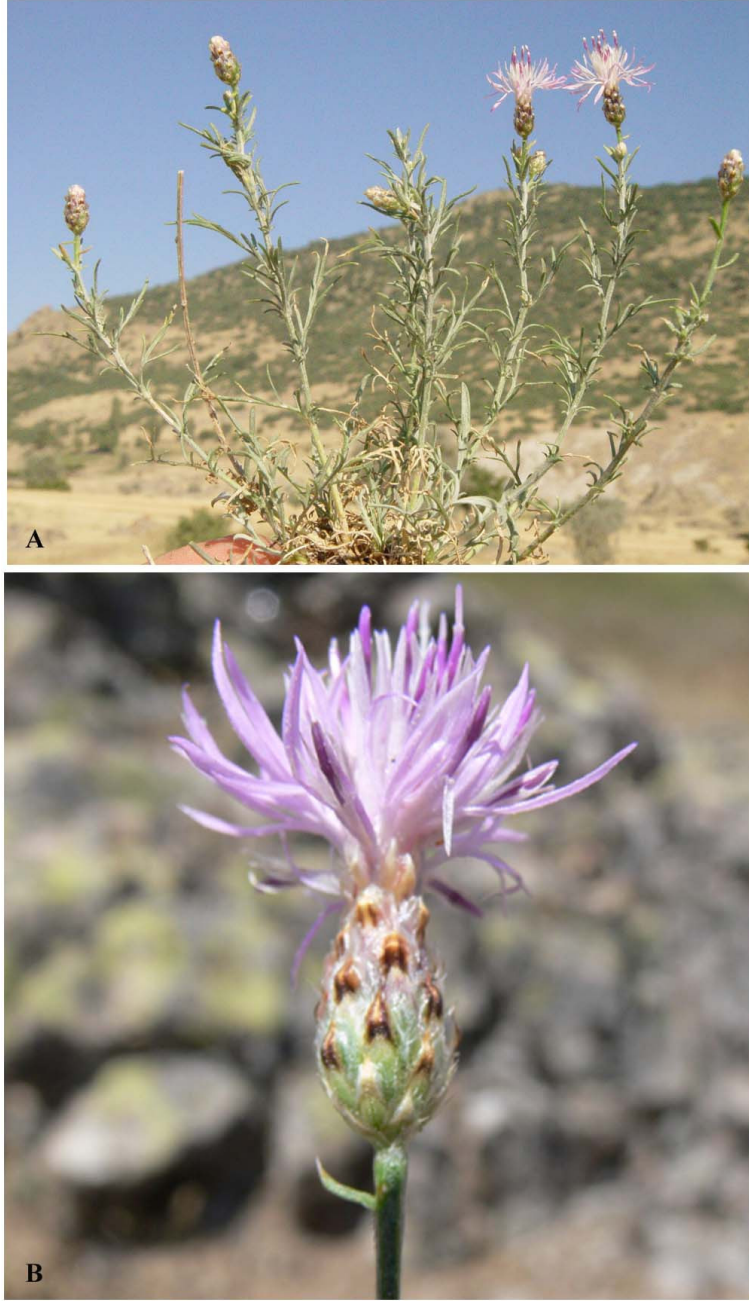
Geleta ve ark. (2007), Ethopya'da bulunan *Guizotia* (Asteraceae)'da AFLP ve RAPD markırları kullanarak genetik çeşitliliği belirlemeye çalışmışlardır. Varyasyonu AFLP markırı ile 0.32-0.37 arasında, RAPD ile 0.22-0.28 arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Saghir ve ark. (2007), *Hordeum spontaneum* populasyonlarında moleküler çeşitliliği belirlemek için AFLP ve RAPD markırları kullanmışlar, populasyonlar arasında genetik çeşitliliğin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

2.1. *Centaurea lycaonica* Boiss.& Heldr.

Centaurea lycaonica türü ilk kez 1845 yılının Mayıs ayında Konya ili Beyşehir ilçesi yakınlarından Heldreich tarafından toplanıldıktan sonra günümüze kadar tekrar toplanması mümkün olmamıştır. Birkaç yıl önce bu tür tip lokalitesinden farklı bir lokaliteden, Konya Seydişehir karayolu İnlıce kasabası yakınlarından Doç. Dr. Ahmet Duran tarafından toplanmış ve Dr. Tuna Uysal tarafından bu türün *Centaurea lycaonica* olduğu tayin edilmiştir. Böylece bu lokal endemik tür 1.5 asır sonra tekrar bilim dünyasına kazandırılmıştır (Uysal ve ark. 2008). 2008 yılı Temmuz ayında Beyşehir yolunda yapılan bir arazi çalışmasında bu tür tip lokalitesinden de toplanmıştır.

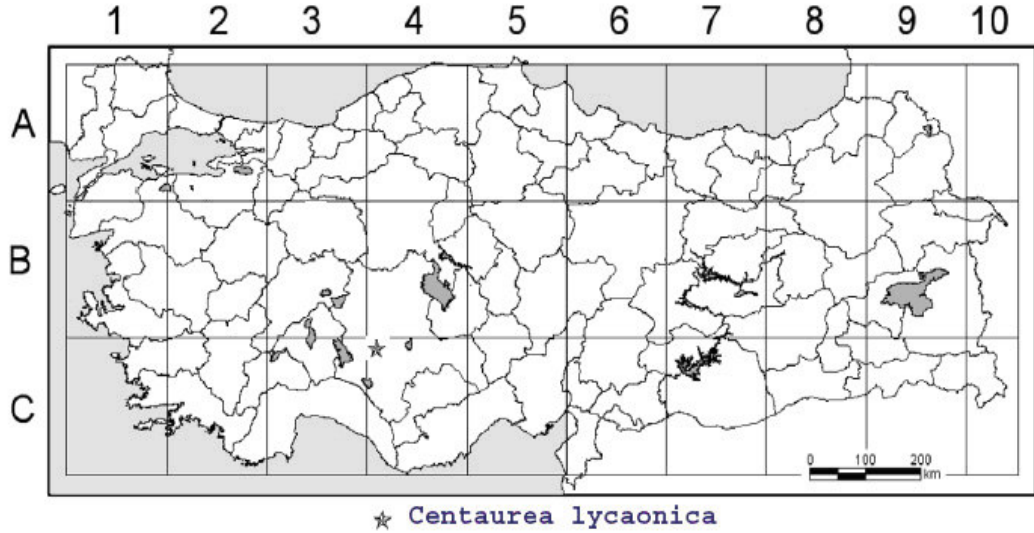
Bitki çok yıllık, dik veya yükselici, seyrek flokkoz tüylü, 20-35 cm boyundadır. Taban yaprakları seyrek araknoid tüylü, 7-8 x 1.5-3 cm, segmentler ayanın yarısının 2/3' sine kadar derin, 3-5 lateral segmentli, segmentler şeritsi, 10-15 x 1-1.5 mm, gövde yaprakları 4.5- 0.9x 1.5x 0.2 mm, taban yapraklarına benzer, kapitulaya doğru kademeli bir biçimde pinnatifid'ten basit'e indirgenmiştir. İnvolutrum silindirik, 11-13.5 x 5-8 mm, hafifçe tüylü. İnvolutrum brakteleri; en iç 11-13 mm, orta 8-9 mm, genellikle morumsu, dış 2.5-6 mm, dıştan içe doğru oblong'tan linear lanseolata değişir, belirgin bir biçimde boyuna 4-6 paralel çizgilidir. Ek uzantılar (apendaj); dairemsi, büyük, involukrum braktelerinin taban kısmını örter, aşağı doğru hafifçe sarı, darca koyu kahverengi merkezli, kenarları saçaklı lacerat, uçtaki dikencik oldukça indirgenmiş veya yoktur. Dış çiçekler verimsiz, ısınsal, gül pembe; içtekiler verimli, erdişi (hermafrodit), küçük, beyaz veya beyazımsı pembe; anter genellikle pembe, verimli erdişi çiçekten daha uzundur. Aken linear-lanseolat, 3.5-4 x 1-1.5 mm, glabroz, siyahımsı kahverengi ve belirgin boyuna çizgili, pappus pürüzlü (scabrous), iki serili, dış halka 3-3.5 mm, iç halka 0.2-0.5 mm.



Şekil 2.1, A. *Centaurea lycaonica*'nın genel görünümü, B. *Centaurea lycaonica*'nın çiçek yapısı

Centaurea lycaonica lokal endemik bir tür olup, İran-Turan elementidir. Bu tür *Phalolepis* seksiyonu içerisinde özellikle involukrum brakte ve apendajları göz önüne alınacak olursa; *C. lycia* ve *C. luschaniana* türleriyle benzerlik gösterir. Yaprak özellikleri, gövde dallanması ve habitat açısından ele alınacak olursa *C. amaena* türü ile oldukça benzerlik gösterir. Çiçeklenme Haziran-Temmuz aylarındadır. Kayalıklar üzerinde ve açıklıklarında 1550–1580 m, yüksekliklerde yetişir. Kromozom sayısı $2n = 18$ (Uysal ve ark. 2008).

Type: [Turkey C3/4 Konya] in aridis Lycaoniae inter Beychehr(Beyşehir) et Koniah (Konya), 9.v.1845, *Heldreich* (holo. G!)



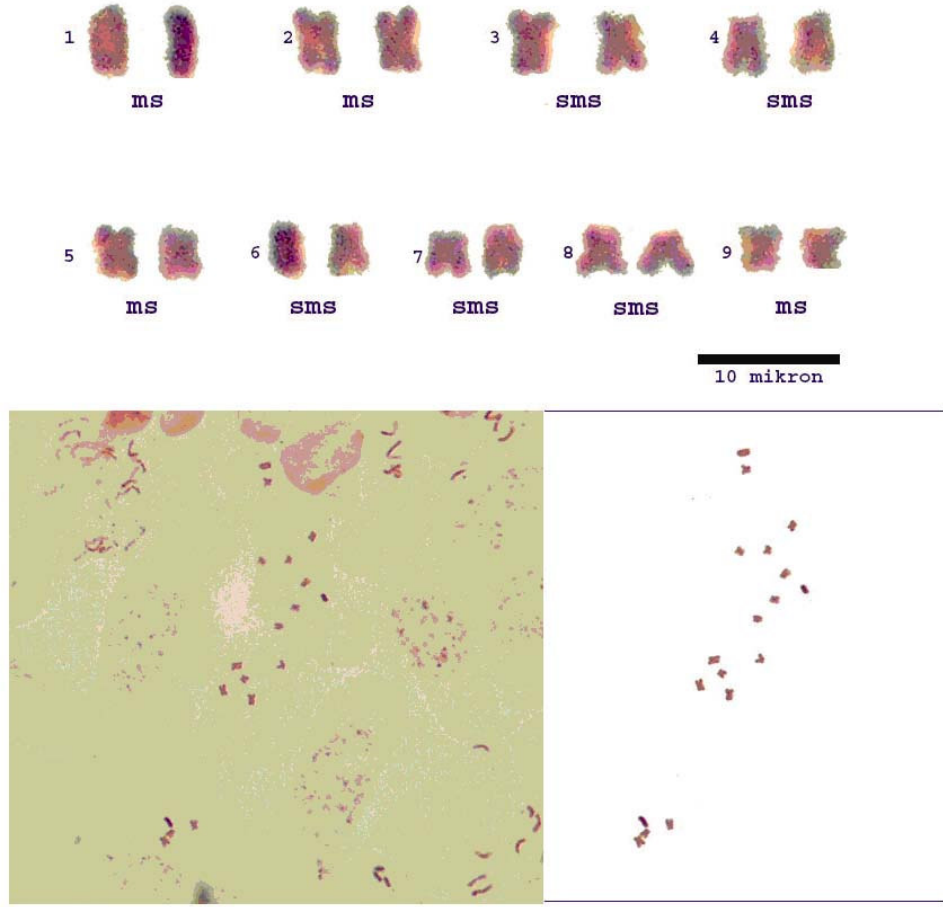
Şekil 2.2, *Centaurea lycaonica* türünün Ülkemizde dağılımı

C4 Konya: Konya-Seydişehir karayolu, İnlice köyü civarı, kayalık yamaçlar, 1580 m, 28. vi. 2006, N 37° 45' 02", E 32° 04' 29", *O. Tugay 4146 T. Uysal* (KON)(Şekil 2.2)

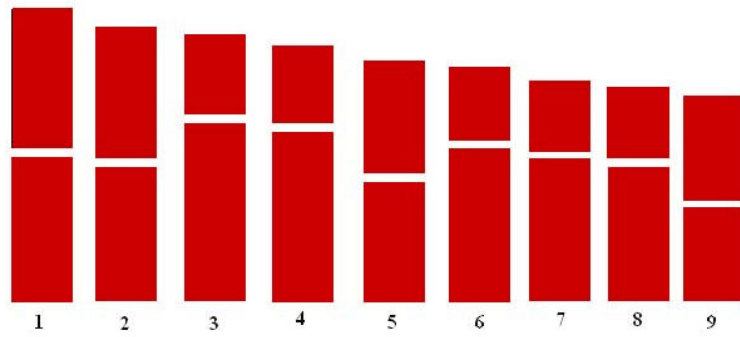
Bu türün Türkiye florasına göre modifiye edilmiş teşhis anahtarındaki yeri aşağıdaki gibidir (Uysal ve ark. 2008):

1. Ek yapılar (Appendage) uçta 0.5 mm' yi geçen belirgin bir mukrolu (spinül)
1. Ek yapılar (Appendage) uçta mukrosuz veya mukrolar çok az belirgin (0.5 mm den küçük)
 5. Ek yapılar (Appendage) küçük, involukrum braktelerinin (phyllari) taban kısmını örtmez
 5. Ek yapılar (Appendage) büyük, involukrum braktelerinin (phyllari) taban kısmını örter
 7. Bitki tüysüz veya seyrek tüylü, yaprak segmentleri şeritsi
 8. İnvolutrum silindirik, aken tüysüz*C. lycaonica*
 8. İnvolutrum yumurtamsı, aken tüylü*C. amaena*
 7. Bitki sık keçemsi tüylü, yaprak segmentleri mızraksı
 9. İnvolutrum 10-12 mm eninde; taban yapraklar veya uç segmentleri 10-30 mm eninde *C. lycia*
 9. İnvolutrum 5-6 mm eninde; taban yaprakların uç segmentleri 3-10 mm*C. luschaniana*

Centaurea lycaonica türünün kromozom sayısı $2n= 18$ olarak tespit edilmiş olup bu sayım daha önce seksiyonun bazı türlerinde rapor edilen hesaplamalarla uyum göstermektedir (Phitos ve Damboldt 1976; Tutin ve ark. 1976; Garcia-Jacas ve ark. 1997, 1998b; Garcia-Jacas ve ark. 1998a; Romenchenko ve ark. 2004). Diploid kromozoma sahip olan bu türün kromozomları morfolojik olarak metasentrik (4 çift) ve submetasentrik (5 çift) kromozomlardan oluşmaktadır. Kromozomların büyüklükleri 3-6 mikron arasında değişmekte olup detaylı morfolojileri (Karyogram ve idiogramları) aşağıda Şekil 2.3 ve 2.4, Tablo 2.1'de verilmiştir (Uysal ve ark. 2008).



