MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSTANBUL'DA DAĞILIM GÖSTEREN *Crocus flavus* subsp. *flavus* POPULASYONLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİK VE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUĞBA YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

EŞ DANIŞMAN
Doç. Dr. Ertuğrul FİLİZ

İSTANBUL, 2017

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSTANBUL'DA DAĞILIM GÖSTEREN *Crocus flavus* subsp. *flavus* POPULASYONLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİK VE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUĞBA YILDIRIM
(520110011)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

EŞ DANIŞMAN
Doç. Dr. Ertuğrul FİLİZ

İSTANBUL, 2017

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yardımını esirgemeyen, araştırmalarım sırasında fikir ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım sayın **Prof. Dr. İbrahim İlker Özyiğit'**e ve bu çalışmanın yapılmasında bana destek olan sayın hocam **Doç. Dr. Ertuğrul Filiz**'e teşekkürlerimi sunarım.

Bitki örneklerinin toplanmasında emeği ve desteği olan sayın **Dr. Mustafa KESKİN**'e, bitki örneklerinin teşhisinde emeği ve desteği olan sayın **Dr. Sırrı YÜZBAŞIOĞLU**'na, laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesinde ve tez yazım aşamasında yardımcı olan sayın **Dr. Mehmet Emin URAS**'a ve çalışmalarımda her daim yardımcı olan sayın **Ecem BALCI'**ya teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Bitki toplama ve tez düzenleme sürecinde her daim emeği ve desteği olan sayın **İdris Özmen**'e, tez düzenleme sürecinde desteği olan sayın **Gökçen Yıldırım**'a teşekkür ederim.

Canım aileme sevgilerimle..

Bu çalışma Marmara Üniversitesi BAPKO birimi tarafından bilimsel araştırma projesi olarak (FEN-C-YLP-090217-0055) desteklenmiştir.

Bu çalışmanın bazı verileri aşağıdaki kongrede sözlü sunum olarak sunulmuştur.

I. I. Ozyigit, T. Yildirim, A. Hocaoglu, Some Autecological Characteristics of *Crocus flavus* subsp. *flavus* from Istanbul-Turkey: Plant-Soil Interactions, Researchfora International Conference, Paris, France, June 14, 2017

Eylül, 2017 **Tuğba YILDIRIM**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR.....i
İÇİNDEKİLER..... ii
ÖZET.....iv
ABSTRACT.....v
SEMBOLLER.....vi
KISALTMALAR..... vii
ŞEKİL LİSTESİ.....ix
TABLO LİSTESİ.....xi
1. GİRİŞ.....1
1.1 Bitkinin Genel Özellikleri.....2
1.1.1 Bitkinin Sistematikteki Yeri.....3
1.1.2 Iridaceae Familyasının Genel Özellikleri.....3
1.1.3 *Crocus* Cinsinin Genel Özellikleri.....4
1.1.3.1 *Crocus* Cinsinin Türkiye ve Dünyadaki Dağılımı.....6
1.1.4 *Crocus flavus* Türünün Genel Özellikleri.....7
1.1.5 *Crocus flavus* subsp. *flavus* Alt Türünün Genel Özellikleri.....10
1.2 Moleküler İşaretleyiciler.....14
1.2.1 Basit Sekans Tekrarları Arası Polimorfizm (ISSR).....15
1.2.2 Kloroplast Genomu (cpDNA), *trn*L-*trn*F.....15
1.2.3 Daha Önceki Benzer Çalışmalar.....16
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....23
2.1 Bitki Materyallerinin Toplanması.....23
2.2 DNA İzolasyonu.....26
2.3 PCR Uygulamaları.....29
2.4 Agaroz Jel Elektroforezi.....33
2.5 Veri Analizleri.....35
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....38
3.1 ISSR Verileri.....38
3.2 Filogenetik İlişki Analizleri.....43

3.2.1 *trn*L-*trn*F İntergenik Ara Bölge Dizileri.....43
4. SONUÇ 48
5. KAYNAKLAR 50
6. ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

İSTANBUL'DA DAĞILIM GÖSTEREN *Crocus flavus* subsp. *flavus* POPULASYONLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİK VE FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, İstanbul'da dağılım gösteren *Crocus flavus* subsp. *flavus* popülasyonlarının genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişkilerinin araştırılması ve buna bağlı olarak bitkinin koruma programına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Bu amaçla ISSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak popülasyon ve tüm bireyler bazında genetik çeşitlilik analiz edilmiştir. Ek olarak filogenetik ilişkilerin araştırılması için kloroplast *trn*L - *trn*F intergenik ara bölge dizileri kullanılmıştır. DNA izolasyonu işlemi CTAB izolasyon yöntemiyle yapılmış, daha sonrasında standart moleküler teknikler kullanılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, ISSR moleküler işaretleyicileri ile örnekler arasında %86,89 polimorfizm olduğu gözlenmiştir. ISSR bant verileri kullanılarak gerçekleştirilen PCA analizleri sonucunda bazı popülasyonların diğerlerinden ayrıldığı gözlenmiştir. *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizlerde *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinin Iridaceae familyasının diğer üyeleriyle birlikte heterojen bir filogenetik grup oluşturduğu ve dış grup olarak eklenen diğer bitkilerden etkili bir şekilde ayrıldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak ISSR moleküler işaretleyicileri ve kloroplast *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizilerinin *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinin genetik analizlerinde kullanılabilecek, etkili moleküler araçlar olduğu öne sürülebilir.

Anahtar sözcükler: ISSR, *Crocus*, *trn*L-*trn*F, genetik işaretleyici, filogeni.

Ekim, 2017 **Tuğba YILDIRIM**

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENETIC RELATIONS OF *Crocus flavus* subsp. *flavus* POPULATIONS DISTRIBUTED IN ISTANBUL

In this study, investigation of phylogenetic relations and the genetic diversity of *Crocus flavus* subsp. *flavus* populations distributed in Istanbul, and depending on the results, contribution to conservation program of this plant was aimed. For this aim, genetic diversity was analysed based on the population and each individual by using ISSR molecular markers. Additionally, chloroplast *trn*L - *trn*F intergenic spacer region sequences were used to investigate phylogenetic relations. DNA isolation process was performed through the CTAB isolation method followed by the standard molecular technics were used. Based on the results of ISSR molecular markers, 86,89% polymorphism was observed between the samples. The results of PCA analyses, using ISSR band data showed that some populations were sapareted from the others. According to the phylogenetic analyses, which were performed by using *trn*L - *trn*F intergenic spacer region sequences, *C. flavus* subsp. *flavus* genotypes formed a heterogenous phylogenetic group together with the other members of Iridaceae family, and efficiently separated from the members of other plant families. In conclusion, it can be suggested that ISSR molecular markers and chloroplast *trn*L - *trn*F intergenic spacer sequences are effective molecular tools that can be used in the genetic analyses of *Crocus flavus* subsp. *flavus* genotypes.

Key words: ISSR, *Crocus*, *trn*L-*trn*F, genetic marker, phylogeny.

October, 2017 **Tuğba YILDIRIM**

SEMBOLLER

^{o}C **:** Santigrat derece

% **:** Yüzde

µg **:** Mikrogram

µl **:** Mikrolitre

cm **:** Santimetre

dk **:** Dakika

g/gr **:** Gram

kg **:** Kilogram

km **:** Kilometre

M **:** Molar

m **:** Metre

mg **:** Miligram

ml **:** Mililitre

mm **:** Milimetre

ng **:** Nanogram

sn **:** Saniye

V **:** Volt

KISALTMALAR

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

bp : Baz çifti

cpDNA : Kloroplast DNA'sı

CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP : Deoksinükleosid Trifosfat

ISSR : Inter Simple Sequence Repeats DNA (Basit Sekans Tekrarları Arası Polimorfizmi)

Lok : Lokalite

mtDNA : Mitokondri DNA'sı

nDNA : Nükleer DNA

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PPL : Polimorfizm yüzdesi

RAPD : Random Amplified Polymorfic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

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

Rpm : Revolution Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

ssp/subsp : Alttür

SSR : Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)

TE **:** Tris-Edta

UV **:** Ultraviyole Işınım

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1 Türkiye'deki Kareleme (Grid) Sistemi.....7

Şekil 1.2 *Crocus flavus* türünün dağılımı.....8

Şekil 1.3 *Crocus flavus* subsp. *flavus* alt türünün Türkiye'de dağılımı.....11

Şekil 1.4 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un habitatındaki doğal görünümleri 12

Şekil 1.5 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un herbaryum örneği görünümü.....13

Şekil 2.1 Bitki örneklerinin toplandığı lokaliteler.....24

Şekil 2.2 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un doğal habitatından bir görünüm 25

Şekil 2.3 Örnek toplama çalışmasından bir görünüm.....25

Şekil 2.4 İzolasyon basamakları sırasında kullanılan (A) Nano Q DNA ölçüm cihazı, (B) WiseMix Vortex cihazı, (C) Mikrosantrifüj cihazı, (D) Soğutmalı Mikrosantrifüj cihazı.....28

Şekil 2.5 İzolasyon basamakları sırasında kullanılan Makrosantrifüj cihazı 28

Şekil 2.6 Esco Aeris Termal Döngüleyici, Model G96.....32

Şekil 2.7 PCR basamaklarının uygulanması 32

Şekil 2.8 Jel elektroforezi basamaklarının uygulanması 34

Şekil 2.9 Elektroforez ekipmanı (Power Supply CS-300V omniPAC MIDI).....34

Şekil 2.10 UV Transillüminatörü (WiseUV WUV-L20), Jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat) 35

Şekil 3.1 *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinde ISSR6 primeri ile elde edilen ISSR bantlarının agaroz jeli görüntüsü 39

Şekil 3.2 Nei (1973)'ye göre *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri arasındaki genetik benzerliği gösteren dendrogram 42

Şekil 3.3 *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerine ait MVSP 3.22 yazılımı ile elde edilmiş Principal Component Analysis (PCA) sonuçları 42

Şekil 3.4 *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerine ait *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesi bant görüntüsü 44

Şekil 3.5 *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerine ait olan ve NCBI GenBank veri tabanından alınan *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri ile oluşturulan birleşik filogenetik ağaç 47

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un sistematiği.....3

Tablo 1.2 *Crocus flavus* türünün Türkiye'deki yayılış alanları.....9

Tablo 2.1 Bitki örneklerinin toplandığı bölgeler ve bazı bilgiler.....23

Tablo 2.2 DNA izolasyonunda kullanılan bileşikler.....26

Tablo 2.3 PCR reaksiyonlarında kullanılan karışım.....29

Tablo 2.4 PCR reaksiyonlarında uygulanan işlem basamakları.....30

Tablo 2.5 PCR reaksiyonlarında kullanılan *trn*L-*trn*F moleküler işaretleyicileri ile sekansları.....30

Tablo 2.6 PCR reaksiyonlarında kullanılan ISSR moleküler işaretleyicilerinin nükleotit dizileri.....31

Tablo 2.7 Elektroforezde kullanılan çözeltiler.....33

Tablo 2.8 Filogenetik ağaç kurulurken uygulanan parametreler.....36

Tablo 3.1 ISSR-PCR işleminde kullanılan ISSR primerleri ve DNA bantlarının çeşitli özellikleri.....38

Tablo 3.2 Tüm lokusları kapsayan ISSR bant verilerinin, Popgene 32 yazılımıyla değerlendirilmesi sonucu elde edilen genetik çeşitlilik istatistik verileri..39

Tablo 3.3 Populasyonlara göre, ISSR bant verilerinin, Popgene 32 yazılımıyla değerlendirilmesi sonucu elde edilen genetik çeşitlilik istatistik verileri..40

Tablo 3.4 Nei (1973)'ye göre genetik benzerlik (Üst) ve genetik uzaklık (Alt) değerleri.....41

Tablo 3.5 Bu çalışmada *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinden elde edilen *trn*L - *trn*F intergenik ara bölge dizileri, NCBI GenBank veri tabanı erişim numaraları ve GC içeriği 44

Tablo 3.6 NCBI GenBank veri tabanından elde edilen *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerine ait *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesi ile örtüşen ilk üç dizi.....45

1. GİRİŞ

Türkiye bitki çeşitliliği bakımından dünyada çok önemli bir yere sahiptir. Üç farklı (Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan) coğrafi bitki bölgelerinin kesişim noktasında yer alan ülkemizin bitki çeşitliliği, bu konumun getirdiği farklı iklim koşulları ve coğrafi yapısından kaynaklanmaktadır (Davis, 1985). Türkiye florasında yaklaşık 9000 tohumlu bitki türü bulunurken bu türlerin yaklaşık 3000'i endemiktir. Bu bilgiler ışığında ülkemizin bitki çeşitliliğinin çok zengin olduğu da anlaşılmaktadır. Türkiye'deki endemik bitki oranı yaklaşık %30-35 arasındadır. Yunanistan ve İran'da endemik bitki oranı %20 iken, Avrupa'da %21'dir. Ülkemizdeki üç farklı coğrafik bölgeye göre endemik takson sayısı ise Avrupa-Sibirya bölgesinde 300, Akdeniz bölgesinde 1050 ve İran-Turan bölgesinde 1220 adettir (Haspolat ve ark., 2016).

Soğanlı bitkiler olarak bilinen kormlu, rizomlu ve yumrulu bitkilerin ülkemizdeki bitki çeşitliliği açısından önemi büyüktür (Kravkaz, 2008). Bilimsel olarak geofit olarak bilinen bu bitkiler toprak üstü organlarını kaybetmiştir, toprak altı kısımları süreklidir ve depo organları şeklinde (rizom, soğan, yumru vb.) farklılaşmıştır. *Crocus* gibi geofitlerde tomurcuklar toprağın derinlerindedir (Akman ve Güney, 2011). Biyolojik zenginliğimizin çoğunluğunu oluşturan ve doğal yetişen yabani türler, endüstri ve nüfus artışı nedeniyle habitatlarının bozulması ve bazı türlerinin de neslinin yok olması tehlikesiyle karşı karşıyadır. Ayrıca tıbbi, aromatik ve besin kaynağı olarak kullanılmaları nedeniyle yoğun bir şekilde toplanmaktadır (Kravkaz ve ark., 2006). Geofitler, alkoloid içermeleri nedeniyle ilaç sanayinde ayrı bir öneme sahiptir. Genellikle ilk ve sonbahar aylarında çiçek açmalarından dolayı süs bitkisi olarak da kullanılırlar (Haspolat ve ark., 2016).

Geofitlerin doğadan bilinçsizce toplanmasını önlemek amacıyla "Türkiye'nin Ekonomik Değ er Taş ıyan Geofitleri Üzerinde Taksonomik ve Ekonomik Araş tırmalar" adlı bir proje başlatılmıştır (Haspolat ve ark., 2016). "Doğal Çiçek Soğanları Yönetmeliği"ne göre *Crocus* cinsine ait türler doğadan toplanarak ihracatı yasak olan türlerdendir. Yani *Crocus* cinsine ait türler korunması gereken ve tehlike altında olan türlerdir. Hatta azı taksonlar yok olma tehlikesi altında olan EN (Tehlikede-Endangered) grubunda yer almaktadır (Haspolat, 2011).

Latincede safran sarısı anlamına gelen "crocatus" kelimesinden türemiş olan *Crocus*, Yunanca'da "krokos", Arapça'da "zafaran"dır (Haspolat, 2011). Türkçe çiğdem olarak bilinen *Crocus* cinsine ait bireylerin yaşam alanlarının giderek kısıtlandığı ve yok olduğu bilinmektedir (Kravkaz ve ark., 2006). İstanbul ili başta olmak üzere ülkemizde yeni inşa edilen yollar, artan nüfus ve enerji açığını kapama çalışmaları nedeniyle çoğunlukla endemik olan narin bitkiler tehdit altındadır. *Crocus flavus* Weston subsp. *flavus* alttürü de İstanbul il sınırlarında antropojenik baskıya maruz kalan bir taksondur. Bu amaçla kentte yaşayan insanların bilinçlendirilmesi, farkındalık oluşturulması yararlı olacaktır (Erol ve Şık, 2015). Genetik çeşitlilik bitkilerin yaşamlarını devam ettirmeleri ve değişik çevresel koşullara dayanabilmeleri açışından hayati bir öneme sahiptir. Bu açıdan bakıldığında bu çalışmanın genel amacının İstanbul ilinde dağılım gösteren *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un genetik çeşitlilik seviyesi ve filogenetik ilişkilerinin anlaşılmasına, bu türün doğada sağlıklı yaşamını sürdürebilmesine ve üreme döngüsünün devamının sağlanabilmesine katkı sağlanmasıdır. Bu amaçla, populasyonlarda ISSR moleküler işaretleyici methodu ve *trn*L-F intergenik bölge dizileri kullanılarak genetik çeşitlilik ve filogenetik ilişkilerin daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır.

1.1 Bitkinin Genel Özellikleri

Türkiye'deki geofitler arasında *Crocus* en fazla taksona sahip olan cinstir. Bu cinsin türleri çiçek yapısı açısından çok estetiktir ve bahçelerde süs bitkisi olarak çok değerlidir (Haspolat ve Özzambak, 2013). Avrupa ülkelerinde de park ve bahçe düzenlenmesinde kullanıldığı bilinmektedir (Kravkaz ve ark., 2006). Park ve bahçelerde kullanılmasının bir nedeni de *Crocus* türlerinin kış, ilk ve sonbaharda çiçeklenmesidir. Çiçekler sarı, mor, beyaz, mavi olarak çeşitli renklerde açarlar (Haspolat ve Özzambak, 2013; Haspolat ve ark., 2016).