Şekil 2.3, *Centaurea lycaonica* türüne ait karyogram (Uysal ve ark. 2008)



Şekil 2.4, *Centaurea lycaonica* türüne ait idiogram (Uysal ve ark. 2008)

Tablo 2.1, *Centaurea lycaonica*'nın kromozom ölçümleri (Uysal ve ark. 2008)

Kromozom No ▼	Total uzunluk (C)	Kısakol uzunluğu (S)	Uzunkol uzunluğu (L)	Kısakol/uzunkol Oranı(R=S/L)	Sentromerik İndeks I=(s/c).100	Sentromer pozisyonu
1	5.04	2.52	2.52	1	50	Metasentrik
2	4.76	2.38	2.38	1	50	Metasentrik
3	4.61	1.63	2.98	0.55	35.4	Submetasentrik
4	4.13	1.47	2.66	0.55	35.6	Submetasentrik
5	3.54	1.77	1.77	1	50	Metasentrik
6	3.48	1.63	1.85	0.88	46.8	Submetasentrik
7	3.21	1.26	1.95	0.65	39,25	Submetasentrik
8	3.16	1.47	1.69	0.87	46.5	Submetasentrik
9	3.10	1.55	1.55	1	50	Metasentrik

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Araştırma materyali olan *Centaurea lycaonica* Boiss.& Heldr. türü 2007 Temmuz ayında bilinen tek bir lokaliteden dikkatlice taranarak toplanmıştır.

Genetik çeşitlilik türlerin yerel çeşitlerinin, yabani akrabalarının ve geçit formlarının birlikte bulunduğu yerlerde yoğunlaşmış olduğu bilinmektedir. Türler kendi içlerinde milyonlarca genotip içerir. Toplanan örnekler toplam varyasyonun çok küçük bir modelidir. Bu nedenle, bitki genetik kaynaklarının korunmasında en geniş varyasyonu temsil edecek örneklerin toplanması önemlidir. Bunun için popülasyonu temsilen rasgele örnekleme ile alınan yaklaşık 30 birey dikkatlice belirlenerek moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere taze ve temiz yaprak örnekleri silika jel içerisine alınmıştır.

Tek bir bölgeden dört farklı koordinat alınmış olarak örneklerin lokaliteleri şöyledir; Konya-Seydişehir karayolu 50. km, İnce Köyü civarı, Kayalık Yamaçlar, 37° 44.535 N, 32° 04.015 E, 1580m (Batı); Konya-Seydişehir karayolu 50. km, İnce Köyü civarı, Kayalık Yamaçlar, 37° 45.097 N, 32° 05.687 E, 1565m (Doğu); Konya-Seydişehir karayolu 50. km, İnce Köyü civarı, Kayalık Yamaçlar, 37° 44.486 N, 32° 04.208 E, 1680m (Güney); Konya-Seydişehir karayolu 50. km, İnce Köyü civarı, Kayalık Yamaçlar, 37° 45.293 N, 32° 04.750 E, 1595m (Kuzey).

Popülasyona ait 30 bireyin toplanma ve izolasyon tarihleri Tablo 3.1'deki gibidir. Materyaller toplanır toplanmaz silika jel içerisine alınmış ve DNA izolasyonlarına kadar Selçuk Üniversitesi Moleküler Biyoloji laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1, Türlerle verilen örnek numaraları, toplanma ve izolasyon tarihleri

Örnek No	Tür İsmi	Toplanma Tarihi	DNA İzolasyon Tarihi
C1	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C2	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C3	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C4	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C5	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C6	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C7	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C8	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C9	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C10	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C11	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C12	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C13	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	25/07/2007
C14	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C15	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C16	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C17	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C18	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C19	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C20	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C21	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C22	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C23	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C24	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C25	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C26	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C27	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C28	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C29	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007
C30	<i>C. lycaonica</i> Boiss. & Heldr.	04/07/07	31/07/2007

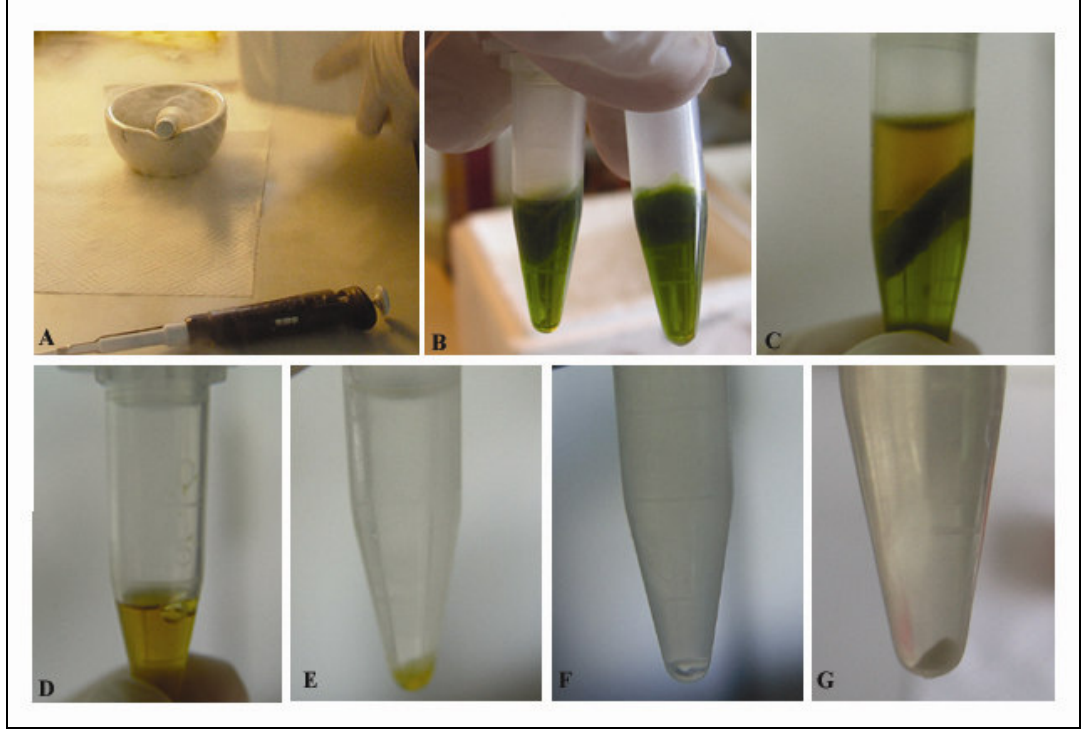
3. 2. Sterilizasyon

Çalışmada kullanılacak tüm çözeltiler, tamponlar, kullanılan tüpler ve pipet uçları 121°C de 20 dakika otoklavda sterilize edilerek kullanılmış ve sterilizasyonun gerçekleştiğini ve kontaminasyonun olmadığını kontrol amaçlı deneylerin her aşamasında kontrol grubu eklenmiştir.

3.3. Metot

3.3.1. DNA İzolasyonu

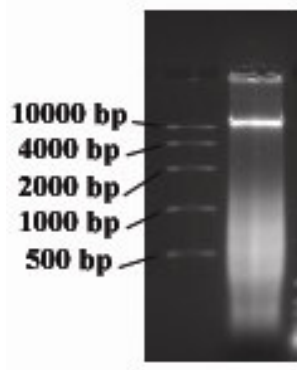
DNA izolasyonu Soltis tarafından modifiye edilen Doyle'nin metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Soltis ve ark. 1991). Bitki materyalinden genomik DNA'nın elde edilmesi için toplanan bitki örneklerinin her birinin kuru yapraklarından 0,01 gr alınarak sıvı azot ile porselen havanda ezilerek toz haline getirilmiş, eppendorf tüpüne konulmuş daha sonra 65 °C'da ısıtılmış DNA ekstraksiyon tamponundan [2 X CTAB] 500µ ilave edilerek aralıklarla karıştırılarak 60°C de 4 saat inkübe edilmiş ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µl kloroform ilave edilmiş, 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüjden sonra sıvı kısım yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine tekrar 500 µl kloroform ilave edilmiştir. 5 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilip açık krem renkli sıvı kısım tekrar yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 32 µl amonyum asetat, 233.3 µl izopropanol eklenip 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılıp eppendorf tüpünün dibindeki pellete 1 ml % 70'lik etanol eklenmiştir. 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edilip sıvı kısım tekrar atılmış pellet kısmının kuruması için eppendorf tüpü 30 dakika vakumda bekletilmiştir. Bunun sonunda eppendorf tüpüne 50 µl 1x TE (Tris-EDTA) ilave edilmiş ve 15 dakika 65 °C'de su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra % 0,7'lik agaroz jele yüklenerek bantlar gözlenmiştir ve PCR amplifikasyonlarına kadar 20°C'da saklanmıştır.



Şekil 3.1, A. Örneklerin sıvı azotla havanda ezilmesi, B. Örneklerle ekstraksiyon tamponu uygulanmasından sonra, C. ve D. Ekstraksiyon tamponu uzaklaştırılmadan önce ve sonrası, E. Amonyum asetat ve izopropanol eklenmesi, F. Ethanol ile yıkama, G. DNA'nın TE'de çözülmeden önceki hali

3.3.2. DNA Konsantrasyonunun Tayini

İzolasyonların gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemek için 3,5 µl EtBr ile hazırlanan % 0.7'lik agaroz jele 5 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme solüsyonundan toplam 6 µl yükleyerek 120V 70mA'de 25 dakika yürütülmüş, U.V.'de görüntülenmiştir. Tek bir bireye ait resim belirli büyüklüğe sahip markırla karşılaştırılarak Şekil 3.2'de verilmiştir. Buna göre elde ettiğimiz DNA'lar yaklaşık 10000 bp civarında büyüklüğe sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 3.2, İzole edilen DNA'nın ve markırın % 0.7'lik agaroz jelde görüntüsü

Buna rağmen sağlıklı bir PCR gerçekleşmesi için DNA konsantrasyonları ND 1000 ile spektral ölçümleri yapılmış olup veriler Tablo 3.2'de görülmektedir.

Spektral sonuçlara göre her bir örnek için 30 ng olacak şekilde 100 µl hacme eklenecek olan DNA miktarı tespit edilmiştir. DNA saflığı için ise $A_{260}/A_{280} = 1,8$ formülü kullanılarak bulunan değere yakın olanlar saf DNA olarak düşünülmüş, çok büyük ve çok küçük değerler ise saf olmayan DNA elde edildiğine karar verilip tekrar izolasyonu yapılmıştır.

Tablo 3.2, Örneklerin spektral sonuçları

Örnek No	ABS	A260λ	A280λ	A260/280λ	A260/230λ	[C] ng/uL
C1	1,277	1,554	0,517	3,01	1,22	77,7
C2	2,452	4,333	2,407	1,8	1,77	216,6
C3	24,131	22,322	11,154	2	0,93	1116,1
C4	15,165	14,017	7,460	1,88	0,92	700,8
C5	15,015	13,392	6,926	1,93	89	669,6
C6	11,424	7,735	3,833	2,02	0,68	386,7
C7	11,801	8,522	4,149	2,05	0,72	426,1
C8	8,650	9,813	5,482	1,79	1,13	490,6
C9	5,144	5,452	2,000	1,94	1,06	722,6
C10	10,610	5,608	2,563	2,19	0,53	280,4
C11	12,311	9,078	4,548	2	0,74	453,9
C12	16,715	22,781	12,156	1,87	1,36	1139
C13	11,751	9,865	4,880	2,02	0,84	493,2
C14	20,139	23,228	12,878	1,8	1,15	1161,4
C15	23,379	20,480	12,130	1,69	0,88	1024
C16	19,001	21,064	11,627	1,81	1,11	1053,2
C17	7,447	7,249	3,843	1,89	0,97	362,4
C18	9,958	7,886	3,902	2,02	0,79	394,3
C19	11,855	9,330	4,550	2,05	0,79	466,5
C20	11,993	9,868	5,109	1,93	0,82	493,4
C21	12,489	10,863	5,545	1,96	0,87	543,1
C22	11,274	11,695	5,963	1,96	1,44	584,8
C23	9,254	6,110	2,953	2,04	0,66	305,5
C24	12,475	10,492	5,331	1,97	0,84	524,6
C25	11,688	10,638	5,457	1,95	0,91	531,9
C26	11,014	9,504	4,814	1,97	0,86	475,2
C27	11,847	10,856	5,690	1,91	0,92	542,8
C28	13,759	10,972	5,950	1,84	0,8	548,6
C29	12,139	9,990	4,974	2,01	0,82	499,5
C30	12,199	9,586	4,840	1,98	0,79	479,3

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Öncelikli olarak genetik çeşitliliğin belirlenmesinde ve bir popülasyonda polimorfizmin seçilmesinde kullanılacak en uygun yöntem araştırılmış ve araştırmalar sonucunda Polimeraz Zincir Reaksiyonu prensibine bağlı çalışan moleküler belirleyicilerden RAPD tekniğinin kullanılmasına karar verilmiştir. Kullanılacak RAPD primeri için birçok makale taranmış ve OP primerlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışılacak materyal ve yöntem göz önüne alındığında primerlerden GC oranları %60–70 oranında ve 10bp uzunluğunda olanlar arasından seçim gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerlere ilişkin bilgiler Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3, Kullanılan Primerler ve özellikleri

Kullanılan Primerler	Baz Dizisi	Tm	Uygulanan Tm	Bp	GC içeriği (%)
OPB07	5’-GGTGACGCAG-3’	34	31	10	70
OPB08	5’-GTCCACACGG-3’	34	30	10	70
OPB18	5’-CCACAGCAGT-3’	32	30	10	60
OPB19	5’-ACCCCCGAAG-3’	34	30	10	70
OPG02	5’-GGCACTGAGG-3’	34	32	10	70
OPG17	5’-ACGACCGACA-3’	32	30	10	60