1.1.1 Bitkinin Sistematikteki Yeri

Çalışmalarda kullandığımız İstanbul'da dağılım gösteren *Crocus flavus* Weston subsp. *flavus* Mathew (*Iridaceae*) türünün sınıflandırmadaki yeri Tablo 1.1'de verilmiştir:

Tablo 1.1 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un sistematiği (Davis, 1984).

Regnum : *Plantae* / Bitkiler
Divisio : *Magnoliophyta* / Kapalı Tohumlular
Classis : *Liliopsida* / Tek Çenekliler
Subclassis: *Liliidae*
Ordo : *Liliales*
Familia : *Iridaceae* / Süsengiller
Subfamilia: *Ixioideae*
Genus : *Crocus* / Çiğdem
Species : *C. flavus*
Subspecies : *C. flavus* Weston *flavus*

1.1.2 Iridaceae Familyasının Genel Özellikleri

Bu familyanın tüm türleri çok yıllık ve otsu bitkiler olup çiçek ve yaprakları mevsimlik çıkar. Bu familyadaki türlerin korm, rizom, yumruya sahip olmalarından dolayı familya çok yıllık özelliktedir (Kravkaz ve ark., 2006).

Yapraklar genellikle yaprak tabanlarının birbirinin üstüne bindiği iki sıralı yaprak dizilişine (equitant) sahiptir (Davis, 1984). "Çiçek rasemus veya panikula durumunda veya nadiren tek, erdiş i, spata tarafından sarılmış tır" (Özdeniz ve Kurt, 2012). Perianth iki sıralı, iç-dış segmentler benzer ya da belirgin derecede farklı, ya da zigomorftur.

Stamenler 3 tane, dış periant segmentlerine oppozittir. Ovaryum alt durumlu olup birçok ovüle sahiptir. Stilus 3 loplu, dalları tam veya bölünmüş, petalimsi veya değildir. Tohumlar küre şeklinden elipsoit (yumurtamsı) veya armut şeklinde, köşeliden basık şekle (yassı) doğru, kanatlı ya da kanatsız, strofiollü veya değildir (Davis, 1984). Meyve lokulusit kapsül tipindedir. Tozlaşma kuşlarla olur (Akman ve Güney, 2011).

Iridaceae familyasının Türkiye'de yayılış gösteren 6 cinsi (*Crocus, Iris, Gladiolus, Romulea, Gynandriris, Hermodactylus*), 91 türü (toplam 159 takson), 66 alttürü bulunmaktadır (Özdeniz ve Kurt, 2012).

Iridaceae familyasının dünyadaki yayılışı daha çok Güney Afrika'nın farklı bölgeleri, Doğu Akdeniz bölgesi ve Tropikal Amerika'dır. "Arap Yarımadası ve Orta Asya'da yayılış göstermemektedir" (Selvi, 2005; Özdeniz ve Kurt, 2012).

1.1.3 *Crocus* Cinsinin Genel Özellikleri

Crocus, korm adı verilen toprak altı organına sahiptir ve bunlar biri büyük diğeri küçük olmak üzere üst üste bulunur (Erol, 2004; Kravkaz, 2008). Kormun şekli yassı, yuvarlak ve yumurtamsı olabilir, ayrıca bol miktarda nişasta içerir (Erol, 2004). Kormların üzerinde kormları örten tunikler mevcuttur ve bu tunikler yaprakların genişlemiş kısımlarından meydana gelir (Kravkaz, 2008). Bazı türlerde korm tabanında halka şeklinde dişli ya da dişsiz yüzükler bulunur. Bazı türlerde ise korm tabanından yükselen kahverengi boyun mevcuttur (Selvi, 2005). *C. flavus* gibi bazı türlerde, yaprakları sararak kalıcı bir boyun oluşturan tunikler üst kısımlarda genişlemesiyle karakteristiktir. Birçok çiğdem türü korm tuniklerinin kendine özgün yapı ve şekline bakılarak teşhis edilebilir (Erol, 2004).

Katafil (yaprak kını) ince, zarımsı, açık kahverengi, beyaz ya da yeşilimsi renkte olup sayıları 3-5 arasındadır. Yapraklar uzun şeritsi, ince, etli ve koyu yeşil rengindedir (Kravkaz ve ark., 2006). Genellikle *Crocus* yapraklarının yaprak ortası boyunca tipik bir gri-beyaz şerit uzanır (Erol, 2004). Yapraklar çiçekler kaybolduktan sonra ortaya çıkar ya da çiçeklerle beraber görülürler. Genellikle sonbaharda çiçeklenen türlerin yaprakları çiçeklenmeden sonra, ilkbaharda çiçeklenen türlerin yaprakları ise çiçeklerle birlikte görülür. *Crocus* yaprakları, korm başına düşen yaprak sayısı, tüylerin olup olmaması,

enine kesitte görünümü gibi ayırt edici karakterlere sahiptir ve bu karakterler sistematik tanımlamada kullanılmaktadır. (Kravkaz, 2008).

Çiçekler ilkbahar (şubat-nisan) veya sonbahar (eylül-aralık) aylarında açar. Çiçekler genelde tek olup tek çiçek durumu görülür. Çiçekler kısa bir toprakaltı sap ucunda, tek ya da çok sayıda bulunur. Her saptan bir çiçek çıkar. Sapın hemen altında zarımsı, beyaz ya da krem renginde brakte ve brakteol bulunur. Bazen bu yapılar bulunmayabilir (Kravkaz, 2008). Brakte, brakteol veya katafilin sistematik özellikleri, brakteolün varlığı yada yokluğu türlerin teşhisi için önemlidir. Periant; ince periant tüpü, 6 tane periant segmenti ve 3 tane stamen içerir (Erol, 2004). *Crocus* cinsinde periant tüpü 3 cm veya üzerindedir (Davis, 1984). Gövde görevi gören ve ovaryumun üstünde yükselen periant tüpü çiçeğin tozlaşmasında rol oynar. Periant tüpünün üstünde yer alan periant boğazı; sarı, beyaz, sülfür rengi ya da periantın geri kalan kısmıyla aynı renkte olabilir. Periant segmentleri şekil ve renkleri açısından cinsler arasında büyük farklılık gösterir (Kravkaz, 2008). Dış periant segmentlerinin arka yüzleri çoğunlukla çizgili, bronz ya da mor renktedir (Erol, 2004). Stilüs 3 dallı ya da daha çok olabilir. Ovaryum toprak altında bulunur (Candan, 2007). Dış periant segmentlerine bitişik olan 3 adet serbest stamen bulunur. Tüm flamentler boyut, renk gibi faydalı olan sistematik karakterlere sahiptir. Anterler sarı, beyaz, siyahımsı-kestane gibi renklerde olabilir ve anter uzunluğu ayırt edici bir karakterdir (Kravkaz, 2008).

Çiğdemlerin çiçekleri genelde kokuludur ve tozlaşma arı, böcek ve güvelerle gerçekleşir. Polenleri çok büyük ve ağır olduğu için rüzgarla tozlaşma ihtimali düşüktür. Çiğdemin döllenme sonrasında oluşan meyvesi kapsül tipi meyvedir. Kapsülün üç lokuluslu olduğu ve her lokulusta iki sıra tohum taşıdığı tespit edilmiştir. Kapsülde oluşan tohumlar sert bir tohum kabuğuyla sarılmıştır ve tohumlar siyah ya da koyu kahverengidir. Tohumların çapları ve şekilleri çok değişiklik gösterebilir. Bazı türlerin olgun kapsülleri skapus aracılığıyla toprak yüzeyine çıkarken bazı türlerinki toprak seviyesindedir. Kapsülün yarılmasıyla açılan tohumlar karıncalar tarafından taşınır. İlk ve sonbaharda çiçek açan türlerde meyve yaza doğru ve aynı zamanda olgunlaşır (Erol, 2004; Kravkaz ve ark., 2006).

Crocus L., (*Iridaceae*), yurdumuzda yayılış gösteren Ixioideae alt familyasının üç adet cinsinden biridir. Diğer iki cins *Gladiolus* L. ve *Romulea* Maratti'dır (Haspolat ve

Özzambak, 2013). Türkiye'de yayılış gösteren *Crocus* cinsi takson sayısı bakımından en zengin geofit gruptur (Erol ve Şık, 2015). Bu cins, batı Avrupa ve kuzey-batı Afrika'dan batı Çin'e dağılan yaklaşık 200 tanınmış türden oluşur ve Balkan Yarımadası ile Türkiye'nin tür çeşitliliğinin merkezi olduğunu işaret eder (Yüzbaşıoğlu, 2017). Özellikle son yıllarda, yaklaşık 140 takson barındıran Türkiye'den çok sayıda yeni takson tespit edilmiştir (Yüzbaşıoğlu ve Celep, 2016). Türkiye, bu cins için önemli bir dağılım merkezidir ve 108 endemik takson ile temsil edilmektedir (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2015).

Crocus türleri sıklıkla çayırlık ve fundalıklarda, ormanlık alanlarda kendiliğinden yetişirler. Yarı gölge ve aydınlık yerleri ayrıca ılıman iklimleri tercih ederler. Toprak istekleri bakımından kumlu, drenajı iyi, yaprak çürüğü bol ve organik madde bakımından zengin olan nemli toprakları tercih ederler. Su istekleri bakımından yağış miktarının iyi olması gerekir ve soğuğa karşı dayanıklı türlerdir. Bu cinsin pH tercih aralığı 6-7 arasındadır (Haspolat ve Özzambak, 2013).

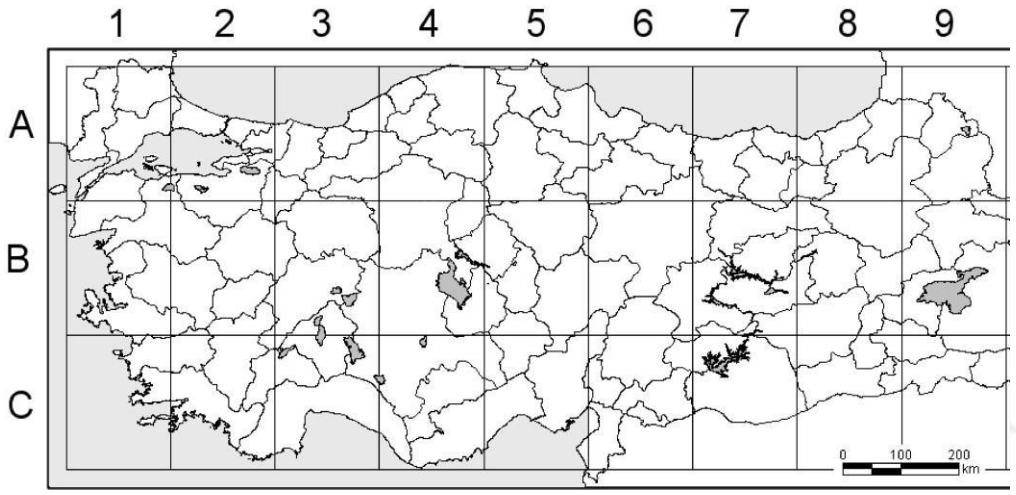
1.1.3.1 *Crocus* Cinsinin Türkiye ve Dünyadaki Dağılımı

"Crocus L. (Çiğdem), Iridaceae familyası, Iridoideae alt familyası, Croceae oymağının bir cinsidir." Daha önceki çalışmalarda tanımlanmış 90 kadar tür içerdiği bilinse de farklı araştırıcılar tarafından son zamanlarda yapılan çalışmalar ile 160 kadar hatta daha fazla sayıda olduğu rapor edilmiştir (Gedik, 2016).

Çiğdemler Orta Avrupa'dan Çin'in batısına kadar, Kuzey Afrika'yı da kapsayan bölgede yayılış göstermektedir. En fazla tür çeşitliliği Güney Batı Türkiye, Balkanlar ve Yunanistan'da görülmüştür. Dünyada bulunan *Crocus* türü tümüyle Kuzey Yarım Kürede dağılım gösterir, çoğunlukla ise Akdeniz'de ve ön Asya'da yetiştiği görülmüştür. "*Crocus* türleri, batıda Portekiz ve Fas, doğuda Kırgızistan ve Batı Çin'in Senyang Eyaleti, Moğolistan'ın Ala Tau ve Tien Şan dağlarını içine alan bölgede yayılış göstermektedir. Tanımlanmış türlerin çoğu Balkanlar ve Türkiye'dedir. Bu bölgelerin dışına çıkıldıkça takson sayısı hızla azalmaktadır. Örneğin İber yarımadasından yalnız 4, Hazar Denizi çevresinden ise 3 tür bilinmektedir" (Haspolat, 2011; Gedik, 2016).

Ülkemiz *Crocus* cinsi bakımından gen merkezi sayılabilecek çeşitliliğe sahip bir ülkedir. Türkiye'nin güneybatı bölgesi *Crocus* cinsi açısından çeşitliliğin en yüksek olduğu merkezdir. Türkiye'nin her bölgesinde dağınık halde *Crocus* türüne rastlanmaktadır. Son yıllarda yeni taksonlar tespit edilmiş ve Türkiye'deki takson sayısı yaklaşık 140 civarına yükselmiştir (Haspolat ve Özzambak, 2013; Yüzbaşıoğlu ve Celep, 2016).

Türkiye'de doğal olarak yetişen çiğdem türlerinin bulundukları yerlere göre dağılımı Şekil 1.1 de verilen Grid Sistemine göre yapılmaktadır (Davis, 1985).



Şekil 1.1 Türkiye'deki Kareleme (Grid) Sistemi

1.1.4 *Crocus flavus* Türünün Genel Özellikleri

Korm tunik zarsı, tabanda kalın paralel fibrillere ayrılmış; katafil sert, korm tepesinde yaşlı katafillerin oluşturduğu uzun kahverengi bir boyun gibi devam eder. Yapraklar genelde dik, her soğanda 4 ya da 8 tane, synanthous, 2,5-4 mm genişliğindedir. Profil bulunmaz. Brakteol mevcut, brakteden daha dar ve doğrusal, daha geniş olan brakte ile kaplıdır. Periant boğazı tüysüz veya tüylü, segmentler 1,5-3,5 ile 0,4-1,2 cm, yassıdan subakuta, sarıdan turuncu-sarıya, periant tüpü nadiren kahverengi şeritli olarak gözlenmiştir. Filamentler 3-7 mm; sarı, tüylü veya tüysüz; anterler 0,8-1,5 mm, sarıdır. Stilus 3 ya da daha fazla, sarıdan turuncuya kollara ayrılmıştır. Tohumlar küresel ve

kanatlıdır. Kromozom sayısı 2n=8 'dir. Çiçeklenme zamanı; mart-nisan aylarıdır. Ormanlık, ağaçlık alanlar, maki, çalılık ve çayırlarda yayılış gösterirler. Deniz seviyesinden 1200 m yükseklikte dağılırlar (Davis, 1984).

Crocus flavus subsp. *flavus* alt türünün dağılımı Yunanistan, eski Yugoslavya, Bulgaristan, Romanya ve Kuzey Batı Türkiye olarak belirtilmiştir (Saxena, 2014). *Crocus flavus* türünün dağılımı Şekil 1.2 de verilmiştir.



Şekil 1.2 *Crocus flavus* türünün dağılımı **(**Innes, 1985).

Şekil 1.1 deki kareleme sistemi esas alınarak *Crocus flavus* türünün Türkiye'deki yayılış alanları yer isimleri ile birlikte Tablo 1.2 de verilmiştir (Davis, 1984; Özhatay ve ark., 2013; Saxena, 2014; Yüzbaşıoğlu ve Özhatay, 2014).

Tablo 1.2 *Crocus flavus* türünün Türkiye'deki yayılış alanları

C. *flavus* Weston

subsp. *fIavus*	A1(E) Çanakkale, Edirne, Tekirdağ , Kırklareli, A1(A) Çanakkale, A2(A) İ stanbul, Bursa, A2 Yalova, B1 Çanakkale
subsp. *dissectus* *****endemik	B1 Balıkesir, Kütahya, B2 Kütahya, Balıkesir, B3 Eskiş ehir, C2 Denizli
subsp. *sarichinarensis* *****endemik	C2 Antalya, C3 Antalya

Bu türün üç alt türü bulunmaktadır. *C. flavus* Weston *flavus, C. flavus* Weston *dissectus* ve *C. flavus* Weston *sarichinarensis* Ruksans. *Dissectus* alttürü stilüsünün basit 3 dallı olmaması, birkaç ince dala ayrılması ve daha küçük kapsüllere sahip olmasıyla *flavus* alt türünden ayırt edilir. Ayrıca *dissectus* alt türü *flavus* alt türüne göre genelde daha küçük tohum ve daha küçük çiçek bulundurmasıyla ayırt edilebilir. Bununla birlikte bu iki taksonun toprak altı kısmındaki periant tüp uzunlukları karşılaştırıldığında, *dissectus* alt türünün *flavus* alt türünden daha erken meyve verdiği söylenebilir. *Sarichinarensis* alt türünün çiçeklenme döneminde bitki boyundan daha uzun olan yaprakları diğer türlerden daha incedir. Subsp. *flavus* ve *dissectus* alt türlerinin çiçekleri koyu sarı veya turuncu, sarı-turuncu renkte iken subsp. *sarichinarensis* alt türün çiçekleri çok daha küçük, kapalı beyaz, bej, açık veya koyu sarı renktedir. *Sarichinarensis* alt türü subsp. *dissectus* ile benzerlik gösterir fakat subsp. *dissectus* çiçekleri tamamen sarı renktedir ve dış yüzeylerinde herhangi bir çizgi yoktur (Saxena, 2014; Candan, 2015).