3.3.4. Optimizasyon

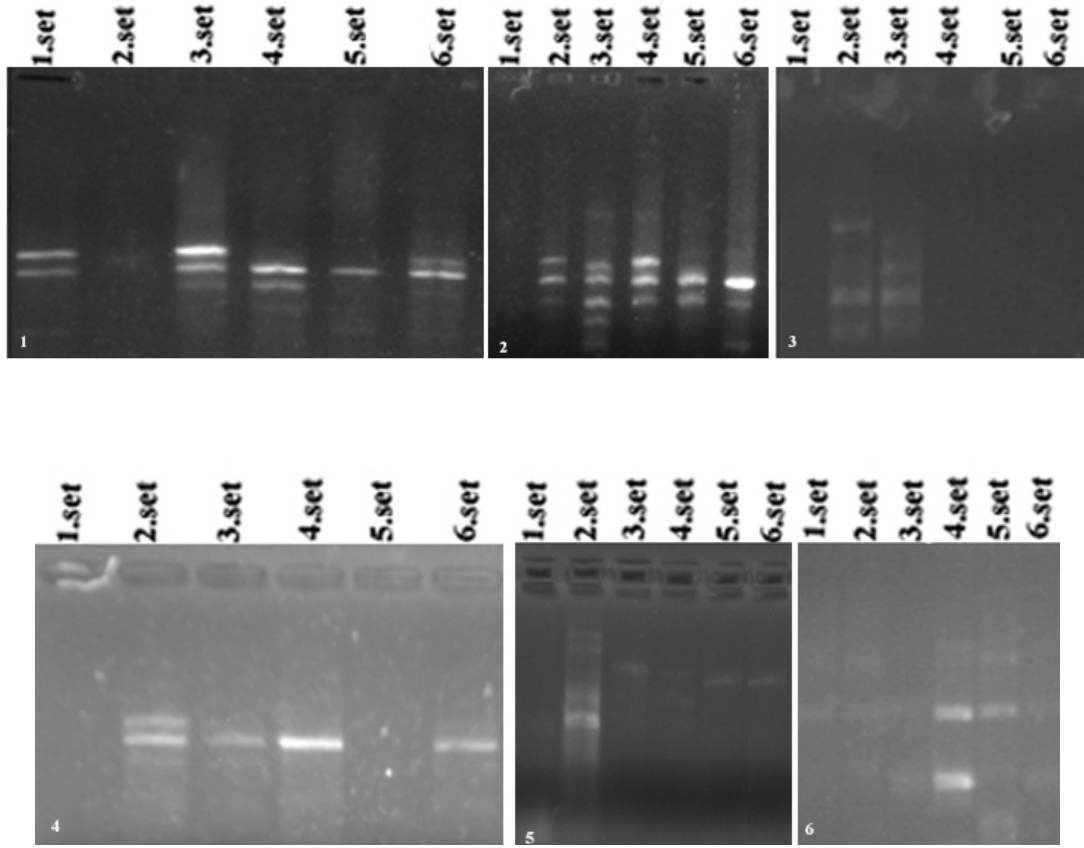
Öncelikli olarak seçilen primerlerden her biri için MgCl₂, Primer ve Taq polimeraz enzim miktarlarının farklı konsantrasyonlarında mixler hazırlanıp denenmiştir. Denemelerde her mix setine Tm sıcaklığı için gradient de yapılmıştır. Ayrıca uygulamalar esnasında daha temiz bir PCR ürünü elde etmek için bir çok makalede ismi geçen %10’luk BSA ilave edilerek de çalışılmış fakat BSA bizim

çalışmamızda etkisi olmamıştır. Uygulanan optimizasyon mixleri Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4, Optimizasyon Mixleri ve içerikleri

Karışım (µl)	1.set	2.set	3.set	4.set	5.set	6.set
Su	16	16	17	15.75	15.5	15.75
dNTP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MgCl ₂	2.5	2	1.5	2.5	2.5	2.5
Buffer	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Primer	0.5	0.75	0.5	0.75	1	0.75
Taq polimeraz	0.5	0.75	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Toplam	25	25	25	25	25	25

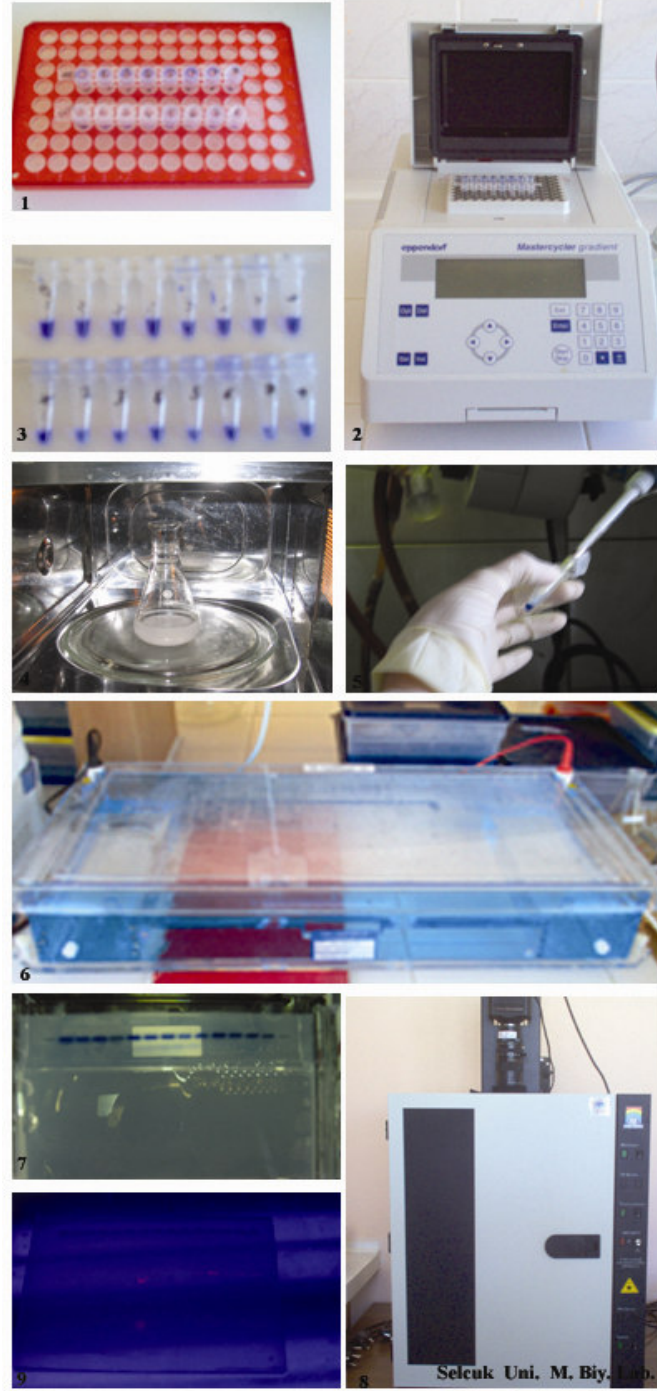
Her bir uygulama 95°C’de 1dakika, 95°C’de 30 saniye, gradient ± 5 (29.1°C, 29.6°C, 30.5°C, 31.6°C, 32.9°C, 34.2°C) olarak uygulanan Tm’lerde 1 dakika, 72°C’de 2 dakikadan oluşan döngü 44 kez tekrarlanmış, PCR ürünlerinin elektroforezi 3.5 µl EtBr ile hazırlanan %1.4’lük (w/v) agaroz jelde 5 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme solüsyonundan toplam 6 µl yükleyerek, TAE tamponu içinde, 120V 70mA’de 25 dakika yürütülmüş ve jeller UV ışığı altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir. Sonuçta elde edilen optimizasyonlar şekilde görülmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3, 1. OPB7, 2. OPB8, 3. OPB18, 4. OPG17, 5. OPB19, 6. OPG2 Primelerinin farklı mix setleri ve Tm'lerdeki optimizasyonları

3.3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu bütün örneklerle uygulanması

Yapılan optimizasyon doğrultusunda bant sayısı ve bantlardaki parlaklık dikkate alınarak en iyi ürünün elde edildiği Tm sıcaklıkları seçilmiştir. RAPD PCR'in gradient sonuçlarına göre uygulanan 6 farklı primer için 6 farklı setten en fazla bant oluşturan mix seti seçilip kalan bütün bireylere uygulanmıştır.

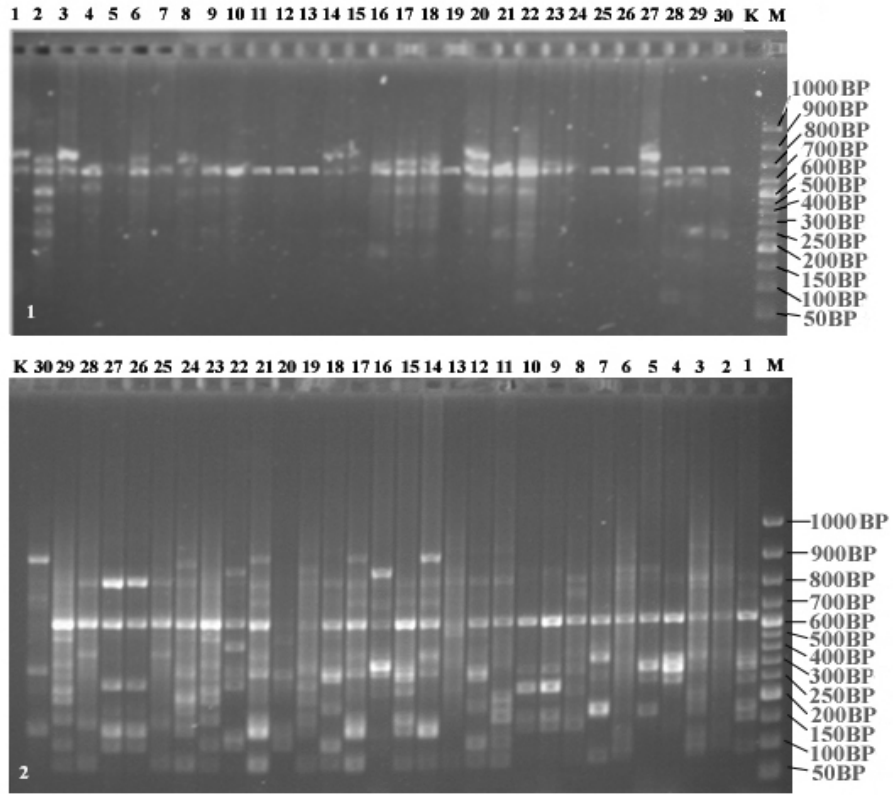


Şekil 3.4, 1. PCR materyali, 2. Örneklerin PCR'a yerleştirilmesi 3. Elektrofrez için örneklerin yükleme boyası (Loading Dye) ile muamelesi, 4. Agaroz jelin hazırlanması, 5. Örnekler jele yüklenirken, 6. Örneklerin elektrofrezde yürütülmesi, 7. Örneklerin jeldeki görüntüleri, 8. Jelin görüntüleneceği kabin, 9. Jelin UV'deki görüntüsü

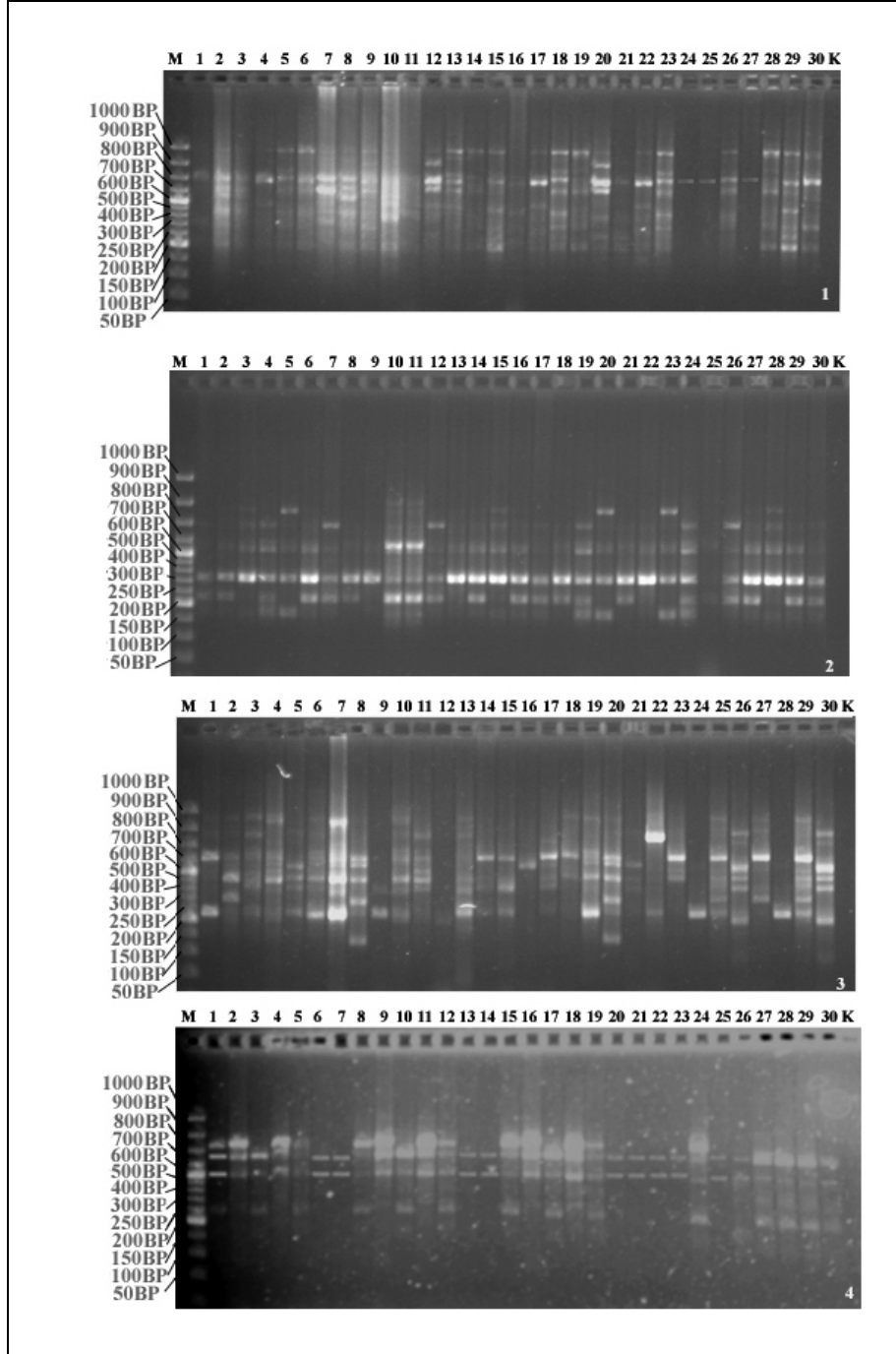
Tablo 3.5, PCR’da kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları

PCR Çoğaltma Öğeleri	Kullanılan Konsantrasyon
DNA	30 ng
dNTP	10mM
MgCl ₂	2.5m
10 X Buffer	1 X
Primer	4 µM
Taq polimeraz	0.025 U
Su	Kalan hacim
Toplam hacim	25 µl

Maksi yatay elektroforezde PCR ürünlerinin elektroforezi 10 µl EtBr ile hazırlanan %1.4 (w/v) agaroz jele 5 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme solüsyonundan toplam 6 µl yükleyerek, TAE tamponu içinde, 250V 150mA’de 1 saat yürütülmüş ve jeller UV ışığı altında görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.5 ve 3.6).



Şekil 3.5, 1. RAPD PCR ile OPB8 primerinin örnekler üzerindeki jel Görüntüsü, 2. RAPD PCR ile OPG17 primerinin örnekler üzerindeki jel Görüntüsü



Şekil 3.6, 1. RAPD PCR ile OPB7 primerinin örnekler üzerindeki jel Görüntüsü, 2. RAPD PCR ile OPB18 primerinin örnekler üzerindeki jel Görüntüsü, 3. RAPD PCR ile OPG2 primerinin örnekler üzerindeki jel Görüntüsü, 4. RAPD PCR ile OPB19 primerinin örnekler üzerindeki jel Görüntüsü

3.4. DNA Bantlarının Skorlanması

Bu çalışmada kullanılan 30 farklı bireyin genotipinden elde edilen DNA bantları genotipler arasında karşılaştırıldı ve aynı hizada bulunanlar benzer bölge olarak düşünülerek 1, farklı hizalarda bulunanlar 0 olarak kodlandı (Iqbal ve ark. 1997, Zhang ve ark. 2005, Gutierrez ve ark. 2002, Abdalla ve ark. 2001, Senior ve ark. 1998, Rahman ve ark. 2002, Rana ve Bhat 2005, Tabar ve ark. 2004). Elde edilen bütün izler bağımsız olarak ikili değişken şeklinde (1 ve 0) değerlendirildi.

3.5. Veri Analizi

Jeller üzerindeki bantların yorumlanmasıyla oluşturulan matrixler, UPGMA analizi ve NTSYSpc 2.0 (Rohlf 1997) ile organize edilmiştir. Burada ölçüt; bir genotipteki herhangi bir bölgedeki bandın, soyundan geldiği başka bir geneotipteki ve aynı bölgedeki bant ile benzeme ihtimalinin tahmin edilmesidir. DNA markörleri, çalışmada kullanılan RAPD markörü gibi, DNA sekansları arasındaki farklılığı direkt olarak ölçebilmektedir. DNA temelli genetik benzerlik; allellerin o durumdaki birbirlerine benzerlik oranına dayanarak genotipler arasındaki ilişkiyi belirlemektedir (Van Becelaere ve ark. 2005).

Populasyonun sınırları içinde genetik farklılığı tahmin etmek için kullanılan farklı analizler vardır. Çalışılan yöntemler için bilgi verici karakterlerin fazla olması istenir. Çünkü bilgi verici karakterin sayısı ne kadar fazla olursa populasyondaki ya da gruptaki bitkiler hızlıca evrimleşmiş ve böylece varyasyon derecesi o denli fazla olduğu anlaşılır. Bilgi verici özelliği olmayan karakterler homoplasiyi doğurur. Çalışmalarda bilgi verici karakter ayrı ayrı ele alındığında yeterli olmadığı düşünüldüğünde verilerin birleştirilmesi daha sağlıklı sonuçların ortaya çıkmasını sağlar.

Çalışmamızda tek populasyondan bilinen 30 birey olduğu için ilişki kat sayısı (coefficient relationship)= iki birey tarafında ortak genlerin oranı NTSYSpc ile yapılmıştır. Elde edilen veriler ayrı ayrı ve birleştirilerek coefficient (katsayı)

değerleri cluster analizi için “Unwieghted Pair Grup of Aritmetic Means” (UPGMA) analizi NTSYSpC programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genotipler yine aynı prensiple ayrı ayrı ve birleştirilerek filogenetik ağaç üzerinde gruplandırılmıştır.

4. DENEY SONUÇLARI

4.1. Genotipler Arasındaki Genetik Farklılıklarının Saptanması

Birçok makaleden materyale uygun olarak seçilen RAPD primerlerinin izlerinin jellerdeki görüntüleri sonucunda, ürünler var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve elde edilen veriler NTSYSpc 2.1 (Rohlf 2004) adlı bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. Her bir primerden elde edilen veriler ayrı ayrı değerlendirildiği gibi birlikte de değerlendirilmiştir. Genetik benzerlik indeksi Jaccard'a göre hesaplanmıştır. Soyağacının elde edilmesinde UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) yöntemi kullanılmıştır. Oluşan fragment aralığı, bant sayıları ve yüzdeleri Tablo 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1, Primerlerin sonuçlara göre bilgi verici tablosu

PRİMER	Oluşan Fragment Aralığı	Oluşan Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Monomorfizm oranı (%)	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm oranı (%)
OPG2	1000-100 bp	20	3	15	17	85
OPG17	950-75 bp	20	5	25	15	75
OPB7	1000-200 bp	13	7	54	6	46
OPB8	850-50 bp	8	2	25	6	75
OPB18	900-150 bp	10	4	40	6	60
OPB19	900-250 bp	13	2	15	11	85
Toplam		84	23	27	61	73

Toplam 6 primer, 30 farklı birey üzerinde uygulanarak toplam 84 adet bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 23'ü monomorfik (%27) ve 61'i polimorfiktir (%73). Bu primerlerin her biri en az 6 adet polimorfik bant oluşturmuştur.

Polimorfiz oranının hesaplanması şu şekilde yapılmıştır:

$$\text{Polimorfizm Oranı (\%)} = \frac{\text{Polimorfik Bant Sayısı}}{\text{Toplam Bant Sayısı}} \times 100$$

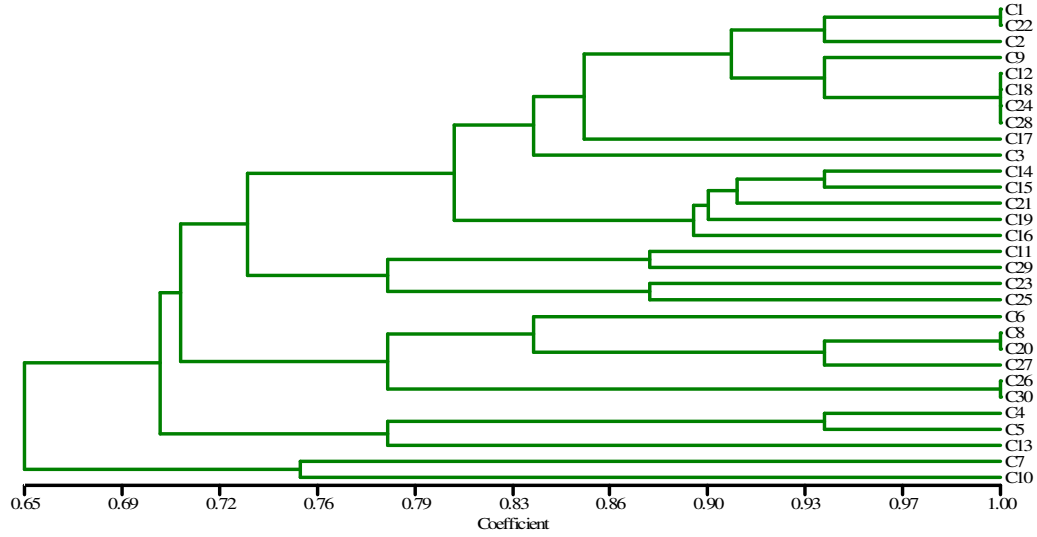
Kullanılan primerlerden elde edilen sonuçlara göre; OPG2 primerinden 20 bandın 17 tanesi (%85), OPB19 primerinde 13 banttan 11'i (%85) polimorfik olarak tespit edilmiş ve bu iki primer, bireyler arasında en fazla polimorfizm göstermiştir. OPG17 (20 banttan 15'i) ve OPB8 primerleri (8 banttan 6'sı) %75 civarında polimorfiktir. OPB18 primeri için ise 10 banttan 6'sı polimorfiktir. OPB7 primeri ise % 46'lık oranla en düşük polimorfizme sahip olan primerdir (13 banttan 6'sı).

Monomorfik olarak görülen bantlar OPB8 primeri için 800 ve 700 bp büyüklüğünde olduğu; OPG17 primeri için 850–300 bp arasında değiştiği; OPB7 primeri için 800–400 bp arasında olduğu, OPB18 primerinde 600–250 bp; OPG2 primerinde 700–500 bp ve OPB19 primeri için ise 700–600 bp arasında olduğu şekillerde görülmektedir. Ayrıca gözlenen bantlardaki benzerlikler dikkate alındığında OPB18 primeri ile yapılan analizlerde C10 ve C11 nolu bireylerin bantları arasında, C20 ve C23 nolu bireylerin bantları arasında büyük ölçüde benzerlik olduğu; OPG17 primerinde C26 nolu birey ve C27 nolu bireyin, C17 ve C21 nolu bireylerinin, C9 ve C10 nolu bireylerin bantlarının birbirlerine benzediği görülmektedir. OPG2 primerinde ise C27 ve C28 nolu bireyler arasında benzer bantlar gözlenirken, yine C10 ve C11 nolu örneklerin bant profillerinin birbirlerine benzemesi dikkat çekicidir.

RAPD primerlerinin kullanımında toplam en az 80 bandın skorlanması istenmekte ancak bu şekilde yeterli bilginin oluşacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada toplam 84 bandın oluştuğu dikkate alınırsa RAPD primerlerinin çalışma materyali olan *Centaurea lycaonica* populasyonundaki örnekler için oldukça bilgi verici olarak düşünülebilir.

4.2. Elde edilen Dendrogramların Değerlendirilmesi

4.2.1. OPG2 Primerinin Değerlendirilmesi



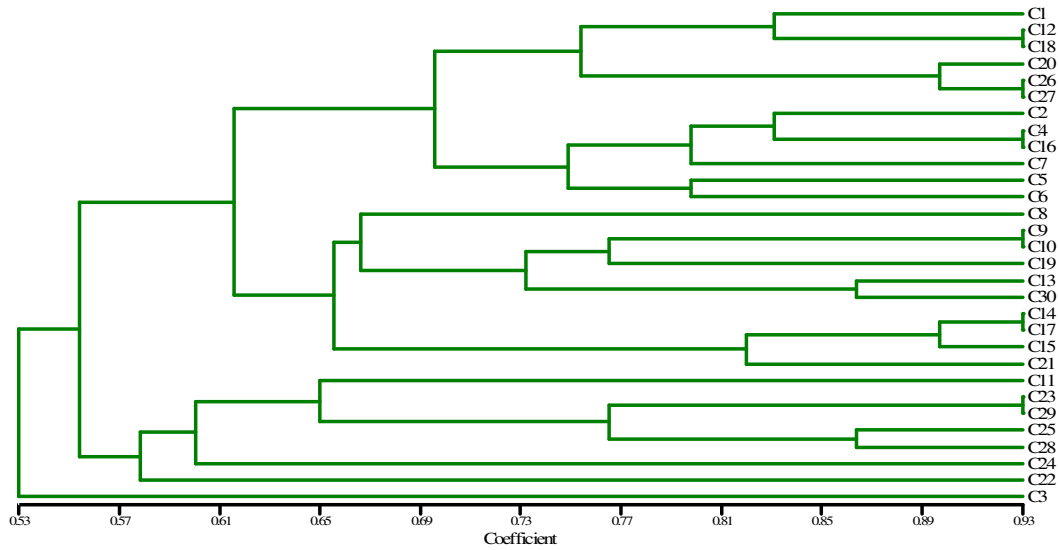
Şekil 4.1, OPG2 Primeri ile Elde Edilen Dendrogram

Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi OPG2 primeri ile temelde 0.65 oranında yakınlık gösteren iki ana grup oluştuğu görülmektedir. En dış kladı oluşturan C7 ve C10 nolu bireylerin (0.76 oranında birbirine benzemekte) diğer bireylerin oluşturduğu klad ile 0.70 oranında birbirlerine benzer olduğu görülmektedir.

C1, C22, C2, C9, C12, C18, C24, C28, C17, C3 nolu bireylerin yer aldığı grup 0.84 oranında birbirine yakındır. Bu gruba aralarında 0.9 benzerlik oranı bulunan C14, C15, C21, C19, C16 nolu bireyler 0.80 oranında benzemektedir. C11, C29, C23, C25 bireyler 0.78 oranında birbirlerine benzerken; C6, C8, C20, C27, C26, C30 bireyler ve C4, C5, C13 bireyler yine 0.78 oranında birbirlerine benzerlik göstermektedirler.

İki ana grubun dışında dendrogramda ilk klad içerisinde üç farklı grup bulunmaktadır. Bu gruplar içerisinde C1, C22; C12, C18, C24, C28; C8, C20; C26, C30 bireylerinde %100 bir benzerlik olduğu görülmektedir. Bu primer ile %100 benzer olan bireyler arasında genetik çeşitliliğin seçilimi mümkün olmamıştır.