Sarichinarensis alt türü subsp. *antalyensis* (çiçekler beyaz renkte) ile de benzerlik gösterir. *Sarichinarensis* alt türü *C. antalyensis* türünün dış çiçekleri ile aynı, kahve-bordo çizgili ya da açık benekli arasındadır (Saxena, 2014).

Dissectus alt türünün stilusu *C.* olivieri türüyle daha yakın benzerlik gösterir. Buna rağmen, korm tepesinde kahverengi bir boyun devam etmez, yaprak genişliği daha az,

tohumlar daha çok küresel ve kanatlıdan ziyade uzunca ve kanatsız olup farklı kromozom sayısına sahiptir (Davis, 1984).

C. flavus Weston türünün kormu yaşlı katafillerin meydana getirdiği uzun ve kahverengi boyun ile ayırt edilir. Bu türün gerçek yaprak sayısı bir korm için 4-8 arasındadır. Bu türde brakte ve brakteollerin eşit büyüklükte olmadığı bilinmektedir, brakteoller daha ince ve daha dardır, genellikle brakte ile de örtülüdür. *C. olivieri* Gay türünde de stilüs 6 ya da daha fazla dala ayrılır ancak *C. flavus* Weston türünün alt türleri morfolojik ve sitolojik bazı karakterleri ile ayrılırlar. *C. olivieri* Gay türünde gerçek yaprak sayısı bir korm için 1-4 arasındadır. Bu türün brakte ve brakteolleri eşit ya da hemen hemen eşittir. Bir başka fark da *C. olivieri* Gay ve *C. flavus* Weston türlerinin tohumları arasında görülür. *C. olivieri* Gay türünün tohumları uzun iken *C. flavus* Weston türünün tohumları kanat benzeri rafe ile karakteristiktir (Candan, 2007).

Bu türün (*C. flavus*) çiçek renkleri beyazdan krem-sarıya kadar çeşitlilik gösterir ve dış kısımlarında bazen mavi, mor, yeşil veya kahverengimsi çizgiler bulunabilir. Genellikle iyi tanınan bu tür uzun zamandır bahçe bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Candan, 2007).

1.1.5 *Crocus flavus* subsp. *flavus* Alt Türünün Genel Özellikleri

Bu taksonda korm 1-2,5 cm çapında, yassılmış küreseldir. Korm tuniği zarsı, tabana doğru belirgin fibrillere ayrılır, kormun tepe kısmından yukarı doğru bir boyun gibi devam eder. Korm tuniği tabanda diş benzeri çıkıntılar içeren birkaç yatay halka içerir (Özdemir ve ark., 2006; Candan, 2015).

Yapraklar 4-8 tane, genelde 5 tane, 10-23 cm boyunda ve 0,9-1,4 mm genişliğindedir. Yapraklarda belirgin bir beyaz orta şerit bulunur. Grimsi yeşil ve tüylü olan yapraklar çiçeklenme döneminde çiçeklerden daha uzun veya daha kısa olabilir (Özdemir ve ark., 2006; Candan, 2015).

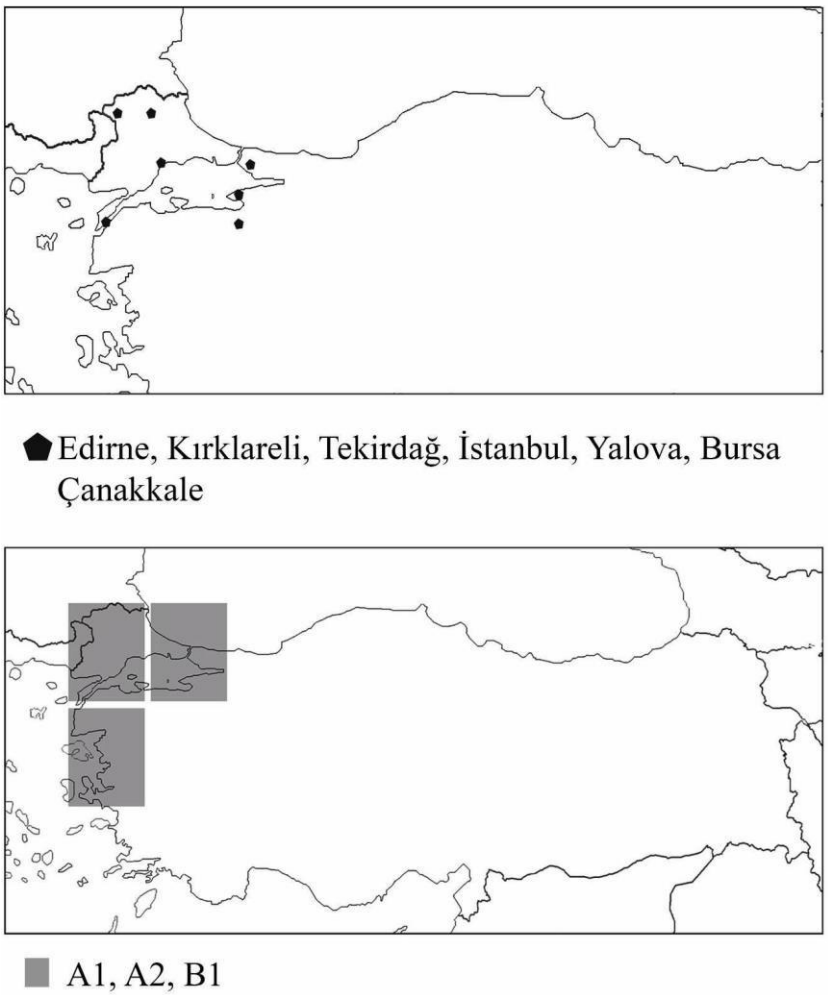
Çiçekler genelde 1 bazen 2 tane, sarımsı-turuncudur. Periant tüpü soluk sarımsı turuncu, çiçeklenme döneminde toprak altında kalan kısmı ise (1)1,3-4,5(6,5) cm uzunluğundadır. Stilus 3 ince veya geniş dallara ayrılmış, sarımsı turuncu, turuncu, nadiren kırmızı, 10-13 mm boyutunda ve stamenlerden daha kısadır. Meyve lokulusid

kapsül tipi, 12-16 mm boyutundadır. Tohum açık kiremit rengi-kahverengi, 1,8-2,3x3,3-4,4 mm boyutundadır (Özdemir ve ark., 2006; Candan, 2015).

Çiçeklenme dönemi: Şubat-nisan ayları (Saxena, 2014).

Yetiştiği ortam: Orman açıklıkları, ağaçlık alanlar, taşlık araziler, çayırlık ve makilik alanlarda genellikle *Verbascum* sp. ve *Sarcopoterium* sp. ile birlikte (Candan, 2007).

C. flavus subsp. *flavus* alt türünün Türkiye'deki dağılımı Kuzey ve Batı Anadolu'da; Çanakkale, Edirne, Tekirdağ: Hayrabolu'ya 30 km Çanakkale: Kurudağ, 350 m İstanbul: Aydos, Bursa: Uludağ, Çanakkale: Truva, Kurşunlu Tepe (Davis, 1984).



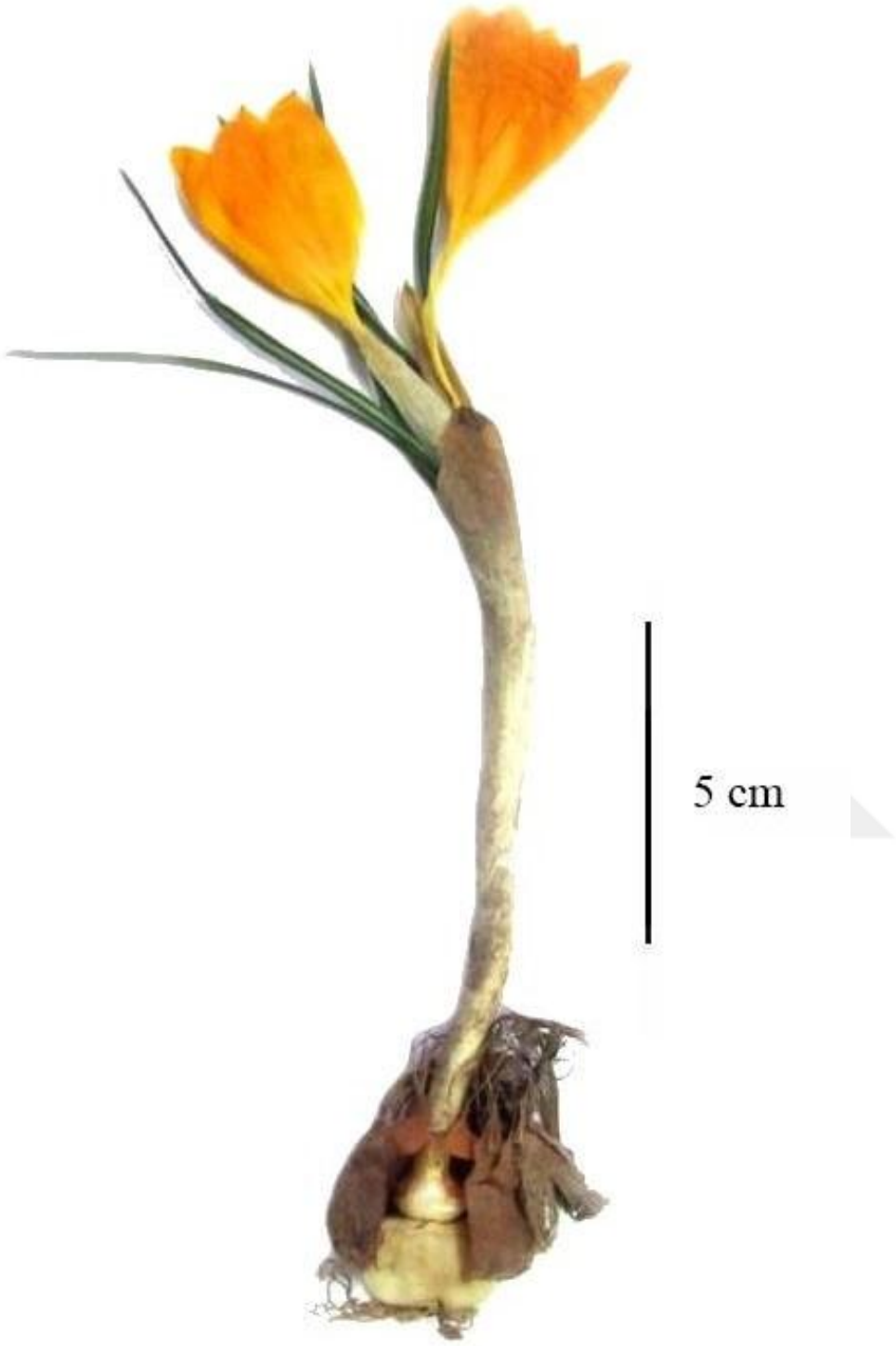
Şekil 1.3 *Crocus flavus* subsp. *flavus* alt türünün Türkiye'de dağılımı (Davis, 1984; Özhatay ve ark., 2013; Yüzbaşıoğlu ve Özhatay, 2014).

Daha önce gerçekleştirdiğimiz bir çalışma sonucunda bu taksonun üyelerinin killi tınlı, tınlı; orta-hafif tuzlu, orta-hafif asidik, çok az miktarda kireçli, yüksek oranda organik madde içerikli, orta ya da yüksek oranda N, P, K içerikli, yeterli miktarda Mg, Ca, Fe, Zn, Cu ve Mn içerikli toprağı tercih ettiği görülmüştür.





Şekil 1.4 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un habitatındaki doğal görünümleri



Şekil 1.5 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un herbaryum örneği görünümü

1.2 Moleküler İşaretleyiciler

Bitkilerde genetik çeşitliliğin belirlenmesinde morfolojik, sitolojik veya biyokimyasal işaretleyicilerden faydalanılmış olunsa da araştırmacılar günümüzde DNA işaretleyicileri ile çalışmaya ağırlık vermiştir ve DNA teknolojisi oldukça gelişmiştir. DNA işaretleyicilerinin kullanım alanı oldukça geniş olmasına karşın daha çok genetik çeşitlilik çalışmalarında ve populasyon tanımlanmasında kullanılmaktadır (Gedik, 2016).

"Moleküler işaretleyiciler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. Moleküler işaretleyici; genetik işaretleyicilerin DNA tabanlı tipini oluşturduklarından, DNA işaretleyicileri olarak da bilinirler" (Yorgancılar ve ark., 2015).

DNA işaretleyicileri diğer yöntemlere göre daha ucuza mal olması, genetik farklılıkları ortaya çıkarabilmede yeterli olması ve çevre şartlarından kolay kolay etkilenmemesi nedeniyle daha verimli ve uygun bir seçenektir. PCR (polimer zincir reaksiyonu)'ın bulunmasından sonra bu işaretleyiciler ile filogenetik analizler, genetik haritalama, genetik çeşitlilik, gen etiketleme, bitki ıslahı, tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi gibi çalışmalar kolaylaşmış ve yaygınlaşmıştır. Son yıllarda küresel düzeyde tehlike arz eden iklimsel değişikliklere bitkilerin verdiği cevaplar ve bunların araştırılmasında da moleküler işaretleyicilerden etkin bir şekilde yararlanılmaktadır (Filiz ve Koç, 2011; Genç, 2017).

Moleküler işaretleyiciler kullanılan yöntem bakımından Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı İşaretleyiciler ve Hibridizasyona Dayalı İşaretleyiciler olarak iki gruba ayrılabilir. PCR tabanlı işaretleyicilere örnek olarak; SSR (Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler veya Mikrosatelitler), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA/Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) verilebilir. Hibridizasyona dayalı işaretleyicilere örnek olarak ise; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi) verilebilir (Yorgancılar ve ark., 2015).

1.2.1 Basit Sekans Tekrarları Arası Polimorfizm (ISSR)

ISSR maliyeti düşük, polimorfizm oranı ve verimliliği yüksek olan, dominant ve PCR'a dayalı bir tekniktir. ISSR yöntemi kolay uygulanabilmesi ve kullanımının hızlı olması nedeniyle tercih edilmektedir. RAPD işaretleyicilerinin üretkenliğinin düşük olması, AFLP işaretleyicilerinin maliyetinin yüksek olması ve SSR işaretleyicilerinin primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisi gerektirmesi çalışmalarda kısıtlamalara yol açmaktadır. ISSR işaretleyicileri ise bu sorunların çözümünde birçoğunun üstesinden gelen önemli bir tekniktir (Yorgancılar ve ark., 2015; Öztürk, 2017).

ISSR tekniğinde, ikili, üçlü, dörtlü ve beşli nükleotit olarak tekrarlanan yapıda primer kullanılır, iki mikrosatellit arası bölge bu primerlerle çoğaltılır ve elde edilen PCR ürünleri jel elektroforezinde yürütülerek belirlenir. ISSR yönteminde dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilmesi avantajlarından biridir. ISSR yöntemi yüksek polimorfizm ve verimlilik göstermesi nedeniyle gen haritalama, genetik benzerlik ve taksonomi çalışmalarında başarıyla uygulanabilir (Filiz ve Koç, 2011).

1.2.2 Kloroplast Genomu (cpDNA), *trn*L – *trn*F

Bitkilerde DNA dizileme çalışmaları için kloroplast (cpDNA), çekirdek (nDNA) ve mitokondri (mtDNA) DNA'ları kullanılabilir. Kloroplast DNA çekirdek DNA'sına göre daha yavaş değişim gösterir. Kloroplast DNA'sının haploid olması, yapısal kararlılığı ve rekombinant olmaması gibi özelliklerinden dolayı da filogenetik çalışmalarda tercih edilmektedir (Gören, 2011; Güvendiren, 2015).

Tür içi çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan bölgeler, çekirdek DNA'sı üzerinde bulunan iç transkribe olan boşluklar (ITS), kloroplast DNA'sı üzerinde bulunan genler arası boşluklar (*trn*L-F intergenik ara bölge) ve protein kodlayan (*ndh*F) bölgeler olabilir. Bu tür çalışmalarda gDNA ITS, cpDNA *trn*L-F intergenik ara bölgesi ve *ndh*F protein kodlayan bölge özel primerleri ve PCR tekniği ile çoğaltılıp ve dizilenip taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenebilir (Gören, 2011).