4.2.2. OPG17 Primerinin Değerlendirilmesi



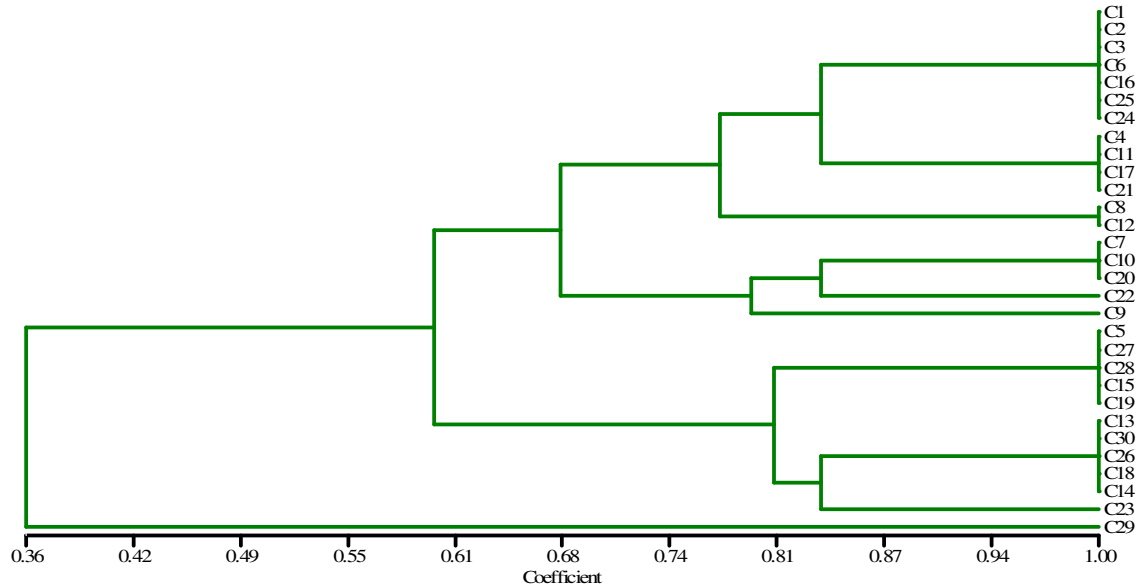
Şekil 4.2, OPG17 Primeri ile Elde Edilen Dendrogram

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi oluşan dendrogramdaki tüm bireyler arasındaki benzerlik minimum 0.53 olarak tespit edilmiştir. Burada asıl gözlenen iki ana grup olmasına rağmen C3 nolu birey bu grupların dışında kalmaktadır. Diğer iki grup 0.56 oranında birbirine benzer olarak görülür.

Aralarında 0.7 oranındaki benzerlikle C1, C12, C18, C20, C26, C27, C2, C4, C16, C7, C5, C6 nolu bireyleri, aralarında 0.66 oranındaki benzerlikle C8, C9, C10, C19, C13, C30, C14, C17, C15, C21 bireyelerine 0.62 oranında benzemektedir. Ayrıca C11, C23, C29, C25, C28, C24, C22 bireyleri diğer örnelelere 0.56 oranında benzemektedir.

Görülen iki ana klad içerisinde farklı oranlarda üç grup yer almaktadır. Bu gruplar içerisinde bulunan C12, C18; C26, C27; C4, C16; C9, C10; C14, C17; C23, C29 nolu bireyler arasında gözlenen %100 benzerlik oranı, bu primerin benzer olan bu bireyler için genetik çeşitlilik açısından değerlendirilebilecek hiçbir seçicilik teşkil etmediğini gösterir.

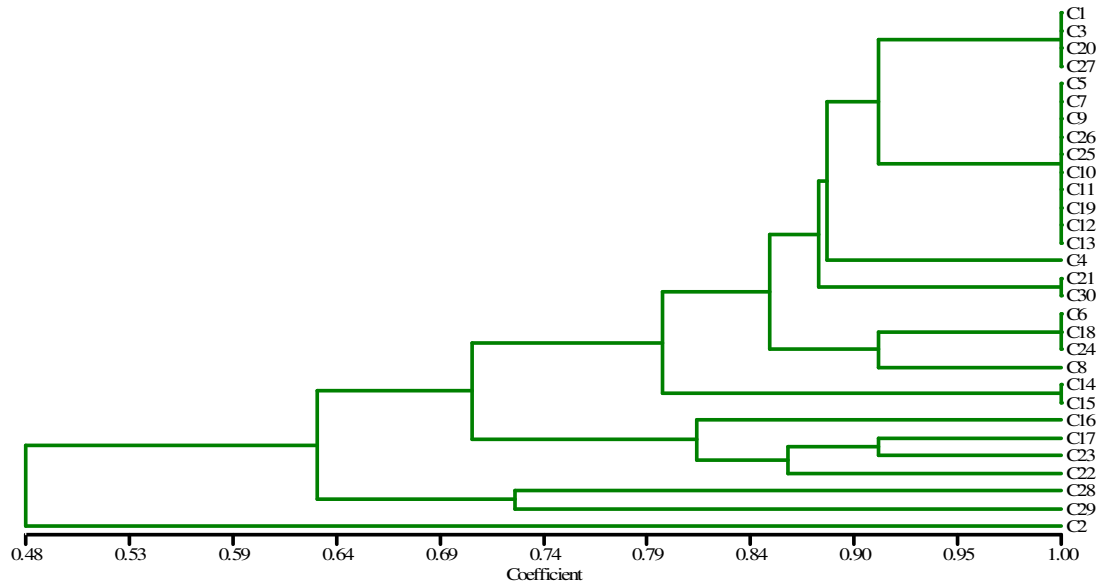
4.2.3. OPB7 Primerinin Değerlendirilmesi



Şekil 4.3, OPB7 Primeri ile Elde Edilen Dendrogram

Şekil 4.3’de de görüldüğü gibi OPB7 primeri ile elde edilen polimorfizm oranı diğer primerlerle kıyaslandığında bu oranının daha az olduğu görülmektedir (%46). Bütün bireyler 0.36 oranında benzerlik göstermesine rağmen C29 bireyi grupların en dışında bulunmaktadır. Gruplar arasında %100 benzerlikler haricinde en yakın oran 0.86 olarak görülmektedir. Ana grup olarak iki grubun varlığından sözü edilecek olursa bunlar 0.61 oranında benzerlik göstermektedir. Bunun haricinde iki ana grup kendi içinde farklı benzerlik oranları ile (0.68, 0.78, 0.8, 0.81) dört gruba ayrılır. Sonuç olarak bu populasyon içerisinde yer alan bireyler arasındaki genetik çeşitlilik OPB7 primerine göre oldukça düşük seviyede tespit edilmiştir.

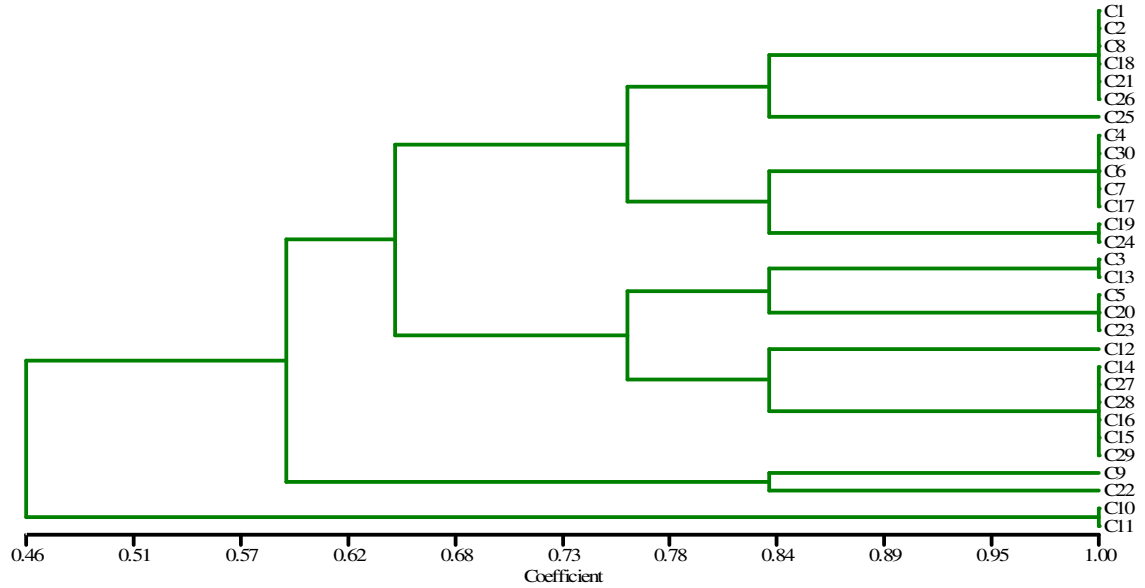
4.2.4. OPB8 Primerinin Değerlendirilmesi



Şekil 4.4, OPB8 Primeri ile elde edilen dendrogram

Şekil 4.4'de de görüldüğü gibi 0.48 oranında benzerlik gösteren C2 bireyinin dışındaki tüm bireyler en az 0.64 oranında yakınlık göstermiş iki ana gruba ayrılır. Dendrogramda C28 ve C29 nolu bireyler 0.74 oranında birbirine yakınlık gösterirler ve en dışta yer alan ana grubu oluştururlar. C1, C3, C20, C27; C5, C7, C9, C26, C25, C10, C11, C19 C12, C13; C21, C30; C6, C18, C24; C14, C15 nolu bireyler diğer primerlerdekinden farklı olarak gösterdiği %100 benzerlik, bu primerin tek başına genetik çeşitlilik açısından tam bir seçim için yetersiz olduğunu göstermektedir.

4.2.5. OPB18 Primerinin Değerlendirilmesi

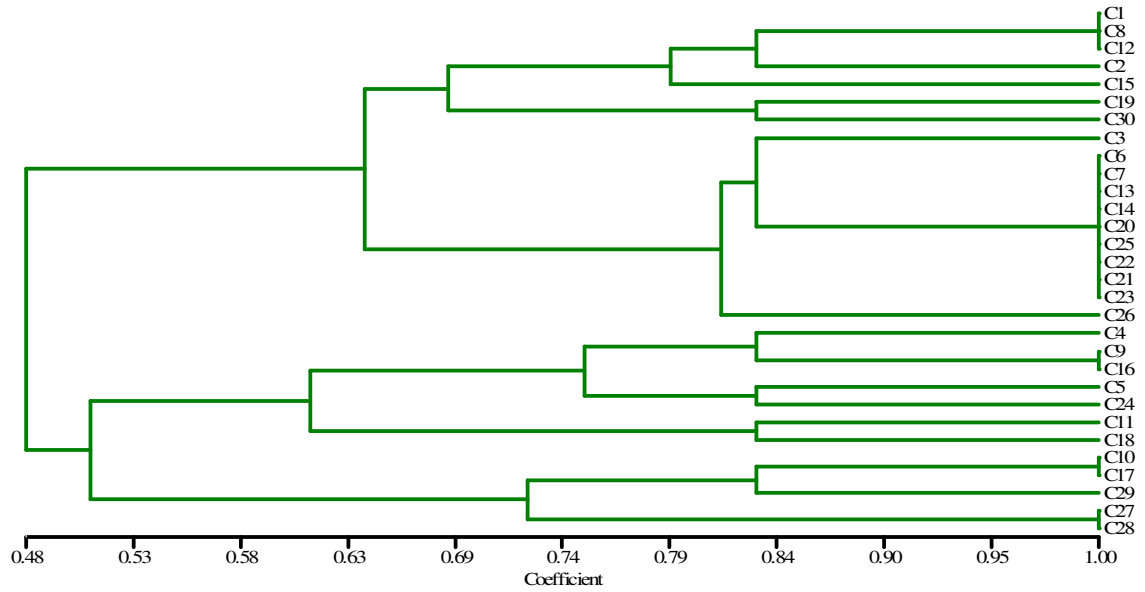


Şekil 4.5, OPB18 Primeri ile elde edilen dendrogram

Şekil 4.5'den de anlaşılacağı gibi dendrogram iki ana klada ayrılmaktadır. C10 ve C11 bireyleri bu kladlardan 0.46 benzerlikle diğer bireylere en uzak olanlardır. İkinci klad üç gruba ayrılır ve bu gruplar içerisinde aralarında hiçbir farklılığın gözlenmediği kümeler bulunmaktadır. Bunlardan C1, C2, C8, C18, C21,

C26 bireyleri birbirlerine %100 oranında benzerlik gösterir. Aynı şekilde C4, C30, C6, C7, C17 ve C19, C24 bireyleri arasında, C3, C13 ve C5, C20, C23 bireyleri arasında, C12 ve C14, C27, C28, C16, C15, C29 bireyleri arasındaki benzerlik oranı aynıdır. Fakat bu gruplar birbirine 0.77 oranında benzerdir. C9 ve C22 nolu örnekler ise diğer bireylere 0.60 oranında benzer bulunmuştur. OPB18 primeri ile yapılan bu analize göre bireyler arasında görülen yüksek benzerlik genetik açıdan popülasyondaki çeşitliliğin seçimini zorlaştırmıştır.

4.2.6. OPB19 Primerinin Değerlendirilmesi

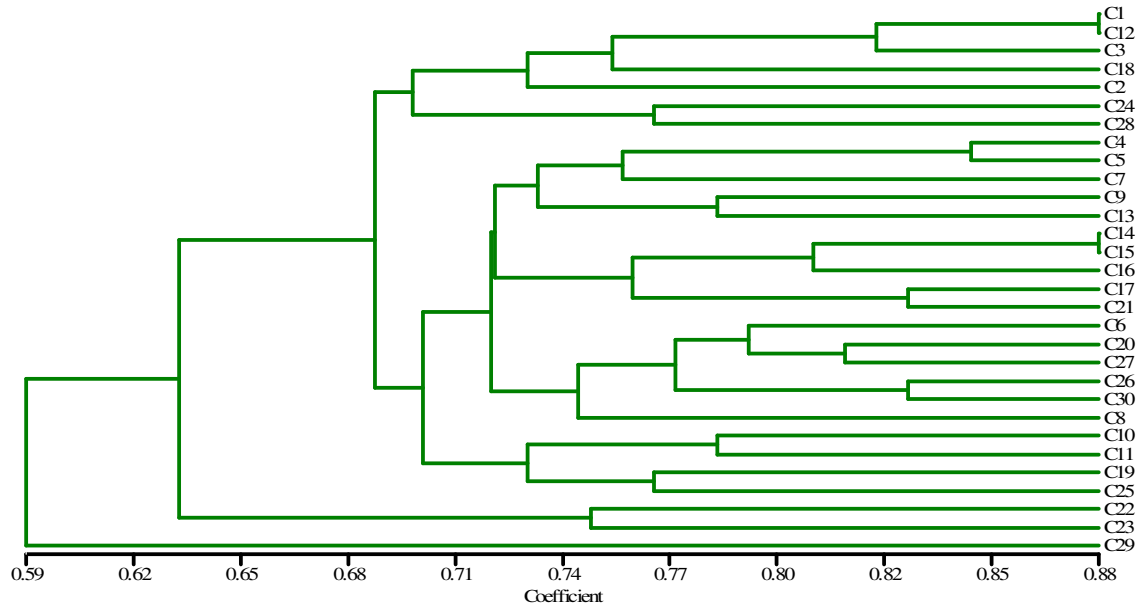


Şekil 4.6, OPB19 Primeri ile elde edilen dendrogram

OPB19 primerinden elde edilen dendrogramda 0.48 oranında benzerliği olan iki ana klad görülmektedir. Diğer primerlerden farklı olarak OPB19 primerinde kladların dışında kalan ve diğer bireylerden tamamen seçilen birey ya da bireyler

bulunmamaktadır. En yüksek polimorfizm oranının da bu primer ile olduğu düşünülürse (%85) ortaya çıkan 0.48 oranındaki benzerlik şaşırtıcı değildir. Ayrıca iki klad kendi içinde üç gruba ayrılmaktadır. C1, C8, C12,C6, C7, C13, C14, C20, C25, C22, C21, C23 ve C9, C16, C10, C17, C27, C28 nolu bireyler aralarındaki %100 benzerlik olduğu görülmektedir ve diğer bireylerle 0.84'ün altında bir benzerlik oranı bulunmaktadır. Populasyon içerisindeki genetik çeşitliliğin daha güçlü olması için tamamen benzer genotipli bireylerin daha az olması gereklidir.

4.2.7. Bütün verilerin kombinasyonunun değerlendirilmesi



Şekil 4.7, Tüm primerlerin kombinasyonu ile elde edilen dendrogram

Şu ana kadar değerlendirilen tüm primerlerden elde edilen sonuçlara göre oluşturulan dendrogramda, diğer beş primer sonucunda olduğu gibi temelde iki tabanlı bir gruplandırma görülmektedir. OPB7 primeri ile yapılan analiz sonucuna benzer olarak C29 nolu birey burada da diğer bireylere genetik çeşitlilik açısından en

uzak birey olarak görülmektedir (0.59 oranındaki benzerlikle). C22 ve C23 nolu bireyler 0.63 benzerlik oranıyla dendrogramda iki ana kladdan en uzak bireylerdir. Yani çeşitliliği en yüksek birey öncelikle C29, sonra C23 ve C22 bireyleridir.

İki ana grup birbirine 0.69 oranında benzer bulunmuştur. Bu iki ana klad içerisinde 5 grup bulunmaktadır. Bu gruplarda yer alan C1 ve C12 bireyleri ve C14 ve C15 bireyleri %100 benzerlik göstermektedir. Genotiplerdeki %100 benzerliklerin az olması, popülasyon içindeki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde farklı genotiplerin seçimine izin vermiştir. Verilerin birleştirilmesi ile bireyler arasında yüksek oranda genetik seçim sağlamıştır.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Nesli tehdit altında olan lokal endemik bir türün genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve gelecek yüzyıllara bu türün doğal seleksiyona karşı ne derece bir direnç sergileyebileceğinin tespit edilmesi çalışmamızın asıl amacıdır. Çalışmamız bu bitkinin kendi popülasyonu içerisinde azınsanmayacak ölçüde bir genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ancak popülasyonun tek bir lokasyonda mevcut olması ve geleceğini etkileyebilecek antropojenik faktörlerin yoğun olması gibi olumsuz faktörler göz önüne alındığında bu türün kısa vadede hem doğal ortamında hem de laboratuvar şartlarında korunması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Normal şartlar altında her ne kadar bu türün sahip olduğu gen havuzu kendisini gelecek yüzyıla taşıyabilse, olumsuz dış faktörler her zaman göz önüne alınmalı, özellikle bu türler lokal endemik olduğu zaman strateji ve prensipler en az iki kat gözden geçirilmelidir.

Bu çalışmada tek bir popülasyondan seçilen *Centaurea lycaonica* türüne ait 30 birey üzerinde denenen 6 primer ile elde edilen verilere göre RAPD primerleriyle amplifiye edilen türe ait gen bölgelerinin yeterli ölçüde polimorfik olduğu gözlenmiştir (en fazla %85, en az %46). Bireylerin benzerlikleri ayrı ayrı incelendiğinde benzerlik oranları 0.65 – 0.36 arasında değişmekte olup, OPB7 primeri ile bu oranda ayrılan bireyin (C29 bireyi için) fenotipik açıdan da popülasyon içerisinde en farklı morfolojik özelliklere sahip olduğu söylenebilir. Veriler birleştirildiğinde ise popülasyondaki genetik çeşitliliğin üst sınırı 0.59 olarak tespit edilmiştir.

OPG2 primeri ile C12 ve C18 bireyleri arasında görülen %100 oranındaki benzerlik OPG17 primerinde de görülmüştür. C18 ve C24 bireyleri OPB8 primeri ile elde edilen patternlere görede oldukça yakın bulunmuştur. C1 ve C3 bireyleri hem OPB7 hemde OPB8 primerleri ile gerçekleştirilen analizlerde benzer biçimde yakın genotipli bulunmuşlardır. C9 ve C10 bireyleri arasındaki genetik benzerlik oranı OPG17 ve OPB8 primerleri ile gerçekleştirilen analizlerde benzerlik göstermiştir. OPB7, OPB18 ve OPB19 primerleri ile yapılan analizler sonucunda ise C27 ve C28 nolu bireyler arasındaki genetik benzerlik oranı aynı bulunmuştur. Bunun yanında

bütün verilerin birleştirilmesiyle elde edilen dendrogram dikkate alındığında C1 ve C12 nolu bireylerdeki genetik benzerlik OPB19 primeri ile yapılan analizlerde de tamamen benzer bulunmuştur. Ayrıca OPB8 ve OPB18 primerleri ile yapılan analizler karşılaştırıldığında C14 ve C15 nolu bireyler benzer biçimde yakın genotipli olarak görülmektedir. Populasyon içi genetik çeşitlilik dikkate alındığında OPB18 ve OPB7 primerleri ile bireyler arasında ciddi seçilimin yapılması oldukça zordur. OPB7 primeri ile yapılan analiz sonuçlarına göre C29 bireyinin diğer bireylere 0.36 oranında yakınlık gösterdiği tespit edilmiş olup en farklı genotipe sahip olan birey olduğu tespit edilmiştir. C10 nolu birey diğer bireylerle karşılaştırıldığında OPG2 primeri ile 0.65 oranındaki uzaklığın OPB18 primerleri ile gerçekleştirilen analizlerinde 0.46 oranında olduğu görülmektedir. Buna göre C10 nolu bireyin genetik çeşitlilik oranının oldukça zengin olduğunu söyleyebiliriz. OPG17 primerinin analiz sonuçlarına göre C3 nolu bitkinin en uzak genotipli birey (0.53 oranındaki benzerlik oranı ile) olduğu görülmektedir. C2 nolu birey ise OPB8 primeri ile dış gruba atılmış ve benzerliğinin 0.48 oranında olduğu tespit edilmiştir. Bütün verilerin birleştirilmesi ile elde edilen dendrogram yorumlandığında ise C29 nolu bireyin OPB7 primerinde de görüldüğü gibi grupların en dışında seçilmiş olduğu görülmektedir. Buradaki uzaklık oranı 0.59'dur. Bu çalışmanın sonucuna göre *C. lycaonica* populasyonundaki bireyler arasında kayda değer oranda genetik çeşitlik (0.59) görülmüştür. Bu oran genel olarak populasyonlarda olması arzu edilen genetik çeşitlilik oranı ile örtüşmektedir (0.46–0.62).

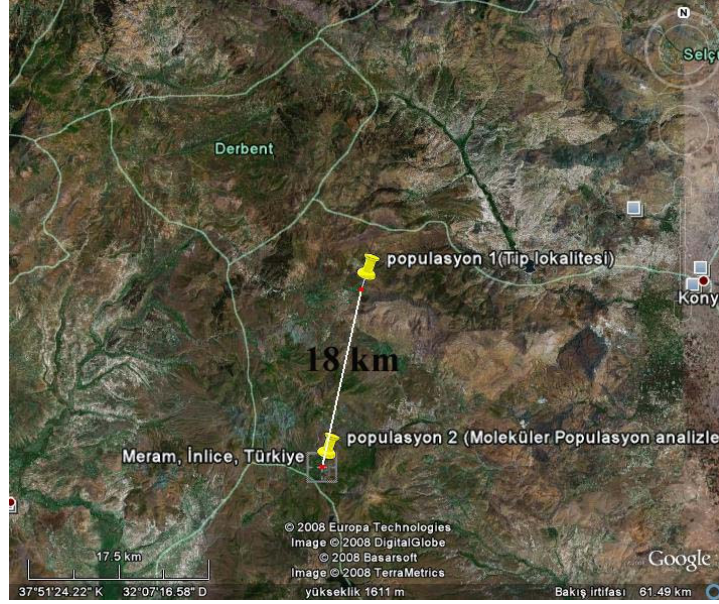
Gen kaynaklarının belirlenmesinde, mümkün olduğu kadar yüksek gen çeşitliliğini yakalayabilmek için seçilecek populasyonların kendi içerisinde yüksek oranda genetik çeşitliliğe sahip, aynı zamanda diğer populasyonların her birinden genetik olarak farklılaşmış olmaları arzu edilir (Gülbaba ve ark. 1996). Populasyonun gerçekleri yansıtması bakımından en iyi şekilde seçilmesi için polimorfizm oranını en uygun biçimde yansıtacak yeterli sayıdaki primer ile (80–230) bant oluşturulması istenmektedir. Buna göre çalışmamızda 6 RAPD primeri ile 84 bant elde etmemiz yeterli olmasına rağmen gerçek şekilde populasyondaki çeşitliliği yansıtmak için daha sonraki çalışmalarda daha fazla primer kullanılabilir.

Genetik kaynakları korumanın amacı; genetik çeşitliliği en yüksek düzeyde tutmak, gerektiğinde bu zengin çeşitlilikten yararlanmaktır. Genetik çeşitliliği yüksek

olan türler ve ırklar zamana ve yere göre değişen çevre koşullarına daha iyi adaptasyon gösterirler. Ayrıca bilimsel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak değişen insan isteklerini karşılamada daha etkili ve yararlı olurlar (Işık 1996). Böylece özellikle tıbbi yönden faydaları daha önceki literatürlerde açıklanmış olan *Centaurea* cinsinin (Arif ve ark. 2004), bir üyesi olan bu tür hakkında yapılan bu öngörü ile antropojenik etki olmadığı sürece türün zamana ve değişen çevre koşullarına adaptasyon gösterebilecek bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu söylenebilir. Milli gen kaynağımız olan bu türün gelecekte bilimsel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak insanoğlunun ihtiyaçlarına cevap verecek bir kaynak olabileceğini düşünmekteyiz.

Yapmış olduğumuz çalışmada yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında populasyonun polimorfizm oranı yeterli olmakla birlikte değişen çevre ve zamana karşı uyum sağlayabilecek farklı genomları içerip içermediği kesin olarak bilinmemektedir. Rastgele seçimi yapılan primerlerle elde edilen patternlere göre belli bir seviyede polimorfizm içeren bu populasyonun geleceği ile ilgili önemli kararların alınması için daha detaylı moleküler verilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma kapsamında populasyon içerisinde 61 adet polimorfik bant elde etmiş olmakla birlikte gelecek çalışmalarla bu varyasyon seviyesinin daha da genişleyebileceğini düşünmekteyiz.

Ekim (2000)'e göre *Centaurea lycaonica* IUCN kategorisinde tehlikede (EN) olarak gösterilmesine rağmen, populasyonun iki örnekleme alanından ibaret tek bir lokasyondan bilinmesi (Çapı 18 km) ve dar bir yayılış göstermesi bu türün IUCN kategorisinde kritik tehlikede olarak değerlendirilmesi ve korumaya alınmasının gerekli olduğunu göstermektedir. IUCN 2001 kriterlerine göre çalışma konusu olan tür B1.a, B1.b.ii, B1.b.iii, B1.b.v kriterleri göz önüne alınarak CR (Kritik Tehlikede) kategorisinde değerlendirilmiştir.



Şekil 5.1, Populasyonu örnekleme alanı (Googlearth)

Geçmişten günümüze kadar *Centaurea* cinsinin sınıflandırılmasında temel olarak apendaj ve aken yapıları göz önüne alınmıştır (Dittrich 1968a, Wagenitz 1975). Çalışma süresince aynı populasyon içerisindeki bireylerde özellikle apendaj yapılarında bir varyasyon olduğu tespit edilmiştir. *Phalolepis* seksiyonu içerisinde yer alan türlerde apendaj membranımsı yapıya sahip olmasına rağmen, silli yapıya sahip olan bir türde rapor edilmiştir (*C. sipylea* Wagenitz). Ancak *C. lycaonica*'nın orijinal betiminde böyle bir varyasyondan söz edilmemiştir. Apendaj yapılarında membranımsıdan silliyle değişen bir varyasyonun yanı sıra gövdenin basit veya dallı, kısa veya uzun olması noktasında bir varyasyonun olduğunu tespit etmiş bulunmaktayız.

Aynı zamanda bu çalışma neticesinde nesli tükenme riski ile karşı karşıya olan türümüzün doğal ortamında (In Situ) korunması çalışmalarında takip edilmesi gereken prensip ve stratejiler ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgilerin diğer tehdit altında olan endemik türler içinde örnek alınmasını öneririz.

Sonuç olarak *C. lycaonica* ve onun gibi lokal endemiklerle çalışılırken;

1. Laboratuar çalışmalarında populasyon, örnekler ve moleküler analizlerle tür içi ve türler arası polimorfizm tespit edilerek türlerin

gelecek yüzyıl içerisinde varlıklarını devam ettirip ettiremeyecekleri tahmini olarak belirlenmelidir.