*trn*L-F intergenik ara bölgesi, cpDNA üzerinde bulunan genler arası bir boşluktur. *trn*L (UAA) 3' eksonu ve *trn*F (GAA) geni arasında yer alır. Kloroplast genomunun kodlama yapmayan bölgelerindendir ve filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Genler arası boşluk çok kolayca çoğaltılıp dizilenebilmektedir. Monokotil ve dikotillerde *trn*L-*trn*F boşluğunun nükleotid sayısı 120-350 bp arasında değişmektedir (Gören, 2011).

1.2.3 Daha Önceki Benzer Çalışmalar

Singh ve ark. (2017), bu çalışmada iki adet *psb*A-*trn*H ve *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgeleri, *Gladiolus* çeşitleri arasındaki nükleotit çeşitliliği ve filogenetik ilişkileri incelemek üzere analiz edilmiştir. Bu çalışmada *Gladiolus* ve ilgili taxa benzeri *Babiana, Chasmanthe, Crocus, Iris, Moraea, Sisyrinchium, Sparaxis* ve iki grup (*Hymenocallis littoralis* ve *Asphodeline lutea*) üzerinde *psb*A-*trn*H ve *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgeleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, Iridoideae alt familyasında, Ixioideae ve Crocoideae alt familyalarına sahip kardeş soylarının olduğunu göstermişlerdir.

Haspolat ve ark. (2016), 1964 yılından beri sistemli olarak yürütülen Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde (ETAE) 'Süs Bitkileri Genetik Kaynakları Projesi' çalışmalarını yürütmüşler. Tohum, herbaryum ve bazı vejetatif materyal örnekleri toplanarak muhafaza altına alınmış, tanımlama ve çoğaltma çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak ülkemizin farklı yörelerinde dağılım gösteren süs bitkileri genetik kaynaklarının korunmasında farklı stratejilerin belirlenerek uygulamaya aktarılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Gedik (2016), yapılan bu doktora tez çalışmasını *Crocus sativus* (safran) için SSR markörlerini geliştirmek ve bu markörlerin safranın yakın yabani akrabalarına aktarılabilirliğini araştırmak amacıyla yürütmüştür. Safranbolu bölgesinden toplanmış safran genotipine ait DNA kullanılarak farklı tekrar motifleriyle zenginleştirilmiş dört adet genomik kütüphaneden toplam 528 adet klon sekanslanmış, 350'sinde (%66,3) tekrar motifi belirlenmiş ve 235 adet (%67,1) klon için SSR primer çifti dizayn edilmiştir. *Crocus* serisine ait taksonlarda yapılan filogenetik analiz sonucunda, kültürü yapılan safran genotiplerine en yakın yabani türün *C. cartwrightianus* olduğu belirlenmiştir.

Villa ve ark. (2016), bu çalışmada *Crocus sativus* (safran)'u akraba türlerden ayırmak ve safranın özgünlüğünü değerlendirmek için üç DNA-barkod lokusunu, yani ITS1, ITS2 ve matK'yi moleküler işaretleyici olarak kullanmışlar. Farklı *Crocus* spp'sini ayırt edebilmek için, yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi ile gerçek zamanlı PCR testi kullanmışlar. Genomik araçların, özellikle DNA mini-barkodlarının HRM analizi ile birleştirilmesinin, safran kimlik doğrulaması bakımından basit, hızlı ve güvenilir yöntemler sağlayabileceğini ortaya koymuşlardır.

Khansarinejad ve ark. (2015-a), çalışmalarında iki yabani İran *Crocus* türü (*Crocus speciosus* ve *Crocus cancellathus*), sırasıyla 250 ve 25 bitki örneğinde 16 morfolojik karakter ve 13 ISSR primeri kullanarak incelemişler. On üç ISSR primeri yüksek derecede polimorfizm üretmiş (% 94,46). Elde edilen sonuçların, iki çalışma türüne ait bitki örneklerinin yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ve ISSR analizinin *Crocus* türlerinin genetik çeşitliliğini değerlendirmede uygun bir teknik olduğunu belirtmişlerdir.

Khansarinejad ve ark. (2015-b), bu çalışmada üç türün (*C. speciosus*, *C. cancellatus* ve *C. sativus*) genetik çeşitliliğini ISSR ve RAPD moleküler işaretleyicileri kullanarak değerlendirmişler. Bu amaçla 19 RAPD primeri seçilmiş ve toplamda 261 DNA lokusu polimorfik bulunmuş, 13 ISSR primeri seçilmiş ve 153'ü polimorfik olan 161 DNA parçası elde edilmiştir. Mantel testine dayanarak, RAPD ve ISSR işaretleyicileri benzerlik matris/dizeyleri arasında belirgin ilişki bulunduğu belirtilmiştir.

Larsen ve ark. (2015), yapılan bu çalışmada türler arası genetik varyasyonu, *C. naqabensis* hariç serideki tüm türlerde incelemiştir. Üç Yunanistan endemik türü olan *C. cartwrightianus*, *C. hadriaticus* ve *C. oreocreticus*'da tür içi genetik ve morfolojik varyasyon dikkate alınmış, AFLP ve SSR analizlerine dayanarak sırasıyla 94 ve 233 genotipi içeren genetik varyasyon değerlendirilmiştir. Özel olarak incelenen üç türde bulunan geniş tür içi varyasyonun, gelecekteki ekolojik dalgalanmaları karşılama potansiyeline sahip dinamik nüfus yapılarını yansıttığı belirtilmiştir.

Harpke ve ark. (2015), bu çalışmada taksonomik açıdan karmaşık yapıdaki ve karyotip değişkenliği ile karakterize edilmiş *Crocus* serisi *Verni* grubunun taksonomisini açıklığa kavuşturmak amacıyla, morfolojik (on iki karakter), moleküler (kloroplast DNA: *trn*L-*trn*F, *ndh*F; nükleer DNA: ITS, *pCOSAt103*) ve karyolojik analizleri birleştirmişler. *C. vernus* olarak bilinen takson için, analizlerin beş türe ayrılmasını önermişler. Çalışma sonucunda sonbaharda çiçek açan *C. longiflorus* ve *C. baytopiorum* hariç olmak üzere *Verni* serisinin yakın zamanda sınırlandırıldığını belirtmişlerdir.

Mir ve ark. (2015), bu çalışmada morfolojik olarak 31 farklı seçimi yapılmış *C. sativus* (safran) ekini kullanmış ve SSR, ISSR, RAPD işaretleyicileri ile moleküler karakterizasyonlarını yapmışlardır. RAPD ve ISSR işaretleyicileri önemli farklılıklar göstermiş, SSR göstergeleri ise seçilen klonlar arasında herhangi bir farklılık ortaya koymamış. Çalışmanın, daha fazla mahsul geliştirme programı için daha iyi karakteristik özelliklere sahip klonları tanımlamada yeterli bilgi sağladığı belirtilmiştir.

Erol ve ark. (2014), bu çalışmada Türkiye ve Yunanistan'da çeşitli lokasyonlardan toplanan *Crocus* türleri arasındaki yüksek seviyede polimorfizmi tanımlamak için AFLP analizini kullanmışlar ve bu yapısal analiz ile yeniden yapılandırılmış 2 populasyon elde etmişler. Ulaşılan bulguların farklı *Crocus* genotipleri arasındaki ilişkilere yeni bakış açısı getirmekte olduğunu belirtmiş ve AFLP analizinin *Crocus* çeşitlilik çalışmaları için yararlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Harpke ve ark. (2014), bu çalışmada son zamanlardaki filogenetik analizlerin *Crocus* cinsi içerisindeki birçok kıtalararası ünitenin parafiletik veya polifiletik olduğunu kanıtladığını belirtmişler. Monofiletik bir *Crocus* serisi *Reticulati*'nin türleri için filogenetik, morfometrik, coğrafi ve nomenklatürel veriler sunmuşlar. *Reticulati* serisinde 2 adet grup net olarak ayrılmış, coğrafi olarak tanımlanmış tür grupları ile filogenilerini sonuçlandırmışlardır.

Nemati ve ark. (2014), bu çalışmada dünyanın en pahalı baharatı olan ayrıca anti-kanser özelliği bulunan *C. sativus* (safran)'un orijinal yaşam alanının İran olduğunu ve ihracatında önemli bir kaynak olduğunu belirtmişler. İran kökenli *Crocus* ekotiplerinde moleküler değişkenliklerini değerlendirmek için 27 mikrosatelit işaretleyici kullanılmış ve

38 İran kökenli 29 yabani safran değerlendirilmiş. Analizlerin sonucunda, coğrafi kökenlerine bakılmaksızın iki ana grup ve beş alt grup ortaya konmuştur. Ayrıca İran kökenli *C. sativus*'ta geniş çapta genetik çeşitlilik gözlenmiştir.

Palmero ve ark. (2014), bu çalışmada *C. Sativus*'un yer altı organı olan kormunun mantar, bakteri, nematod ve virüslerin yol açtığı hastalıklara duyarlı olduğunu ve *F. oxysporum*'un safrandaki en yıkıcı hastalık olduğunu belirtilmişler. Bu çalışmada safranın *Crocus vernus, Gladiolus* ve *Narcissus* gibi Iridaceae'nin bazı üyeleriyle patojenite testleri kullanılarak ilişkilerini araştırmışlar; *F. oxysporum*'un farklı patojen izolatlarının ISSR tarafından ayırt edip edemeyeceğini belirlemişler ve bu patojenlerin bazı izolatları arasındaki genetik ilişkileri ve değişkenliği analiz etmişlerdir.

Gismondi ve ark. (2013), bu çalışmada *Crocus sativus* L.'nin kökeni henüz netleşmemiş steril bir türe (3n) sahip olduğunu belirtmişler. Birçok morfolojik çalışma, diğer *Crocus* örneklerinin, özellikle de *C. thomasii, C. hadriaticus* ve *C. cartwrightianus*'un evriminden veya melezleşmesinden kaynaklanacağı teorisini desteklediğini belirtmişler. DNA barkod tekniğinin uygulanmasıyla, farklı *Crocus* türleri genomlarını analiz etmiş ve bu cinsin filogenisinin bazı yönlerini kısmen aydınlatmışlardır.

Harpke ve ark. (2013), bu çalışmada kloroplast *trn*L-F bölgesi, ITS bölgesi ve *pCOSAt103* nükleer tek kopyalı geninin bir kısmını kullanarak *Crocus* cinsi içindeki filogenetik ilişkileri ve kromozom sayı değişimini açıklığa kavuşturmayı amaçlamışlar. Bu iki analiz sonucuna göre *Romulea* türleri dış grup olarak dahil edilmiştir. ITS ve *trn*L-F intergenik ara bölge verilerinin filogenetik analizi sonuçlanmış ve cinsin 15 serisinden sekizinin monofil olduğu sonucuna varılmıştır. Yakından ilişkili alt türlerden olduğu düşünülen *C. biflorus* grubunun filogenetik ağaçta üç büyük soydan meydana gelen taksonla polifiletik olduğunu saptamışlardır. Kromozom sayılarının evriminin, filogenetik ağaç boyunca yeniden yapılandırılmasının kısmen çelişkili sonuçlara ulaştığını belirtmişlerdir.

Nemati ve ark. (2012), bu çalışmada 12 yeni polimorfik mikrosatellit lokus geliştirmiş ve ekonomik olarak zenginleştirilmiş bu *Crocus sativus* genomik kütüphanesinde, bu ekonomik ve tıbben önemli türlerin populasyonunu ve koruma genetiğini inceleyerek karakterize etmişler. Mikrosatellit lokusları, FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats) methodu kullanarak izole etmişler. Burada bildirilen mikrosatellit belirteçlerinin, genetik çeşitliliği değerlendirmek için yararlı olacağı ve muhtemelen işaretleyici yardımlı ıslah programlarında, germplazm analizinde ve varietal tanımlamada kullanılmak için ideal bir kaynak olarak hizmet edeceğini belirtmişlerdir.

Erol ve ark. (2011), bu çalışmada Türkiye'ye özgü soğanlı bir bitki olan *Crocus antalyensis* B. Mathew taksonları arasındaki genetik çeşitliliği saptamak için AFLP işaretleyici sistemi kullanmışlar. Türkiye'deki değişik yerlerden toplanan *C. antalyensis* örnekleri arasında yüksek düzeyde bir genetik varyasyonun mevcut olduğunu belirtmişler. Ayrıca *C. antalyensis* alt türlerinin genetik olarak akrabası olan *Crocus flavus* subsp. dissectus Baytop & B. Mathew' dan farklı olduğunu gözlemlemişlerdir. Son olarak Türkiye'nin güneyinden *C. antalyensis* B. Mathew' un yeni bir alt türünü tanımlamışlardır.

Coşkun ve ark. (2010), bu çalışmada 15 *Crocus* taksonu arasındaki akrabalık ilişkilerini analiz etmişler. Elde edilen verilerin çoğunlukla önceden yapılmış olan seksiyonel ve serilere ait sonuçlarla uyuşmamış olduğu görülmüştür. Bu çalış madaki en ilgi çekici sonucun önceki çalış malarda, *Crocus* seksiyonunda gösterilen *Crocus pallasii'* nin bu çalış mada *Reticulati* serisinin *Nudiscapus* seksiyonundan *C. cancellatus* ile kardeş grup özelliğ i göstermiş olduğu vurgulanmıştır.

Moraga ve ark. (2010), bu çalışmada ISSR ve HPLC-ESI-MS analizlerini *C. cartwrightianus cv. albus*'un taksonomik pozisyonunu açıklığa kavuşturmak için kullanmışlar. 12 ISSR primeri kullanılarak *C. sativus* ve *C. cartwrightianus cv. albus* arasında hiçbir farklılık bulunamamıştır. Elde edilen sonuçlara göre *C. cartwrightianus cv. albus*'un, *C. sativus* ile *C. cartwrightianus*'a göre daha yakın akraba olduğu ve albinik safran olabileceği belirtilmiştir.

Rubio-Moraga ve ark. (2009), bu çalışmanın amacının *C. sativus*' da bulunan fenotipik farklılıkların moleküler analizlerle desteklenip desteklenmediğini belirlemek olduğunu belirtmişler ve otuz primeri RAPD analizinde kullanmışlar, kırk sekiz primer ISSR yöntemi ile taranmış ve tekrar motifli dizileri çevreleyen bir mikrosatellit kitaplığından türetilen on beş primer on bir farklı ülkeden kırk üç *C. sativus* izolatlarını ve bir *C. kotschyanus* izolatını dış grup olarak kullanmışlar. Sonuç olarak bu verilerin, *C. sativus*' un monomorfik bir tür olduğunu önerdiğini ve safranda moleküler işaretleyicileri bulmak için genom diziliminin gerekli olduğunu vurgulamışlardır.

Seberg ve Petersen (2009), bu çalışmada DNA barkodlamanın taksonomistlerin çalışması açısından morfolojinin yerini alarak tür tanımlamasını kolaylaştıracak bir çalışma olduğunu ve yüksek bitki dünyası için henüz bu tür çalışmaların çok sık kullanılmadığını, var olan çalışmaların da birden fazla bitki bölgesinde değil de, sadece plastid genomu üzerinde yoğun olarak çalışıldığını belirtmişlerdir. Bu amaçla büyük bir taksonomik grubun, tüm bilinen 86 türünde (şüpheli iki tür hariç) ilk kapsamlı derlemesini sunmuşlar. Bitkilerde barkod bölgelerini seçip yararlarını dikkatle incelemenin gerektiğini belirtmişlerdir.