2. Türler her ne olursa olsun doğal ortamlarında gözlemlenmeli ve popülasyonun iyileştirilmesi için gerekli çalışmalar yapılmalıdır. Popülasyon yapısını olumsuz yönde etkileyecek faktörler (hibridizasyon, antropojenik etki gibi) engellenmeli, kanuni düzenlemeler için girişimlerde bulunulmalıdır.
3. Her türün yayılış sınırları, popülasyonlar arasındaki gen akışları ve seviyesi, tür içi ve türler arası melezleme, popülasyondaki verimli birey sayısı, popülasyondaki birey sayısının artma veya azalması gibi faktörler devamlı olarak gözlemlenmelidir ve kayıt altına alınmalıdır.
4. Lokal endemik türlere ait gen kaynakları, gen bankalarında ve tohum bankalarında muhafaza altına alınmalıdır. Botanik bahçelerinde veya seralarda türlerin canlı örnekleri sergilenmeli ve yaşatılmalıdır.

Bu çalışma sonucunda *C. lycaonica* popülasyonundaki bireylerin sayısında artma ve azalma oranlarına da bakılmıştır. Popülasyondaki bireyler iki yıl gözlenerek etiketlenmiş, olgun birey sayısı tespit edilmiştir. Laboratuvar koşullarında tohumlarının çimlenmesi ve verimlilikleri araştırılmış, buna göre çimlenme oranları yüksek, verimleri ise yeterli olarak bulunmuştur. Türün bulunduğu habitatda *C. calolepis* Boiss. bulunmasına rağmen herhangi bir melez veya ara form olmadığı tespit edilmiştir. Melez ırklar gibi tehdit unsuru faktörler olmamakla birlikte, tür için en önemli tehdit antropolojik faktörlerdir. Çünkü türe ait popülasyonlar çok işlek karayolları üzerinde yer almaktadır. Çalışmamızda *C. lycaonica*'nın kromozom sayısı ve morfolojisi de verilmiştir. Ayrıca bu çalışmada popülasyona ait bireylerin DNA izolasyonları yapılmış ve gen bankası oluşturulması için adım atılmıştır. Tohumlar ise tohum bankasında saklanarak popülasyonun gelecek yüzyıl içerisinde korunması amaçlanmıştır. IUCN kriterlerine göre türün bulunması gerekli olan kategori tespit edilmiş, türün korunma stratejisi için en az 10 yıl gözlenmesi kararı alınmıştır.

Sonraki çalışmalar için doğal gen kaynaklarımızın doğal ortamlarında korunması, stratejik ürünlerde hedef genlerin iyileştirilmesi, nitelikli tohumlar geliştirilmesi, hastalık ve zararlılardan arındırılması, endemik türlerin morfolojik, moleküler genom bilim yaklaşımları ile tanımlanıp tescillenmesi, patentlenmesi, ekonomik değere sahip genetik kaynakların kültür formlarının geliştirilmesi, endemik türlerin kültüre alınması, nesli tehlike altında olan türlerin ve hedef türlerin korunması ve gen havuzunun oluşturulması, bitki gen kaynaklarının öncelikle genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi ve doğal ortamlarında korunması hedef alınmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abdalla, A.M., Reddy, O.U.K., El-Zik, K.M., Pepper, A.E., 2001. Genetic Diversity and Relationships of Diploid and Tetraploid Cottons Revealed Using AFLP. *Theor Appl Genet.*, 102: 222-229.
- Altunkunt, A., 2001. Bitki Biyogüvenlik Araştırmaları Eğitim Programı. TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kurs Notları.
- Arif, R., Küpeli, E., Ergun, F., 2004. *Centaurea L.* Türlerinin biyolojik aktivitesi. *G.U. Fen Bilimleri Dergisi*, 17 (4): 149-164.
- Atalay, 1994. Türkiye Vegetasyon Coğrafyası. E.Ü. Basımevi, İzmir.
- Atar, M., 2006. *Centaurea kilea* Boiss. ve *Centaurea cuneifolia* SM. üzerinde morfolojik ve palinolojik araştırmalar. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Aygün, F., 2006. *Vicia canescens* populasyonların arasındaki varyasyonun RAPD ve FAMEs ile analizi. Atatürk Üniversitesi, Yüksek lisans tezi.
- Babaoğlu, S., Açık, L., Çelebi, A., Adıgüzel, N., 2004. Molecular Analysis of Turkish *Allyssum L.* (Brassicaceae) Species By RAPD-PCR and SDS-PAGE Methods. *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 17(3): 25–33
- Baytop, T. , 1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları, Ankara, ISBN: 975–16–0542–3.
- Besse, P., Dasilva, D., Humeau, L., Govinden-Soulange, J., Gurib-Fakim, A., Kodja, H., 2003. A Genetic Diversity Study of Endangered *Psiadia* species Endemic from Mauritius Island Using PCR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 1427-1445.
- Boşgelmez, A., 2005. *Centaurea tchihatcheffii* Ankara-Gölbaşı Sevgi Çiçeği. Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- Britten, R.J., 1996. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science*, 231, 1393–1398.
- Burr, B., 1994. DNA-based markers in plants, R.L., Phillips, I.K., Vasil, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Vol. 1.
- Chaparro, J.X., Werner D.J., O Malley D., Sederoff R.R., 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 194-200.
- Davis, P.H., 1965. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburg Üniv. Pres. 1 v.
- Davis, P.H., 1970. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 3, Edinburgh Univ. Press, 328–369.
- Davis, P.H., 1975. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 5. Edinburgh Press.
- Davis, P.H., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 10, Edinburgh Univ. Press. Edinburgh.
- Demirayak, F., 2002. Biyolojik çeşitlilik-doğa koruma ve sürdürülebilir kalkınma. Tübitak vizyon 2023 projesi, Doğal Hayatı Koruma Derneği.
- Dittrich, M., 1968a. Karpologische Untersuchungen zur Systematik von *Centaurea* und verwandten Gattungen. Teil I. *Botanischer Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 88: 70±122, 123±162.

- Dittrich, M., 1968b. Morphologische Untersuchungen an den Früchten der Subtribus Cardueae-Centaureinae (Compositae). *Willdenowia* 5/1.
- Dittrich, M., 1977. Cynareae. systematic review. In: Heywood, V.H., Harborne, J.B., Turner B.L., (eds) *The biology and chemistry of Compositae* Vol. II. London: Academic Press, 999.1015.
- Doğan, Y., 2006. Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) Çeşit ve genotiplerinin moleküler markör teknikleri ile karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens., Bahçe bitkileri A. B. D., Adana.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Erik, S., İlarıslan, R., 1989. Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitki Türleri. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayın No: 18, Ankara.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytacı, Z., Adıgüzel, N., 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Ankara, ISBN 975-93611-0-8.
- Ellstrand, N.c., Elam, D.R., 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 217- 242.
- Ertuğrul, K., Uysal, T., Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Garnatje, T. 2004. The systematic position of *Centaurea ensiformis* and *Centaurea isaurica* from Turkey and the evolution of some characters in *Centaurea*. *Israel Journal of Botany*, 145: 345-352.
- Escudero A., Jose, M., Iriondo, M., Torres, E., 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation, *Biological Conservation* 113, 351–365.
- Flamini, G., Antognoli, E., Morelli, I., 2001. Two Flavonoids and Other Compounds From The Aerial Parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry* 75: 559–564.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., 1992. Karyological notes on *Centaurea* sect. *Acrocentron* (Asteraceae). *Pl. Syst. Evol.* 179: 1–18.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., İlarıslan, R. 1996. Aneuploidy in the *Centaureinae* (Compositae): n=7 the end of the series. *Taxon* 45: 39±42.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., İlarıslan, R. ve İlarıslan, H., 1997. New chromosome counts in the subtribe *Centaureinae* (Compositae, Cardueae) from West Asia. *Bot. J. Lin. Soc.* 125: 343–349.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Mozaffarian, V., 1998. New chromosome counts in the subtribe *Centaureinae* (Asteraceae, Cardueae) from West Asia III. *Bot. J. Lin. Soc.* 128: 413–422.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Mozaffaröan, V., İlarıslan, R., 2000. The natural delimitation of *Centaurea* (Compositae: Cardueae): ITS sequences analysis of the *Jacea* group. *Plant Systematics and Evolution* 223: 185-199.
- Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Garnatje, T., Völattersan, R., 2001. A Generic delimitation and phylogeny of the subtribe *Centaureinae* (Compositae): a combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Annals of Botany* 87: 503-515.
- Geleta, M., Bryngelsson, T., Bekele, E., Dagne, K., 2007. Genetic diversity of *Guizotia abyssinica* (L. F.) Cass. Amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genet Resour Crop Evol.*, 54: 601-614.
- Genç, Y. ve Kaya, Z., 2002. A 4/5 karesi için endemik olan *Centaurea tosiensis* Frey & Sint üzerinde morfolojik, anatomik ve palinolojik incelemeler. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi Bildiriler Kitabı II. Cilt, 15 – 18 Mayıs Artvin, Artvin Orman Fakültesi, 574 – 580.

- Godt, M.J.W., Hamrick, J.L., Brattony, S., 1995. Genetic diversity in a threatened wetland species, *Helonias bulata* (Liliaceae). *Conservation Biology*, 9, 596-604.
- Gregor, D., Hartmann W., Stosser, R., 1994. Cultivar Identification in *Prunus domestica* using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Acta Horticulturae*, 359.
- Grieve, M., 1995. A Modern Herbal. Available on-line at [http://www. botanical. com/ botanical/ mgmh/ k / knagre06.html](http://www.botanical.com/botanical/mgmh/k/knagre06.html).
- Gutierrez, O.S., Basu, S., Saha, S., Jenkins, J.N., Shoemaker, D.B., Cheatham, C.L., McCarty, J.C.Jr., 2002. Genetic Distance Among Selected Cotton Genotypes and its Relationship with F2 Performance. *Crop Sci.*, 42:1841-1847.
- Gülbaba, A.G., Velioğlu, E., Özer, A.S., Doğan, B., Doerksen, A.H., Adams, W.T., 1996. Kazdağı Göknaarı (*Abies equitrojani* Aschers. Et sint) Populasyonlarının Genetik Yapıları ve Gen Kaynaklarının Yerde Korunması. Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü DOA Dergisi, No 2. Tarsus, 23-48.
- Gülşen, O., Mutlu N., 2005. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. *Alatarım*, 4 (2), 27-37.
- Gülşen, O., Roose, M.L., 2001. Chloroplast and Nuclear Genome Analysis of the Parentage of Lemons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126(2): 210-215.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.D. H., Kahlar, M.L., Weir, B.S. (Eds.), *Plant population genetics: Breeding and genetic Resources*. Sinaver, Sunderland, MA, pp. 43-63.
- Harris, S.A., 1999. RAPD in systematics – a useful methodology? In; Hollingsworth, P.M., Bateman R.M., Gornall R.J. (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, 211-228 p, London.
- Iqbal, M.J., Aziz, N., Saeed, N.A., Zafar, Y., Malik, K.A. 1997. Genetic Diversity Evaluation of Some Elite Cotton Varieties by RAPD Analysis. *Theor Appl Genet.*, 94:139-144.
- Işık, K., 1996. Biyolojik Çeşitlilik ve Orman Gen kaynaklarımız. Orman Bakanlığı Yayın No: 013.
- IUCN Red List Categories, 2001. Version 3.1. Prepared by the IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.
- Kapusuz, E., 2000. Türkiye'deki bazı *Centaurea* türleri üzerinde morfolojik – anatomik ve palinolojik araştırmalar, *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi.
- Karaca, M., Saha, S., Zipf A., Jenkins, J.N., Lang, D.J., 2002. Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp.): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting. *Crop Science*, 42, 2118-2127.
- Kaya, Y., 1999. Tohumlu Bitkiler Sistematiği. Erzurum. p. 580.
- Kaya, Z., 1985. Endemik iki *Centaurea* türü üzerinde taksonomik, ekolojik ve palinolojik araştırmalar. *Doktora Tezi*, Marmara Üniversitesi.
- Kaya, Z., 1987. Türkiyede Endemik *Centaurea derderiifolia* Wagenitz ve *Centaurea saligna* (C. Koch) Wagenitz Türleri Üzerinde Dış ve İç Morfolojik Araştırmalar 2. M.Ü. Eczacılık Dergisi cilt 3, sayı 1, İstanbul, 1-16.
- Kaya, Z., Başaran, S., Akkemik, Ü., Yaman, B., 1996. Türkiyenin Endemik Bazı *Centaurea* Taksonlarının Polenleri. XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, İstanbul, 329-338.
- Kaya, Z., Eski Başaran, S., Akkemik, U., 2000a. Palynological Research On Some Endemic Species of *Centaurea* L. in Turkey. *BIOS* 5, 27-34.
- Kaya, Z., Genç, Y., 2002. Endemik *Centaurea tchihatcheffii* Fisch & Mey. Üzerinde morfolojik, anatomik ve palinolojik araştırmalar. *U.K.O.T.*

- Kaya, Z., Genç, Y., Sarıbaş, M., 2001. Morphological and palynological research on some species of *Centaurea* L. in Turkey. Third Balkan Scientific Conference. 2 – 6 October 2001 Sofia, Sofia 95 – 103.
- Kaya, Z., Kün, E., Güner, A., 1997. National Plan for In situ Conservation of Genetic Diversity in Turkey. Submitted to the Republic of Turkey. Ministry of Environment, Ankara, 125 p.
- Kaya, Z., Orcan, N., Binzet, R., Genç, Y., 2000b. The exterior – interior morphological characteristic and the palynological properties of endemic *Centaurea zeybekii* Wagenitz, *Plants of The Balkan Peninsula: into The Next Millennium*, 14 – 17 May 2000 _stanbul, _stanbul Üniversitesi, 469 – 473.
- Kazan, K., Manners, J.M., Cameron, D.F., 1993. Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in An Interspecific Cross in The Genus *Stylosanthes*. *Genome*, 36: 506–509.
- Kuş, S., 1991. *Centaurea amasiensis* Bornm. ve *C. amplifolia* Boiss. & Heldr. Üzerinde Taksonomik, Morfolojik Araştırmalar. İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
- Li, X., Ralphs, M.H., Gardner, D.R., Wang, R.R.C., 2002. Genetic variation within among 22 accessions of three tall larkspur species (*Delphinium* sp.) based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 91-102.
- Loeffler, W., Morden, W., 2003. Genetic diversity and biogeography of the Hawaiian cordage plant, olona (*Touchardia latifolia*; Urticaceae), based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31: 1323-1335.
- Lundberg, J., Backlund, M., Bremer, B., 2001. A Phylogenetic analysis of 100 genera and 50 families of euasterids based on morphological and molecular data with notes on possible higher level morphological synapomorphies. *Plant Syst. Evol.* 229:137–169.
- Madan, K., Shrestha, Golan-Goldhirsh, A., Warda, D., 2002. Population genetic structure and the conservation of isolated populations of *Acacia raddiana* in the Negev Desert, *Biological Conservation* 108, 119–127.
- Martin, E., Dinç, M., Duran, A., Öztürk, M., 2006. Karyological Studies on *Lotus strictus* Fisher and C.A. Mey. (Leguminosae), *Centaurea amanicola* Hub.-mor. (Compositae) and *Teucrium lamiifolium* D'urv. Subsp. *Lamiifolium* (Labiatae). *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 1 (1): 12-17.
- Mattnera, J., G. Zawko, M. Rossetto, S.L. Krauss, K.W. Dixon, K. Sivasithamparama, 2002. Conservation genetics and implications for restoration of *Hemigenia exilis* (Lamiaceae), a serpentine endemic from Western Australia. *Biological Conservation* 107 (2002) 37–45.
- Maxted, N., 2003. Conserving the genetic resources of crop wild relatives in European protected areas. *Biological conservation*, 113: 411- 417.
- Michelia, M.R., Bova R., 1997. Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR. Springer, Berlin.
- Nadot, S., Ballardjr, H.E., Creach, J. B. and Dajoz, I., 2000. The evolution of polen heteromorphism in *Viola*: A phylogenetic approach *Plant Systematics and Evolution Abstract* 223 (3-4):155-171.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Pres.
- Ochsmann, J., 2000. Morphologische und molekularsystematische Untersuchungen an der *Centaurea stoebe* L.-Gruppe (*Compositae-Cardueae*) in Europa. - *Diss. Bot.* 324: 242 pp.
- Oiki, S., Kawahara, T., Inoue, K., Ohara, M., Maki, M., 2001. Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among populations of the insular

- endemic plant *Campanula microdonta* (Campanulaceae). *Annals of Botany* 87: 661-667.
- Özel, Ç.A., 2002. *Centaurea tchihatcheffi*'nin in vitro Çoğaltımı. Gazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 68 s.
- Parker, P.G., Snow A.A., Schug M.D., Booton G.C. and Fuerst P.A., 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Molecular Techniques in Ecology*, 79 (2), 361–382.
- Pehlivan, S., 1996. Light Microscopic Studies in the Pollen Morphology of Some Endemic Turkish *Centaurea* Species. *Turkish Journal of Botany*, 311-319.
- Pınar, M. N., İnceoğlu, Ö., 1996. A Comparative Study on the Pollen Morphology of *Centaurea triumfettii* All. Groups. A, B and C with Light and Electron Microscopy. *Turkish Journal of Botany*, 395–398.
- Porras, R. ve Munoz, J. M., 2000. Cleistogamus capitulum in *Centaurea melitensis* (Asteraceae): heterochronic origin, *American Journal of Botany*, 87 (7), 925-933.
- Qiaoming, L., Zaifu, X., Tianhua, H., 2002. Ex situ genetic conservation of endangered *Vatica guangxiensis* (Dipterocarpaceae) in China. *Biological Conservation*, 106: 151-156.
- Rafalski, J.A., Tingey S.V., 1993. Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites and Machines. *Trends Genet.*, 9, 275-279.
- Rahman, M., Hussian, D., Zafar, Y., 2002. Estimation of Genetic Divergence among Elite Cotton Cultivars-Genotypes by DNA Fingerprinting Technology. *Crop Sci.*, 42:2137-2144.
- Rana, M.K., Bhat, K.V., 2005. A Comparison of AFLP and RAPD Markers for Genetic Diversity and Cultivar Identification in Cotton. *J Plant Biochem Biotechnol.*, 13 (1):19-24
- Rohlf, F. J., 1998. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system user guide, Exeter Software, New York, 0-925031-28-3.
- Rohlf, J. F., 2004. NTSYS-pc:2. 11 Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, N. Y.
- Romaschenko, K., Ertuğrul, K., Susana, A., Garcia-Jacas, N., Uysal, T., Arslan, E., 2004. New chromosome counts in the *Centaurea Jacea* group (Asteraceae, Cardueae) and some related taxa. *Bot. J. Lin. Soc.* 145: 345–352.
- Saghir, M.G., Malkawi, H.I., Oqlah, A. El., 2007. Genetic diversity in *Hordeum spontaneum* C. Kosch of Northern Jourden (Ajloun area) as revealed by RAPD and AFLP makers. *International Journal of Botany* ISSN 1811–9700.
- Senior, L.M., Murphy, J.P., Goodman, M.M., Stuber, C.V., 1998. Utility of SSRs for Determining Genetic Similarities and Relationships in Maize Using an Agarose Gel System. *Crop Sci.*, 38:1088-1098.
- Skoula, M., El Hilali I. and Makris A.M., 1999. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 559–568.
- Soltis, D.E., Collöer, T.G., Edgerton, M.L., 1991. The Heuchera group (*Saxifragaceae*): Evidence for chloroplast transfer and parafyly.- *Amer.J.Bot.* 78: 1091–1112
- Sreekumar, V.B., Renuka, C., 2006. Assessment of genetic diversity in *Calamus thwaitesii* BECC. (Arecaceae) using RAPD markers. *Biochemical Syst. And Ecology*, 34: 397-405.
- Stuber, W.C., 1992. Biochemical and molecular markers in plant breeding. *Plant Breeding News*, 9, 36–61.

- Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1995. Phylogenetic relationships in tribe *Cardueae* (*Asteraceae*) based on ITS sequences. *American Journal of Botany* 82: 1056±1068.
- Susanna, A., Garnatje, T., Garcia-Jacas, N., 1999. Molecular phylogeny of *Cheirolophus* (*Asteraceae: Cardueae-Centaureinae*) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution* 214: 147±160.
- Tabar, M. V., Chandrashekar, S., Rana, M.K., Bhat, K.V., 2004. RAPD Analysis of Genetic Diversity in Indian Tetraploid and Diploid Cotton (*Gossypium* spp.). *J Plant Biochem Biotechnol.*, 13:81-84.
- Tansley, S.A., Brown, C.R., 2000. RAPD variation in the rare and endangered *Leucardendron elimense* (*Proteaceae*): implications for their conservation. *Biological Conservation*, 95: 39-48.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler (2. baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, 345 s, İstanbul.
- Tornadore, N., Marchiori, S., Vergari, G., 2000. Systematic relationships of three species of *Centaurea* L. (*Asteraceae*) in Saletto-Apulia (SE Italy). *Israel Journal of Plant Sciences*, 48, 53-57.
- Tuzlacı, E., 1978. *Centaurea amplifolia* Boiss.& Heldr.'in Türkiye'deki Varlığı Hakkında. *Biyoloji Dergisi*, Cilt 28: Sayı 1-4, 105-107.
- Uysal, T., 2006. Türkiye *Centaurea* (*Asteraceae*) Cinsi *Cheirolepis* (Boiss.) O. Hoffm. Seksiyonunun Morfolojik, Karyolojik ve Moleküler Revizyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.
- Uysal, T., 2008. *C. ertugruliana* (*Asteraceae*), a new species from Turkey. *Ann. Bot. Fennici* 45: 137-140
- Uysal, T., Duran, A., Tugay, O., Ertuğrul, K., 2008. *Centaurea lycaonica* Boiss.& Heldr., 19. Ulusal Biyoloji Kongresi Poster sunumu, TRABZON
- Van Becelaere, G., Lubber, E.L., Paterson, A.H., Cheep, W., 2005. Pedigree- vs. DNA Marker-Based Genetic Similarity Estimates in Cotton. *Crop Sci.*, 45(6): 2281-2287.
- Vazquez, J.L.H., Gomez-Mercado, F., Guerrero, J-L.G., Rodriguez-Garcia, I. And Garcia-Maroto, F., 1999. Genetic relationships and population structure within taxa of endemic *Sideritis pusilla* (*Lamiaceae*) assessed using RAPDs. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129, 345–358.
- Vazquez, J.L.H., Gomez-Mercado, F., Guerrero, J-L.G., Rodriguez-Garcia, I. And Garcia-Maroto, F., 1999. Genetic relationships and population structure within taxa of endemic *Sideritis pusilla* (*Lamiaceae*) assessed using RAPDs. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129, 345–358.
- Vilatersana, R., Garnatje, T., Susana, A., Garcia-Jacas, N., 2005. Taxonomic problems in *Carthamus* (*Asteraceae*): RAPD markers and sectional classification. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147, 375–383.
- Villodre, J. M., Garcia-Jacas, N., 2000. Pollen Studies in Subtribe *Centaureinae* (*Asteraceae*): the Jacea Group Analysed with Electron Microscopy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 473-484.
- Wagenitz, G., 1975. “*Centaurea*”, in Davis, P. H.: “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, Vol.5, Edinburgh University Press, Edinburgh, 465-467.
- Wagenitz, G., Hellwig, F.H., 1996. Evolution of characters and phylogeny of the *Centaureinae*. In: Hind DJN, Beentje HG, eds. *Compositae: Systematics*. Proceedings of the International *Compositae* Conference, Kew, 1994. Kew: Royal Botanical Gardens, 491.510.
- Wagstaff, S. J., Breitwieser, I., 2002. Phylogenetic Relationship of New Zealand *Asteraceae* inferred from ITS sequences. *Plant Syst. and Evolution* 231: 203–224.

- Welsh, J. and McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids. Res.*, 18, 7213-7218.
- Whitkus, R., Doebley J., Wendel J.F., 1994. DNA-based markers in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Williams, J.G.K., Kubelik A.R., Livak R.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.*, 18, 6531-6535.
- Williams, C.E., St Clair, D.A., 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 36: 619-630.
- Yaman, B., 1998. Türkiye'deki bazı endemik *Centaurea* L. taksonları üzerinde morfolojik ve palinolojik araştırmalar, Yüksek Mühendislik Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi.
- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001. Bitki Biyoteknolojisi (eds. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.). Bölüm 23, Genetik Markörler ve Analiz Metodları, 334-363. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374 s, Konya.
- Zahreddine, H., Clubbe, C., Baalbaki, R., Ghalayini, A., Talhouk, S.N., 2004. Status of native species in threatened Mediterranean habitats: the case of *Panacratium maritimum* L.(sea daffodil) in Lebanon. *Biological Conservation*, 120: 11-18
- Zhang, J.F., Lu, Y.Z., Yu, S.X., 2005. Cleaved AFLP (cAFLP), a Modified Fragment Length Polymorphism Analysis for Cotton. *Theor Appl Genet.*, 111(7):1385-1395.

7. EKLER

7.1 Araştırmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Araştırmada sıvı azot tankı, su banyosu, soğutmalı santrifüj (Hettichzentrifuge Universal, 32P), hassas terazi (Sartorius, TE2MS), otomatik pipetler (Eppendorf), elektroforez tankı ve güç kaynağı (Albio, Horizon 58 ve Bimetra, PP40000), UV Cihazı (UVP), jel görüntüleme (Olympus), mikrodalga fırın (Arçelik), Otomatik Termocycle Sistem (Eppendorf, Mastercycler Gradient), Spektrofotometre (ND 1000), Vorteks (Fisons), pH Metre (Sartorius ve Jenway), Orbital Shaker (Gallenkamp), Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE), Ultra Saf Su Cihazı (AquaMaxUltra), İnkübatör (Nüve cooled, ES110) kullanılmıştır.

Araştırmada ayrıca 6 adet RAPD primerleri (Thermo Fisher Scientific Primers), Sıvı Azot, Kloroform, izopropanol, amonyum asetat, Taq DNA Polymerase (Fermentas EP0402), dNTP Set (Fermentas, R0185), GeneRuler (Fermentas, 50bp DNA Ladder SM0371), Titriplex III, M108421, Tris 108387, CTAB A0805, PVP A2260, Absolü Etanol M100983, Glasial asetik asit M100056, PCR buffer P2192, MgCl₂ M105833, Agaroz HS812, Borik asit M100165, BSA A2153, HCl, NaOH, merkaptotanol, gliserol, bromofenol mavisi, EtBr sarfları kullanıldı. Ayrıca, kimyasallar MERCK ve SIGMA grubundan temin edilmiştir.

7.2. Kullanılan Çözelti ve Solüsyonlar

DNA (2X CTAB) ekstraksiyon tamponu: 1M Tris (pH 8.0), 0.25M EDTA (pH 8.0), 5M NaCl, 5g CTAB (Setil trimetil amonyum bromür), 0.5 ml β-mercaptoethanol (v/v), 4g PVP (w/v).

TE tamponu: 10M Tris-HCl (pH 8.0), 1M EDTA (pH 8.0), Saf su ile miktar tamamlanır.

Amonyum Asetat: 100ml için 0.3854g kullanılır. Taze hazırlanır ve serin ortamda muhafaza edilir.

%70'lik Etil Alkol: 70 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Ethidium Bromür Çözeltisi: 1g için 100 ml distile su ile hazırlanmış ve etrafı alüminyum folyo ile kaplanıp buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Bovine Serum Albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bromfenol Blue Çözeltisi: %0.03 bromfenol blue, 10mM Tris pH 7.6, 60mM EDTA, %60 Gliserol ile hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

1x TAE tamponu: Bu araştırmada kullanılan TAE tamponu 12,1g TrisBase, 2.85ml Glisial Asetik asit, 5ml 0.5M EDTA pH 8 ile 50ml'ye distile su ile tamamlanır. 50x TAE olarak hazırlanmış kullanılırken 1X'e seyreltilmiştir.

Primerlerin Hazırlanması: Kullanılan primerler yönetici firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra çalışmaya uygun olacak şekilde 1: 9 oranında hazırlanmıştır.

EDTA (0.25 M, pH 8.0); 1 litre için 93.05 g EDTA disodyum tuzu, 800 ml saf suya eklenir. Üzerine 10 gr NaOH eklenir.

Tris çözeltisi (pH 8.0); 1 M tris-HCl= 121.1 gr tris/ltr

% 0.7 agaroz çözeltisi (200 ml için); 4ml 50x TAE, 180 ml distile su, 1.4 gr agaroz.

% 1.2 agaroz çözeltisi (200 ml için); 4ml 50x TAE, 180 ml distile su, 2.4 gr agaroz.