Şık ve ark. (2008), bu çalışmada *Crocus* türünde genetik çeşitliliğe dayalı bilgi edinmeyi ve bu türler arasındaki genetik varyasyon seviyelerini incelemeyi amaçlamışlar. Bugüne kadar aydınlatılmamış olan Batı Türkiye'deki 19 *Crocus* türüne dayanan 56 bireydeki genetik çeşitliliği RAPD ve ISSR işaretleyicileri kullanılarak tahmin etmeyi amaçlamışlar. Sonuçta *Crocus* türleri arasında yüksek seviyede genetik varyasyon saptamışlar. Bu çalışmanın AFLP ve SSR gibi daha güvenilir DNA işaretleyiciler ile yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini ve Türkiye'nin *Crocus* türü için genetik kaynak teşkil eden bir merkez olabileceğini vurgulamışlardır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

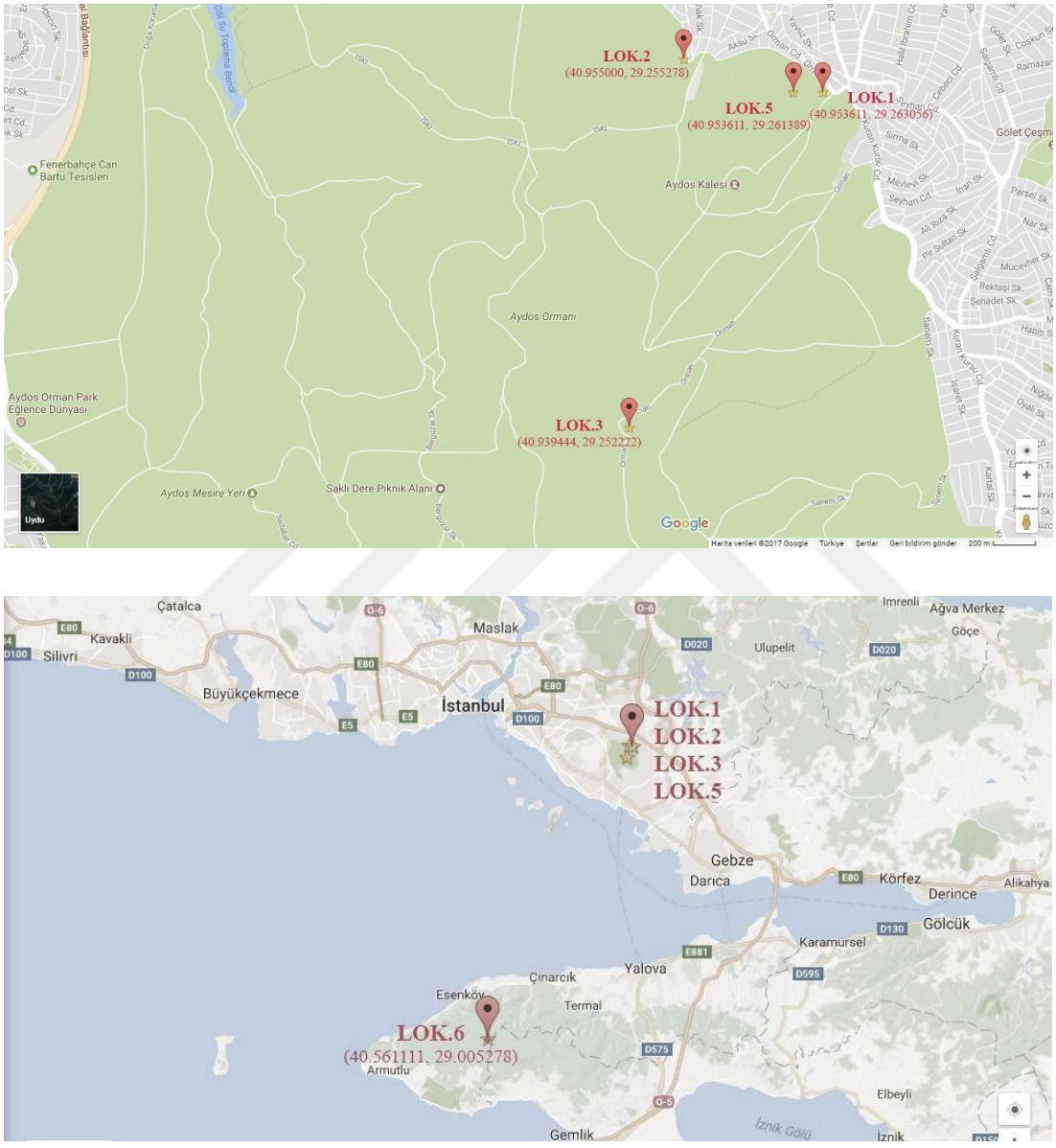
Çalışmada kullanılan bitki örnekleri doğal populasyonlarından toplanmış ve Dr. Mustafa Keskin ile Dr. Sırrı Yüzbaşıoğlu tarafından tür teşhisleri yapılmıştır. Taze bitki örnekleri arazide toplandıktan hemen sonra aluminyum folyolara sarılıp sıvı azot içinde dondurulmuş ve aynı gün içinde -80^0 C'de derin dondurucu dolaba aktarılmış ve muhafaza edilmiştir. Toplanan örneklerin lokalite bilgileri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Bitki örneklerinin toplandığı bölgeler ve bazı bilgiler

	Bölge	Rakım	Bitki Sıklığı (1x1m)	Tarih
Lok 1 :	**Aydos-Orman cd.**	**194 m**	**10 birey**	**Şubat-2017**
Lok 2 :	**Aydos-Necip Fazıl cd.**	**196 m**	**50-60 birey**	**Şubat-2017**
Lok 3 :	**Aydos-Tepe zirvesi**	**485 m**	**10 birey**	**Mart-2017**
Lok 4 :	**Aydos-Necip Fazıl cd. üstü**	**207 m**	**5-10 birey**	**Mart-2017**
Lok 5 :	**Aydos-NF ile Orman cd. arası**	**152 m**	**40-50 birey**	**Mart-2017**
Lok 6 :	**Yalova-Delmece yaylası**	**690 m**	**70 birey**	**Nisan-2017**

Davis'in (1984) Türkiye Florası adlı eserinde çiçeklenme zamanı mart-nisan ayları olarak belirtilmiş fakat Aydos ormanından örnek toplama sırasında ilk çiçeklenmenin şubat sonunda gerçekleştiği görülmüştür. Mart ayında bitkinin zaman zaman kar altında kaldığı, güneşin karları eritmesiyle tekrar çiçek açtığı, güneş ışığının az olduğu günlerde tepallerin kapalı olduğu gözlenmiştir. Bol güneşli günlerde tepaller açık ve altın portakal renginde görülmüştür. En son örnek toplama mart sonuna doğru gerçekleştirilmiş, mart ayı bitmeden tekrar gidildiğinde hemen hemen hepsinin çiçeklerinin solduğu gözlenmiştir. Çiçeklenme mevsiminden (şubat-mart) 2-2,5 ay

sonra meyve verdiği ve kapsül tipi meyvesinin toprağın üstünde görünür şekilde çıktığı gözlenmiştir. Bir bitkide 5-6 tohum oluştuğu tespit edilmiştir. Yalova-Delmece Yaylası'ndan toplanan örneklerin ise mart ayı içinde çiçek açtığı ve nisan ayı başında gidildiğinde ise çiçeklerinin hemen hemen hepsinin solduğu gözlenmiştir.

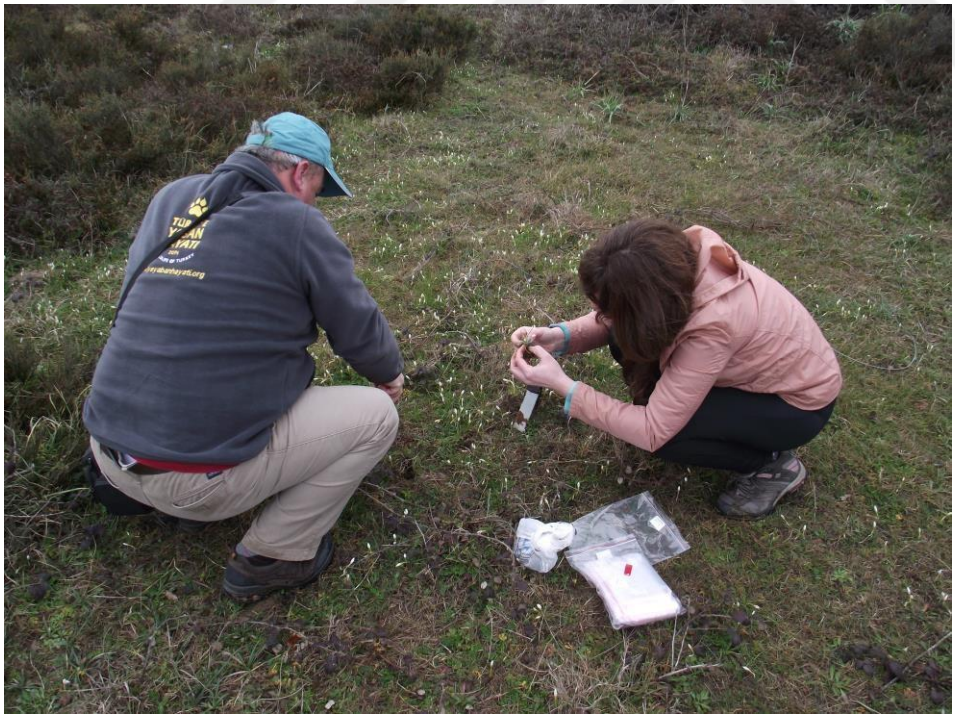


Şekil 2.1 Bitki örneklerinin toplandığı lokaliteler

Örneklerimizin oluşturduğu bitki birliklerinde *Cistus creticus* ve *Cistus salviifolius*; *Cyclamen coum* var. *coum; Erica arborea; Erica manipuliflora; Galatella linosyris; Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus*; *Osyris alba; Prospero autumnalis; Scilla bifolia* bitkilerinin bulunduğu gözlenmiştir.



Şekil 2.2 *Crocus flavus* subsp. *flavus*'un doğal habitatından bir görünüm



Şekil 2.3 Örnek toplama çalışmasından bir görünüm

2.2 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Doyle (1987) ve Doyle (1990)'un protokolüne göre çeşitli modifikasyonlarla CTAB yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonunda bitkinin taze yaprakları kullanılmıştır.

Tablo 2.2 DNA izolasyonunda kullanılan bileşikler

- ✓ 250 ml CTAB izolasyon tampon çözeltisi

25 ml	1 M Tris-HCl (pH 8,0)
10 ml	0,5 M EDTA
145 ml	Distile su
70 ml	5 M NaCl
5 gr	CTAB

- ✓ PVP
- ✓ Etanol (%70)
- ✓ β-merkaptoetanol
- ✓ İzopropanol (%96)
- ✓ Kloroform-oktanol (24:1)
- ✓ NaCl (5 M)
- ✓ Tris-EDTA çözeltisi

DNA izolasyonunda uygulanan basamaklar:

1. 0,05 gr yaprak örnekleri, 2 ml mikrosantrifüj tüpünde Mixer Mill MM 400 homojenizatör ile homojenize edildi.
2. Homojenize edilen örneklere 0,002 gr PVP eklenerek aktarıldı ve üzerine 65^0 C'de 800 µl binde iki oranında β-merkaptoetanol içeren CTAB solüsyonu eklenerek tüp birkaç kez tersyüz edildi.
3. Su banyosunda 65^0 C'de 60-90 dk inkübe edildi ve 5 dakikada bir tersyüz edildi.
4. 800 µl 24:1 Kloroform-Oktanol eklendi.

5. 13.000 rpm devirde 10 dakika santrifüj yapıldı.
6. Yaklaşık 600 µl kadar üst faz (süpernatant) alınarak temiz bir tüpe aktarıldı.
7. Alınan üst faz üzerine 300 µl 5M NaCl ve 600 µl soğutulmuş %96 izopropanol eklendi.
8. -20 ^{0} C'de DNA zincirlerini görünür hale gelinceye kadar bekletildi.
9. 10.000 rpm devirde 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst faz atıldı. Çökelti üzerine 1000 µl %70 etanol eklendi ve pelletin çözülmesi sağlandı.
10. 13.000 rpm devirde 3 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında üst faz atıldı.
11. 9 ve 10. basamaklar gerektiği kadar tekrar edildi.
12. 13000 rpm devirde 3 dakika son kez santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılarak tüp dibinde kalan pellet etanolden arındırılana kadar bekletildi.
13. Rehidrasyon için 100 µl Tris-EDTA çözeltisi ya da ultra saf distile su eklenip 37^{0} C'de 1 saat bekletildi.
14. İzole edilen DNA konsantrasyonları OPTIZEN NANO-Q Spektrofotometre kullanılarak dsDNA ölçüm modunda ölçülerek DNA'ların miktar ve saflık analizleri yapıldı.
15. Ölçümlerden sonra ultra saf su eklenerek son konsantrasyon değeri yaklaşık 50 ng/µl olacak şekilde sulandırma işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 2.4 İzolasyon basamakları sırasında kullanılan (A) Nano Q DNA ölçüm cihazı, (B) WiseMix Vortex cihazı, (C) Mikrosantrifüj cihazı, (D) Soğutmalı Mikrosantrifüj cihazı



Şekil 2.5 İzolasyon basamakları sırasında kullanılan Makrosantrifüj cihazı

2.3 PCR Uygulamaları

PCR reaksiyonları için reaksiyon karışımı 25 µL olarak hazırlanmıştır. Bu karışımın bileşiminde örnek bitkilerden elde edilen kalıp DNA, $MgCl_2$, reaksiyon tamponu (reaction buffer), tüm nükleotit çeşitlerini içeren dNTP karışımı, primer(ler) ve Taq-polimeraz enzimi (Fisher Scientific) kullanılmıştır. PCR reaksiyonları Esco marka, Aeris Thermal Cycler G96 model cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.3 PCR reaksiyonlarında kullanılan karışım

PCR Buffer (3 µl) 10X
$MgCl_2$ (3 µl) 25 mM
dNTPmix (0,5 µl) 25 mM
Primerler/Forward P.- Reverse P.(1,5 µl) 10 mM
Distile su (16 µl)
1 ünite Taq DNA Polimeraz
Kalıp DNA (50 ng) 20-50 ng

Çalışmalarımızda Tablo 2.3 de verilen içerikler kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. ISSR moleküler işaretleyici uygulamalarında kullanılan primerlerin bağlanma sıcaklıkları, baz dizilerine göre ayarlanarak en net ve ayırt edilebilir bantların elde edildiği belirlendi. *trn*L ve *trn*F intergenik ara bölgesi moleküler işaretleyicisi uygulamalarında en uygun olan bantlar 48^0C' de elde edildi. PCR reaksiyonları, 5 dakika 94ºC' de, daha sonra 36-40 döngü şeklinde 1 dakika 94ºC' de denatürasyon, 1 dakika bağlanmayı (annealing) sağlamak için *trn*L primerleri için 48ºC' de ve ISSR primerleri için değişen çeşitli sıcaklıklarda, 1 dakika uzama için 72ºC' de, daha sonra da son olarak 7 dakika 72ºC' de son uzama olacak şekilde uygulandı.

Tablo 2.4 PCR reaksiyonlarında uygulanan işlem basamakları

Basamak	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	94 ^{0}C	5 dk
Denatürasyon	94 ^{0}C	60 sn
Bağlanma	Primere bağlı değişmektedir.	60 sn
Uzama	72 ^{0}C	60 sn
Son Uzama	72 ^{0}C	7 dk

Tablo 2.5 PCR reaksiyonlarında kullanılan *trn*L-*trn*F moleküler işaretleyicileri ile sekansları (Sang ve ark., 1997).

Primer	Sekans	Bağlanma Sıcaklığı
*trn*L-F Forward	5'-AAAATCGTGAAGGTTCAAGTC-3'	53 ^{0}C (48 ^{0}C)
*trn*L-F Reverse	5'-GATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	53 ^{0}C (48 ^{0}C)

Tablo 2.6 PCR reaksiyonlarında kullanılan ISSR moleküler işaretleyicilerinin nükleotit dizileri (Nagaoka ve Ogihara, 1997).

Primer	DNA Dizisi
ISSR1	AGAGAGAGAGAGAGT
ISSR2	GAGAGAGAGAGAGAGAC
ISSR3	CACACACACACACACAA
ISSR4	CACACACACACACACAG
ISSR5	GTGTGTGTGTGTGTGTC
ISSR6	TCTCTCTCTCTCTCTCC
ISSR7	ACACACACACACACACG
ISSR8	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
ISSR9	CACACACACACACACARG
ISSR10	GTGTGTGTGTGTGTGTYA
ISSR11	ACACACACACACACACYT
ISSR12	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
ISSR13	CCCTCCCTCCCTCCCT
ISSR14	ACTGACTGACTGACTG
ISSR15	CTCTCTCTCTCTCTCTRC

ISSR moleküler işaretleyiciler ile genomda genetik benzerlik içeren bölgeler tespit edilmiş ve genetik benzerlik derecesi belirlenmiştir. Daha sonra PCR ürünleri %1,2'lik agaroz jelde (Fisher Scientific) elektroforez yöntemiyle yürütülerek bantların ayrılması ve görüntülenmesi sağlanmıştır.



Şekil 2.6 Esco Aeris Termal Döngüleyici, Model G96



Şekil 2.7 PCR basamaklarının uygulanması

2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel hazırlanırken 250 ml 1X TBE çözeltisi ile 4 g agar karıştırılıp mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Soğuduktan sonra 5 µl Etidyum Bromür ilave edilmiştir. Jel hazırlığı tamamlandıktan sonra elektroforez tepsilerine taraklar yerleştirilerek jel dökülüp soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra parafin üzerinde 6 µl PCR ürününe 1 µl olacak şekilde bromofenol mavisi ihtiva eden 6X DNA yükleme (loading) boyası (Termo Fisher Scientific) eklenmiştir. Elde edilen karışım jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi Power Supply CS-300V omniPAC MIDI güç kaynağı kullanılarak 90 V, 120 dk'da yine aynı markaya ait olan tank kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme işlemi UV transillüminatör WiseUV WUV-L20 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

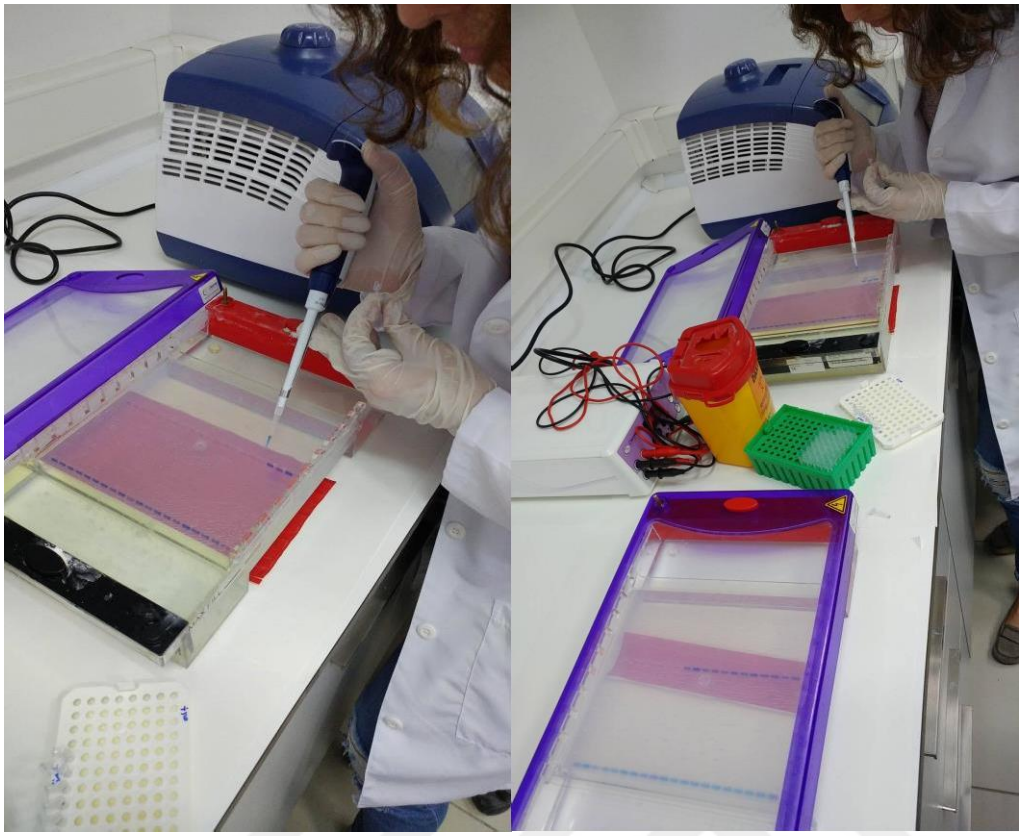
Tablo 2.7 Elektroforezde kullanılan çözeltiler

- TBE (250 ml)

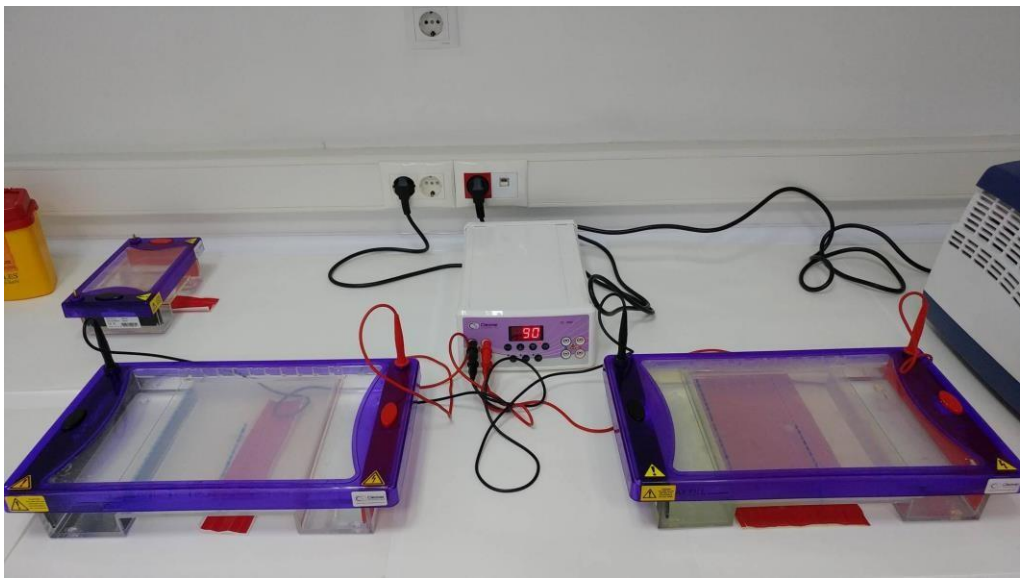
(Tris- Base, Borik asit, EDTA, Saf su)

- Agar (4 g)

- Etidyum Bromür (5 µl)



Şekil 2.8 Jel elektroforezi basamaklarının uygulanması



Şekil 2.9 Elektroforez ekipmanı (Power Supply CS-300V omniPAC MIDI)



Şekil 2.10 UV transillüminatörü (WiseUV WUV-L20) , Jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat)

2.5 Veri Analizleri

ISSR Veri Analizi

ISSR belirteçleri ile çoğaltılan ve agaroz jelde görüntülenen DNA bantları 1 veya 0 ile skorlanarak kaydedildi. Temiz ve net bir görüntüye sahip olan DNA bantları veri olarak kullanıldı. Analizler MVSP. 3.22 ve POPGENE 1.32 yazılımları kullanılarak gerçekleştirildi. Genotipler arasındaki benzerlik matriksinin oluşturulması Jaccard benzerlik indeksine göre yapıldı. Genetik parametreler ile polimorfik lokiler (P), lokus başına düşen etkin alel sayısı (Ne), gözlenen alellerin yaklaşık sayısı (Na), Nei'ye göre gen çeşitliliği (h), ve Shannon'a göre bilgi indeksinin hesaplanması yapıldı. Principal Component Analysis (PCA) testi ile bireyler arasındaki ISSR ilişkilerini temsil eden bir grafik oluşturuldu (Kimura ve Crow, 1964; Yeh ve ark., 1997).

Filogenetik İlişki Analizi

Filogenetik ilişkilerin analizi için, PCR işlemi sonrası agaroz jele yüklenen PCR ürünleri dışında geriye kalan 20-22 µ'luk PCR ürünleri dizileme işlemlerinde kullanıldı. Dizileme işlemi Iontek Moleküler Tanı (Maslak, İstanbul) şirketi tarafından hizmet alımı yoluyla gerçekleştirildi. Elde edilen DNA dizileri NCBI GenBank veri tabanına gönderilerek erişim numaraları temin edildi. Ayrıca filogenetik ağacı oluşturmak için yakın ve uzak bazı genotiplerin *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri, nükleotit NCBI GenBank veri tabanından alındı. Dizileme işlem sonrası elde edilen ve NCBI GenBank veri tabanından alınmış olan tüm *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri BioEdit 7.2.5 yazılımının varsayılan ClustaW parametreleri kullanılarak hizalandı. MEGA 6 yazılımı ile Maximum-Likelihood (ML) metodu kullanılarak Tablo 2.8'de verilen parametreler ile filogenetik ağaç oluşturuldu. Filogenetik ağaç 1000 Bootstrap değeriyle elde edildi. Maximum-Likelihood (ML) metodu kullanılarak filogenetik ilişki hesaplandı. BioEdit 7.2.5 ile sekanslama tanımlama matriksinin, (%) G+C içeriği hesaplanması gerçekleştirildi (Hall, 1999; Larkin et al., 2007; Tamura et al., 2013).

Tablo 2.8 Filogenetik ağaç kurulurken uygulanan parametreler

Analysis	
Analysis	Phylogeny Reconstruction
Statistical Method	Maximum Likelihood
Phylogeny Test	
Test of Phylogeny	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications	1000
Substitution Model	
Substitutions Type	Nucleotide
Model/Method	Tamura-Nei model
Rates and Patterns	
Rates among Sites	Uniform rates
Data Subset to Use	
Gaps/Missing Data Treatment	Complete deletion
Tree Inference Options	
ML Heuristic Method	Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
Initial Tree for ML	Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Branch Swap Filter	Strong
System Resource Usage	
Codons Included	1st+2nd+3rd+Non-Coding

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, doğal habitatlarından toplanan *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerinin genetik çeşitliği ISSR moleküler işaretleyicilerinden elde edilen DNA bant verileri kullanılarak, filogenetik ilişkileri ise *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileriyle analiz edilmiştir.

3.1. ISSR Verileri

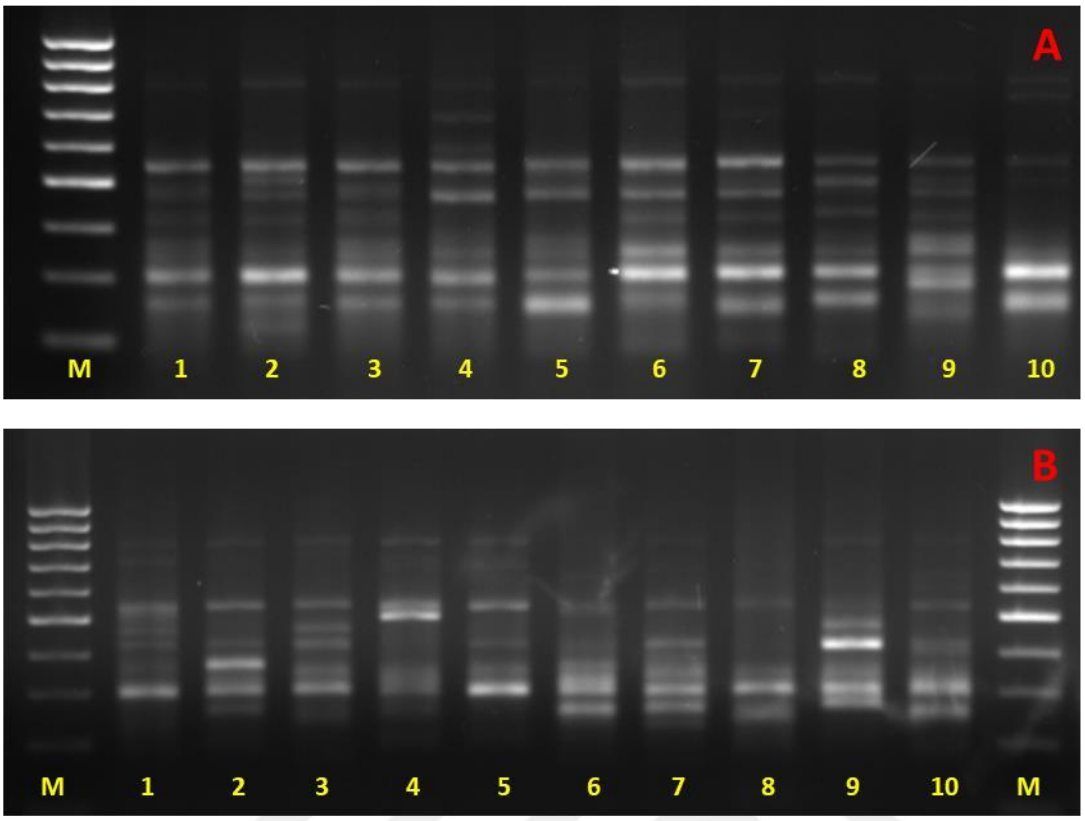
Bu çalışmada 6 farklı populasyondan toplanan 58 adet *C. flavus* subsp. *flavus* genotipinde, 10 adet ISSR moleküler işaretleyicisi uygulanmış ve 6 ISSR moleküler işaretleyici uygulamasında elde edilen bantlar analizlerde veri olarak kullanılmıştır. PCR işlemlerinden elde edilen ürünler agaroz jelde elektroforez işleminde yürütülmüş, daha sonra oluşan ayırt edilebilir ve net görülen bantlar, varlığı için 1 yokluğu için 0 olarak skorlanmıştır.

Dört primerden toplam 61 lokus elde edilmiştir. Primer başına ortalama lokus sayısı 10,1 olarak belirlenmiştir. Bu lokusların büyüklüğü 200 ile 1500 bp arasında değişmektedir. Tablo 3.1'de primer kodu, bu primerlerden elde edilen PCR ürünlerinin boyutu, elde edilen toplam bant, homomorfik ve polimorfik bant sayısı gösterilmiştir.

Tablo 3.1 ISSR-PCR işleminde kullanılan ISSR primerleri ve DNA bantlarının çeşitli özellikleri

No	ISSR Primeri	Kodu	Bant Büyüklüğü (bp)	Toplam Bant Sayısı			Polimorfizm
				Elde edilen	Homomorfik	Polimorfik	
1	ISSR 2	UBC811	200-500	6	1	5	86,89%
2	ISSR 6	UBC823	250-800	15	1	14	
3	ISSR 12	UBC842	280-900	8	2	6	
4	ISSR 13	UBC875	300-1500	12	1	11	
5	ISSR 14	UBC829	200-850	11	2	9	
6	ISSR 15	UBC 844	200-800	9	1	8	
		Elde edilen bant sayısı:		61	8	53	

Şekil 3.1'de ISSR6 primerinin uygulanması ile elde edilen bantlar örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1 *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinde ISSR6 primeri ile elde edilen ISSR bantlarının agaroz jeli görüntüsü A: 1. Lokasyon; B: 2. Lokasyon; M: DNA ladder; Bantların altındaki numaralar belirtilen lokasyona ait genotipleri göstermektedir.

Popgene 32 yazılımı ile elde edilen genetik çeşitlilik analizi sonuçları Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Gözlenen allel sayısı (na), efektif allel sayısı (ne), Nei (1973)'ye göre gen çeşitliliği değeri (h) ve Shannon bilgi indeksi (I) değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.2 Tüm lokusları kapsayan ISSR bant verilerinin, Popgene 32 yazılımıyla değerlendirilmesi sonucu elde edilen genetik çeşitlilik istatistik verileri

n=58	Polimorfik lokus sayısı	PPL (%)	na	ne	h	I
Ortalama	53	86,89	1.8696	1.3934	0.2424	0.3774
Standart sapma			0.3404	0.3361	0.1712	0.2325

n:analizde kullanlan birey sayısı, PPL: polimorfik lokus yüzdesi, na: gözlenen allel sayısı, ne: efektif allel sayısı (Kimura and Crow, 1964), h: Nei (1973)'ye göre gen çeşitliliği değeri, I: Shannon bilgi indeksi (Lewontin, 1972).

Tüm bireyler tek populasyon olarak kabul edilerek yapılan analizlerde toplam 53 adet lokusun polimorfizm gösterdiği görülmüştür. Bu polimorfik bantlara bağlı polimorfizm yüzdesi (PPL) ise %86,89 olarak hesaplanmıştır. Gözlenen allel sayısı (na) ortalama 1.867, efektif allel sayısı (ne) ortalama 1.393 olarak belirlenmiştir. Nei (1973)'ye göre gen diversity değerinin (h) ise 0.242 olduğu tespit edilmiştir. Shannon bilgi indeksi (I) 0.377 olduğu görülmüştür. Bu değerlere göre *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri arasında genetik çeşitliliğin bulunduğu görülmüştür.

Tablo 3.3 Populasyonlara göre, ISSR bant verilerinin, Popgene 32 yazılımıyla değerlendirilmesi sonucu elde edilen genetik çeşitlilik istatistik verileri

1. Lokasyon						
(n=10)	**Polimorfik Lokus**	**PPL (%)**	**na**	**ne**	**h**	**I**
Ortalama	**36**	**59,02**	1.5902	1.3129	0.1841	0.2800
En yüksek			2.0000	1.9819	0.4649	0.6886
En düşük			1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Std Sap.			0.4959	0.3725	0.1968	0.2784
2. Lokasyon						
(n=10)	**Polimorfik Lokus**	**PPL (%)**	**na**	**ne**	**h**	**I**
Ortalama	**42**	**68,85**	1.6885	1.4135	0.2413	0.3607
En yüksek			2.0000	1.9819	0.4944	0.6886
En düşük			1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Std Sap.			0.4669	0.3746	0.1988	0.2800
3. Lokasyon						
(n=9)	**Polimorfik Lokus**	**PPL (%)**	**na**	**ne**	**h**	**I**
Ortalama	**37**	**60,66**	1.6066	1.4165	0.2334	0.3415
En yüksek			2.0000	1.9935	0.4984	0.6915
En düşük			1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Std Sap.			0.4926	0.4084	0.2155	0.3036
4. Lokasyon						
(n=9)	**Polimorfik Lokus**	**PPL (%)**	**na**	**ne**	**h**	**I**
Ortalama	**33**	**54,10**	1.5410	1.1501	0.1079	0.1844
En yüksek			2.0000	1.9819	0.4444	0.6365
En düşük			1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Std Sap.			0.5025	0.2092	0.1288	0.1999
5. Lokasyon						
(n=10)	**Polimorfik Lokus**	**PPL (%)**	**na**	**ne**	**h**	**I**
Ortalama	**36**	**59,02**	1.5902	1.2884	0.1778	0.2752
En yüksek			2.0000	1.9819	0.4444	0.6886
En düşük			1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Std Sap.			0.4959	0.3356	0.1827	0.2641

6. Lokasyon						
(n=10)	**Polimorfik Lokus**	**PPL (%)**	**na**	**ne**	**h**	**I**
Ortalama	**37**	**60,66**	1.6066	1.3127	0.1850	0.2830
En yüksek			2.0000	1.9819	0.4944	0.6886
En düşük			1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Std Sap.			0.4926	0.3705	0.1941	0.2742

n:analizde kullanlan birey sayısı, PPL: polimorfik lokus yüzdesi, na: gözlenen allel sayısı, ne: efektif allel sayısı (Kimura and Crow, 1964), h: Nei (1973)'ye göre gen çeşitliliği değeri, I: Shannon bilgi indeksi (Lewontin, 1972).

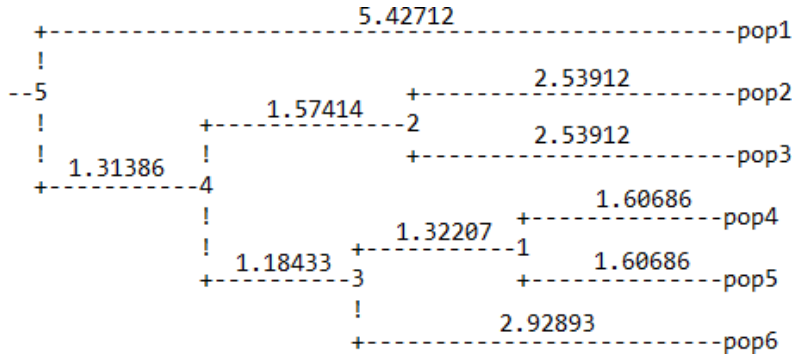
Popülasyon bazında yapılan genetik çeşitlilik analizlerine göre, en yüksek polimorfik lokus oranı % 68,85 ile 2. lokasyonda görülürken; en düşük polimorfizm oranı % 54,10 ile 4. lokasyonda tespit edilmiştir. Nei (1973)'ye göre gen çeşitliliği değeri ise büyükten küçüğe şu şekilde sıralanmıştır; 0.241 (lok2), 0.233 (lok3), 0.185 (lok6), 0.184 (lok1), 0.178 (lok5) ve 0.108 (lok4). Bu sonuçlara göre genetik çeşitliliğin en yüksek olduğu lokasyonun 2. ve en düşük olduğu lokasyonun 4. lokasyon olduğu önerilebilir. Bu farklılığın C. *flavus* subsp. *flavus* genotiplerinin üreme durumları ve türedikleri ata bireylerle bağlıntılı olduğu söylenebilir.

ISSR bant verilerinin analizinden elde edilen Nei (1973)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik değerleri Tablo 3.4'te gösterilmiştir. Bu değerler incelendiğinde 4. ve 5. lokasyondan toplanan genotiplerin 0.9684 değeriyle en yüksek genetik benzerlik oranını gösterirken en düşük benzerliğin 1. ve 4. lokasyondan toplanan bireyler arasında 0.8411 değeriyle görüldüğü tespit edilmiştir.

Tablo 3.4 Nei (1973)'ye göre genetik benzerlik (Üst) ve genetik uzaklık (Alt) değerleri Popülasyonlar numaralar ile belirtilmiştir.

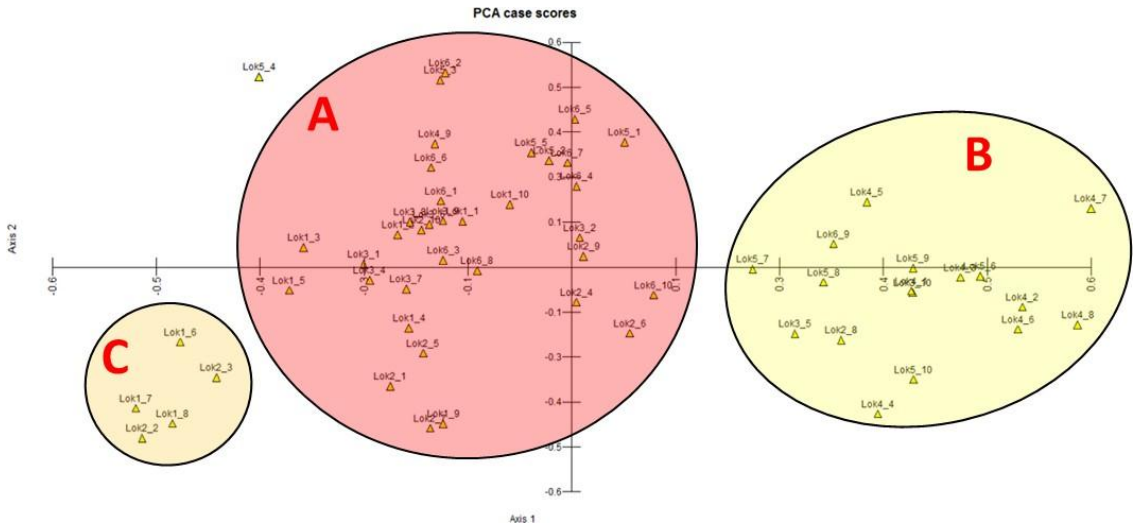
pop ID	1	2	3	4	5	6
1	****	0.9244	0.9034	0.8411	0.8893	0.9303
2	0.0787	****	0.9505	0.9087	0.9297	0.9333
3	0.1016	0.0508	****	0.8991	0.9205	0.9355
4	0.1730	0.0957	0.1064	****	0.9684	0.9255
5	0.1173	0.0729	0.0829	0.0321	****	0.9610
6	0.0722	0.0690	0.0667	0.0774	0.0397	****

ISSR DNA bant verileriyle Nei (1973)'ye göre oluşturulmuş genetik benzerlik dendrogramı Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Nei (1973)'ye göre *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri arasındaki genetik benzerliği gösteren dendrogram Dendrogram üzerindeki değerler, kol uzunluklarını göstermektedir.

Nei (1973)'ye göre *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri arasındaki genetik benzerliği gösteren dendrogram incelendiğinde 1. lokasyona ait genotiplerin diğer populasyonlardan ayrıldığı ve 4. ve 5. lokasyona ait genotiplerin en yakın olduğu görülmektedir. Ayrıca 2. ve 3. lokasyona ait genotiplerin benzerliğinin yüksek oduğu görülmüştür.



Şekil 3.3 *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerine ait MVSP 3.22 yazılımı ile elde edilmiş Principal Component Analysis (PCA) sonuçları Eksen üzerindeki rakamlar PCA skorlarını, sarı üçgenler genotipleri ve çemberler ana grupları göstermektedir.

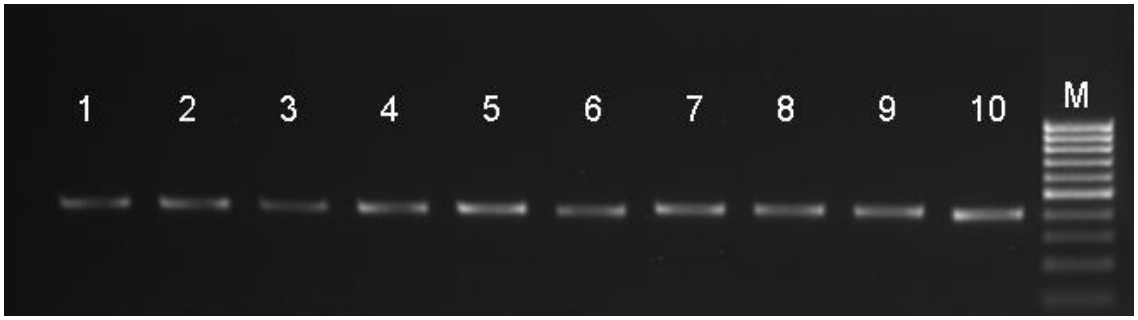
PCA grafik verileri incelendiğinde (Şekil 3.3) üç ana grup görülmektedir. Bu gruplar incelendiğinde; A grubu ağırlıklı olarak 1. 2. 3. ve 6. lokasyonlara ait bireyler ile az sayıda 4. ve 5. lokasyonlara ait bireylerden meydana gelirken; B grubu 4. ve 5. lokasyonlara ait bireyler ile 2. lokasyona ait olan 8. birey, 3. lokasyona ait olan 5. birey ve 6. lokasyona ait olan 9. bireyden oluşmuştur. Ayrıca C grubu olarak adlandırılan A grubundan ayrılan 3. bir grubun ve 5. lokasyona ait olan 4. bireyin diğer gruplardan ayrıldığı görülmüştür. PCA analizindeki bu dağılıma göre, *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri lokasyon ayrımı olmadan normal düzeyde bir genetik çeşitlilik göstermiştir.

3.2 Filogenetik İlişki Analizleri

C. flavus subsp. *flavus* bitkilerinden elde edilen *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri kullanılarak filogenetik ilişkiler analiz edilmiştir.

3.2.1 *trn*L-*trn*F İntergenik Ara Bölge Dizileri

C. flavus subsp. *flavus* bitkilerine ait *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesi Tablo 2.5'te belirtilen moleküler işaretleyiciler kullanılarak çoğaltılıp 200-250 bp uzunluğunda amplikonlar elde edilmiştir. Bu amaçla toplanan bitkiler arasından 10 birey seçilerek filogenetik ilişkilerin analiz edilmesinde kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez işlemi ile yürütülerek çoğaltılması hedeflenen *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesinin yaklaşık olarak bant büyüklüğü tespit edilmiştir. Elde edilen *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesine ait DNA bantları Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Elektroforez ve görüntüleme işleminden sonra, DNA dizileme işlemi uygulanacak PCR ürünleri gerekli işlemler tamamlanarak dizileme işlemi için hazırlanmıştır. Dizileme işlemi gerekli cihazlar ve diğer donanıma sahip olan bir kuruluşta, hizmet alımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerine ait *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesi bant görüntüsü Bant üzerindeki numaralar genotipleri göstermektedir.

Dizileme işlemi sonucunda elde edilen *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri hizalanmış (alignment), gerekli olan bazı dizilerde düzeltme işlemi uygulanmıştır. *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesine ait dizilerin elde edilen nihai uzunluğu 202 bp olarak belirlenmiştir. Bu basamaktan sonra, diziler NCBI GenBank veri bankasına yüklenerek diziler için erişim numaraları alınmıştır. *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerine ait *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgelerine ait dizilerin NCBI GenBank erişim numaraları ve bazı özellikleri Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5 Bu çalışmada *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinden elde edilen *trn*L - *trn*F intergenik ara bölge dizileri, NCBI GenBank veri tabanı erişim numaraları ve GC içeriği

No	Genotip	Nükleotid Dağılımı				GC İçeriği (%)	NCBI Erişim Numarası
		A	**S**	**G**	**T**		
1	Lok1_5	61	37	35	69	35,64	MG193570
2	Lok1_10	61	37	34	70	35,14	MG193571
3	Lok2_5	62	37	33	70	34,65	MG193572
4	Lok2_6	61	37	34	70	35,14	MG193573
5	Lok3_4	61	37	34	70	35,14	MG193574
6	Lok3_7	62	37	33	70	34,65	MG193575
7	Lok5_3	60	37	35	70	35,64	MG193576
8	Lok5_5	60	37	34	71	35,14	MG193577
9	Lok6_5	62	37	33	70	34,65	MG193578
10	Lok6_6	62	37	32	71	34,16	MG193579

Diziler analiz edildiğinde, tüm dizilerde 1. bazdan 18. baza kadar *trn*L geninin (*trn*L-Leu) bir kısmını; 19-184. baza kadar *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesini, 185. bazdan 202. baza kadar ise *trn*F geninin (*trn*L-Phe) bir bölümünü içerdiği tespit edilmiştir. *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesi dizileri analiz edildiğinde GC içeriklerinin %34,16 ile %35,64 arasında değiştiği görülmüştür.

Elde edilen *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri, kapsama ve uyumu yüksek dizilerin belirlenmesi için NCBI GenBank veri tabanının nükleotit koleksiyonunda tarandı. Bu amaçla NCBI'nın Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLASTn), "Highly similar sequences (Megablast)" seçeneği ile kullanılarak dizilerimize en yüksek kapsama ve benzerliğe sahip olan diziler belirlendi. Her bir genotipe en çok benzerlik gösteren üç diziye ait erişim numarası, kapsama ve benzerlik oranları Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

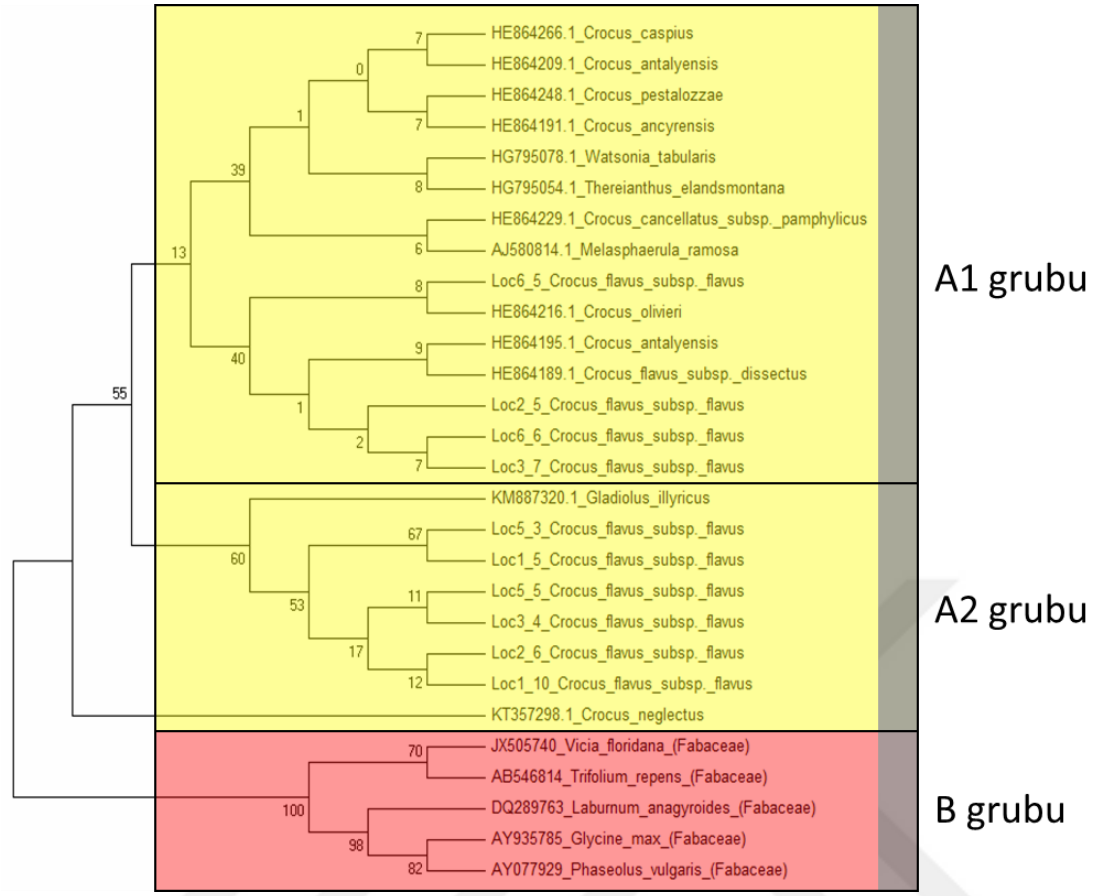
Sonuçlara göre, *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizilerine en çok benzerlik gösteren diziler sırasıyla erişim numaraları Iridaceae familyasından AM941385, AJ409585 ve AJ409580 olan *Syringodea unifolia, Pillansia templemannii* ve *C. pulchellus* bitkilerine ait kloroplast organeli DNA genomundan elde edilmiş dizilerdir. Bu dizilerin erişim numaraları Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6 NCBI GenBank veri tabanından elde edilen *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerine ait *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesi ile örtüşen ilk üç dizi

Genotip	Organizma	Familya	Erişim Numarası	Kapsama (%)	Benzerlik (%)
Lok1_5	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	96
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	96
	C. pulchellus		AJ409580	100	96
Lok1_10	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	97
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	97
	C. pulchellus		AJ409580	100	96
Lok2_5	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	97
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	97
	C. pulchellus		AJ409580	100	97

Lok2_6	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	97
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	97
	C. pulchellus		AJ409580	100	96
Lok3_4	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	97
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	97
	C. pulchellus		AJ409580	100	96
Lok3_7	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	98
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	98
	C. pulchellus		AJ409580	100	97
Lok5_3	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	96
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	96
	C. pulchellus		AJ409580	100	95
Lok5_5	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	96
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	96
	C. pulchellus		AJ409580	100	96
Lok6_5	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	97
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	97
	C. pulchellus		AJ409580	100	97
Lok6_6	*Syringodea unifolia*	Iridaceae	AM941385	100	98
	Pillansia templemannii		AJ409585	100	98
	C. pulchellus		AJ409580	100	98

C. flavus subsp. *flavus* bitkilerinin filogenetik ilişkilerinin analiz edilmesi amacıyla bu çalışmadan elde edilen *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesi ile NCBI GenBank veri tabanından alınan aynı ve diğer türlere ait *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri kullanılarak birleşik filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu amaçla 31 adet *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizilerini içeren DNA dizisi alınarak, bu çalışmada elde edilen dizilerle beraber toplam 41 dizi kullanılmış ve Maximum Likelihood (ML) metoduyla birleşik filogenetik ağaç oluşturulmuştur. NCBI GenBank veri tabanından alınan dizilerin erişim numaraları filogenetik ağaç üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 3.5 *C. flavus* subsp. *flavus* bitkilerine ait olan ve NCBI GenBank veri tabanından alınan *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri ile oluşturulan birleşik filogenetik ağaç Sarı renkle gösterilen A kümesi, bu çalışmadan elde edilen *trn*L - *trn*F intergenik ara bölge dizilerini içeren filogenetik grubu göstermektedir.

Elde edilen sonuçlara göre, bu çalışmada elde edilen ve NCBI GenBank veri tabanından alınan genotipler iki ana grup oluşturmuştur. Bu gruplar sarı renkle gösterilen A grubu ve kırmızı renkle gösterilen B grubu olarak adlandırılmıştır. A grubu, *C. flavus* subsp. *flavus* bitkisinin de üyesi olduğu Iridaceae familyasına ait üyelerden oluşmuştur. B grubu ise dış grup olarak filogenetik ağaca eklenen Fabaceae familyasına ait bitkilerden oluşmuştur.

Bootstrap değerlerine bakıldığında ise B grubu 100 skorla bir araya gelmişlerdir. A grubu ise 55 bootstrap değerleri ile bir araya gelmiştir. Bu durum *trn*L - *trn*F intergenik ara bölge dizilerinin korunaklı olması nedeniyle familya bazında düşük ayırıcılık gücü sergilemiştir.

4. SONUÇ

Bu çalışmada *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri ISSR moleküler işaretleyicileri ve *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri kullanılarak analiz edilmiştir. Bu genotiplerin genetik çeşitliliği ISSR moleküler işaretleyicileri; filogenetik ilişkileri ise *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizileri kullanılarak analiz edilmiştir.

Bu analizlere göre;

a) ISSR moleküler işaretleyicileri *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri genetik çeşitlilik analizlerinde (%86,89 polimorfizm) etkili sonuçlar vermiştir.
b) ISSR verisi, yapılan PCA analizleri sonucunda *C. flavus* subsp. *flavus*'un genotipik olarak ayrılmasına katkı sağlamıştır. Bu analize göre 4. ve 5. lokasyona ait bireylerin çoğunlukla diğer popülasyonlardan ayrıldığı gözlenmiştir.
c) *C. flavus* subsp. *flavus* genotipleri Iridaceae familyasının diğer üyeleriyle karışarak heterojen bir filogenetik grup oluşturmuştur.
d) *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinin oluşturduğu filogenetik grupların bootstrap değerleri genotipler arasında benzerliğin normal seviyede bir benzerlik gösterdiğine işaret etmektedir.
e) *trn*L-*trn*F intergenik ara bölge dizilerinin, birleşik filogenetik ağaçta incelenen genotipleri diğer bitki gruplarından ayırmada etkili olduğu görülmüştür.
f) Ayrıca aynı dizilerin, familya seviyesinde korunaklı olduğu görülmüştür.

Sonuçlara göre, ISSR moleküler işaretleyicileri ve kloroplast *trn*L-*trn*F intergenik ara bölgesinin, *C. flavus* subsp. *flavus* genotiplerinin genetik analizlerinde kullanılabilecek etkili moleküler araçlar olduğu öne sürülebilir.

5. KAYNAKLAR

1. **Akman, Y. & Güney, K. (2011).** Bitki biyolojisi: Botanik. Palme.

2. **Candan, F. (2007).** *Crocus* Cinsinden *Ancyrensis , Sieheanus, Chrysanthus* ve *Flavus* Tür ve Alt Türleri Üzerinde Morfolojik, Anatomik, Sitolojik ve Palinolojik Araştırmalar. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Manisa.

3. **Candan, F. (2015).** Comparative Morphological and Leaf Anatomical Investigations of *Crocus flavus* Weston from Turkey. *International Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries, 3*(3), 99-104.

4. **Coşkun, F., Selvi, S., & Satil, F. (2010).** Phylogenetic relationships of some Turkish *Crocus* (Iridaceae) taxa based on morphological and anatomical characters. *Turkish Journal of Botany, 34*(3), 171-178.

5. **Davis, P. H. (2000).** Flora of Turkey and The East Eagean Islands, *Edinburg University Press*, (supplement), Edinburg, 11, 271-274.

6. **Davis, P. H., Hedge, I. C. (1984).** The Flora of Turkey Past, Present and Future, *Condollea*, 8: 381–449.

7. **Davis, P.H. (1985).** Flora of Turkey and The East Eagean Islands, *Edinburg University Press*, Edinburg, (1-9), 1-600.

8. **Doyle, J. J. (1987)** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bul,* 19, 11-15.

9. **Doyle, J. J. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus,* 12, 13-15.

10. **Erol, O. (2004).** Batı Anadolunun Bazı Endemik *Crocus* L. (Iridaceae) Türleri Üzerine Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.

11. **Erol, O., & Şık, L. (2015).** İstanbul İlinde Yayılış Gösteren *Crocus* L. (Iridaceae) Taksonları Üzerine Bir Çalışma.

12. **Erol, O., KAYA, H. B., ŞIK, L., Tuna, M., Can, L., & Tanyolac, M. B. (2014).** The genus *Crocus*, series *Crocus* (Iridaceae) in Turkey and 2 East Aegean islands: a genetic approach. *Turkish Journal of Biology*, *38*(1), 48-62.

13. **Erol, O., L. Şık, H. B. Kaya, B. Tanyolaç, and O. Küçüker (2011).** Genetic diversity of *Crocus antalyensis* B. Mathew (Iridaceae) and a new subspecies from Southern Anatolia, *Plant Syst Evol.,* 294(3-4): 281- 287.

14. **Filiz, E., Koç, İ. (2011).** Bitki Biyolojisinde Moleküler Markörler. GOÜ, *Ziraat Fakültesi Dergisi,* 28(2), 207-214.

15. **Gedik, A. (2016).** Safranda SSR (Simple Sequence Repeat) DNA Markörlerinin Geliştirilmesi ve Yakın Akraba Türlere Aktarılabilirliğinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana.

16. **Genç, M.E. (2017).** Ülkemizde Yetiştirilen Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çeşitlerinde İleri Çıkmış Hatlarda Ascochyta Yanıklığına Karşı Direncin Moleküler İşaretleyiciler (STMS, ISSR ve RAPD) Kullanılarak Araştırılması. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

17. **Gismondi, A., Fanali, F., Labarga, J. M. M., Caiola, M. G., & Canini, A. (2013).** *Crocus sativus* L. genomics and different DNA barcode applications. *Plant systematics and evolution, 299*(10), 1859-1863.

18. **Gören, G. (2011).** Türkiyede Yetişen *Sideritis* (Lamiaceae) Cinsinin *Hesiodia* ve *Burgsdorfia* Seksiyonlarının ITS nrDNA ile *trn*L-F ve *ndh*F cpDNA Dizileriyle Moleküler Sistematik Analizi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir.

19. **Güvendiren, A. D. (2015).** Molecular Phylogenetic Analyses of *Juniperus* L. Species in Turkey and their Relations with other *Juniperus* Based on cpDNA. Middle East Technical University, Department of Biological Sciences, Doctoral Dissertation, Ankara.

20. **Hall, T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editör and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series,* 41, 95-98.

21. **Harpke, D., Carta, A., Tomovic, G., Randelovic, V., Randelovic, N., Blattner, F. R., Peruzzi, L. (2015).** Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series Verni (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution,* 301(1), 309-325.

22. **Harpke, D., Meng, S., Rutten, T., Kerndorff, H., Blattner, F. R. (2013).** Phylogeny of *Crocus* (Iridaceae) based on one chloroplast and two nuclear loci: ancient hybridization and chromosome number evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 66(3), 617-627.

23. **Harpke, D., Peruzzi, L., Kerndorff, H., Karamplianis, T., Constantinidis, T., Randelovic, V., ... & Blattner, F. R. (2014).** Phylogeny, geographic distribution and new taxonomic circumscription of the *Crocus reticulatus* species group (Iridaceae). *Turkish Journal of Botany, 38*(6), 1182-1198.

24. **Haspolat, G. (2011).** Batı Anadolu'da Yayılış Gösteren Bazı *Crocus* L. Taksonlarının Çoğaltımı ve Süs Bitkisi Olarak Değerlendirilmesi Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.

25. **Haspolat, G., & Özzambak, E. (2013).** Batı Anadolu'da Yayılan Bazı *Crocus* Taksonlarının Süs Bitkisi Olarak Değerlendirilmesi. *Journal of Aegean Agricultural Research Institute,* (2013): 32 - 40.

26. **Haspolat, G., Şenel, Ü., Gökkür, S., & Kesici, A. (2016).** Türkiye Süs Bitkileri Genetik Kaynakları. *Journal of Aegean Agricultural Research Institute,* (2016): 51-64.

27. **Innes, C. (1985).** The world of Iridaceae. A comprehensive record. Holly Gate International Ltd..

28. **Kerndorff, H., Pasche, E. (2004a).** Two new taxa of the *Crocus biflorus* aggregate (Liliiflorae, Iridaceae) from Turkey. *Linzer Biol. Beitr.*, 36, 5–10.

29. **Kerndorff, H., Pasche, E. (2011).** Two new taxa of *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia*, 95, 2–5.

30. **Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D., Blattner, F.R. (2011).** Three new species of *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia*, 95, 99–105.

31. **Kerndorff, H., Pasche, E., Harpke, D., Blattner, F.R. (2012).** Seven new species of *Crocus* (Liliiflorae, Iridaceae) from Turkey. *Stapfia*, 97, 123-145.

32. **Khansarinejad, B., Hassandokht, M. R., Nazeri, V., & Soorni, A. (2015-a).** Evaluation of genetic diversity of some Iranian edible *Crocus* species using morphological and ISSR marker. *Iranian Journal of Horticultural Sciences*, 46(1), 51-61.

33. **Khansarinejad, B., Hassandokht, M. R., Nazeri, V., & Soorni, A. (2015-b).** Comparison of molecular markers (RAPD, ISSR) for determination genetic differences two of *Crocus* genus. International Journal of Farming and Allied Sciences, *4*(5), 457-464.

34. **Kimura, M., Crow, J.F. (1964).** The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics,* 49, 275-738. PMID: 14156929.

35. **Kravkaz, İ. S. (2008)** Kastamonu Yöresindeki *Crocus* ssp.'nin Fenolojik Özellikleri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

36. **Kravkaz, İ., H.Vurdu, E. Türkyılmaz (2006).** Potansiyel Süs Bitkisi Olarak Çiğdemler, *Gazi Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, Kastamonu, 135-140.

37. **Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. (2007).** ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics,* 23, 2947-2948.

38. **Larsen, B., Orabi, J., Pedersen, C., & Ørgaard, M. (2015).** Large intraspecific genetic variation within the Saffron-Crocus group (*Crocus* L., series *Crocus*; Iridaceae). *Plant systematics and evolution, 301*(1), 425-437.

39. **Mir, J. I., Ahmed, N., Khan, M. H., Mokhdomi, T. A., Wani, S. H., Bukhari, S., Qadri, R. A. (2015).** Molecular characterization of saffron-potential candidates for crop improvement. *Notulae Scientia Biologicae, 7*(1), 81.

40. **Moraga, A. R., Trapero-Mozos, A., Gómez-Gómez, L., & Ahrazem, O. (2010).** Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of Crocus cartwrightianus cv. albus. *Industrial crops and products, 32*(2), 147-151.

41. **Nagaoka, T., & Ogihara, Y. (1997).** Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 94(5), 597-602.

42. **Nemati, Z., Mardi, M., Majidian, P., Zeinalabedini, M., Pirseyedi, S. M., & Bahadori, M. (2014).** Saffron (*Crocus sativus* L.), a monomorphic or polymorphic species. *Spanish Journal of Agricultural Research, 12*(3), 753-762.

43. **Nemati, Z., Zeinalabedini, M., Mardi, M., Pirseyediand, S. M., Marashi, S. H., & Nekoui, S. M. K. (2012).** Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus* (Iridaceae). *American journal of botany, 99*(9), e340-e343.

44. **Özdemir, C., Baran, P., & Akyol, Y. (2006).** The morphology and anatomy of *Crocus flavus* weston subsp. *flavus* (Iridaceae). *Turkish Journal of Botany, 30*(3), 175-180.

45. **Özdeniz, E., & Kurt, L. (2012).** Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu'ndaki (ANK) Iridaceae Familyasının Revizyonu ve Veri Tabanının Hazırlanması. *Journal of Forestry Faculty of Kastamonu University, 12*(2).

46. **Özhatay, N., Koçyiğit, M., Yüzbaşıoğlu, S., & Gürdal, B. (2013).** Mediterranean flora and its conservation in Turkey: with special reference to Monocot geophytes. *Flora Mediterranea, 23*, 195-208.

47. **Öztürk, N. (2017).** Ülkemizde Yaygın Olarak Yetiştirilen Şeker Mısır (*Zea mays* L. var. *saccharata)* Varyetelerinin Genetik Çeşitlilik ve Filogenetik İlişkilerinin Araştırılması. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

48. **Palmero, D., Rubio-Moraga, A., Galvez-Patón, L., Nogueras, J., Abato, C., Gómez-Gómez, L., & Ahrazem, O. (2014).** Pathogenicity and genetic diversity of Fusarium oxysporum isolates from corms of *Crocus sativus*. *Industrial Crops and Products, 61*, 186-192.

49. **Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Gómez-Gómez, L., & Ahrazem, O. (2009).** Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC Research Notes, 2*(1), 189.

50. **Sang, T., Crawford, D., & Stuessy, T. (1997).** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84(8), 1120-1120.

51. **Saxena, R. B. (2014).** A detailed study of crocus flavi series. *Carib. J. Sci. Tech 2*, 509-518.

52. **Seberg, O., & Petersen, G. (2009).** How many loci does it take to DNA barcode a crocus. *PloS one*, *4*(2), e4598.

53. **Selvi, S. (2005).** Balıkesir İlindeki *Crocus* sp. Türlerinin Taksonomisi, Morfolojisi ve Anatomisi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir.

54. **Simpson, R. J. (2006).** SDS-PAGE of proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2006*(1), pdb-prot4313.

55. **Singh, N., Meena, B., Pal, A. K., Roy, R. K., Tewari, S. K., Tamta, S., & Rana, T. S. (2017).** Nucleotide diversity and phylogenetic relationships among *Gladiolus* cultivars and related taxa of family Iridaceae. *Journal of genetics 96*(1), 135-145.

56. **Somma, M., & Querci, M. (2004).** The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. *TRAINING COURSE ON*, 1.

57. **Şık, L., F. Candan, S. Soya, C. Karamenderes, T. Kesercioğ lu, and B Tanyolaç (2008).** Genetic variation among *Crocus* L. species from Western Turkey as revealed by RAPD and ISSR markers, *Journal of Applied Biological Sciences,* 2 (2): 73-78.

58. **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.

59. **Villa, C., Costa, J., Meira, L., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2016).** Exploiting DNA mini-barcodes as molecular markers to authenticate saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Control, 65*, 21-31.

60. **Vurdu, H. and Çiçek F. F. (1992).** Biyolojik zenginliklerimiz: Çiğ dem (*Crocus* spp.). *Fidan Dergisi,* 57: 2–5.

61. **Vurdu, H. Güney K. and Çiçek F. F. (2003).** Biology of *Crocus oliveri* subsp. *oliveri*. Proceedings of the First International Symposium on Saffron and Biotechnology, *Acta Horticultura,* 650: 71–83.

62. **Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B., Ye, Z.H., Mao, J.X. (1997).** POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, *Canada Google Scholar,* 10.

63. **Yorgancılar, M., Yakışır, E., & Erkoyuncu, M. T. (2015).** Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. *Journal of Bahri Dagdas Crop Research, 4*(2), 1-12.

64. **Yüzbaşıoğlu, S. (2017).** *Crocus tuna-ekimii* (Iridaceae), a new species from Turkey. *Phytotaxa, 314*(1), 110-116.

65. **Yüzbaşıoğlu, S., & Celep, F. (2016).** *Crocus ancyrensis* subsp. *guneri* (Iridaceae), a new subspecies from Turkey. *Phytotaxa, 266*(3), 219-225.

66. **Yüzbaşıoğlu, S., Aslan, S., & Özhatay, N. (2015).** *Crocus thracicus* (Iridaceae), a new species from north-western Turkey. *Phytotaxa, 197*(3), 207-214.

67. **Yüzbaşıoğlu, S., & Özhatay, N. (2014).** A new subspecies of *Crocus pestalozzae* (Iridaceae) from Turkey. *Phytotaxa, 174*(5), 279-284.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı **:** Tuğba Yıldırım

Doğum Yeri ve Yılı **:** Erzincan-1985

Yabancı Dili **:** İngilizce

E-Posta **:** tugbayildirim1@marun.edu.tr

Öğrenim Durumu

Üniversite	Fakülte	Bölüm	Derece	Mezuniyet Yılı
Selçuk Üniversitesi	Eğitim Fak.	Biyoloji Öğr.	Yüksek Lisans	2009

İş Deneyimi

Firma/Kurum	Görevi	Görev Dönemi
Mehmet Rauf MTA Lisesi	Biyoloji Öğretmeni	Devam ediyor

Bilimsel Eserler:

1. Some Autecological Characteristics Of Crocus Flavus Subsp. Flavus From Istanbul-Turkey: Plant-Soil Interactions (Oral Presentation) Ibrahim Ilker Ozyigit, Tugba Yildirim, Asli Hocaoglu

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Yalova
2. WWF-Türkiye (Doğal Hayatı Koruma Vakfı)
3. TEMA (Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı)