

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KUZEY ANADOLU DOĞAL *PRIMULA* L. (PRIMULACEAE) TAKSONLARININ
nrDNA ITS BÖLGELERİ BAKIMINDAN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Uğur UZUNER

**AĞUSTOS 2006
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KUZEY ANADOLU DOĞAL *PRIMULA* L. (PRIMULACEAE)
TAKSONLARININ nrDNA ITS BÖLGELERİ BAKIMINDAN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Uğur UZUNER

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01. 08. 2006
Tezin Savunma Tarihi : 18. 08. 2006**

**Tezin Danışmanı : Doç. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU**

Enstitü Müdürü : Prof Dr. Emin Zeki BAŞKENT

Trabzon 2006

ÖNSÖZ

Kuzey Anadolu’da yayılış gösteren *Primula* L. (Primulaceae) taksonlarının ITS bölgelerine dayalı benzerlik ilişkilerinin araştırıldığı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ’ye, değerli hocam sayın Prof. Dr. Osman BEYAZOĞLU’na, moleküler biyoloji laboratuvarının olanaklarını kullanmama izin veren ve engin bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bu çalışmanın tamamlanmasına katkı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, bitki örneklerinin temininde yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU’na, laboratuvar çalışmaları sırasında tecrübelerinden yararlandığım sayın Yrd. Doç. Dr. Sabriye DÜLGER, Arş. Gör. Yusuf BEKTAŞ’a, Arş. Gör. Fatih Ş. BERİŞ’e, Arş. Gör. Cemal SANDALLI’ya, Arş. Gör. Kadriye İNAN’a bu ve bundan önceki tüm çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı Arş. Gör. Mutlu GÜLTEPE’ye, Hakan KARAOĞLU, Derya YANMIŞ, Esra ERBAŞ ve Melahat ARSLAN’a, Biyoloji Bölümü’nün öğretim elemanı ve idari personeline, bu tezin hazırlanmasında emeği geçen ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan adlarını burada yazamadığım tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Bu aşamaya gelinceye kadar benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen fedakar aileme minnet, şükran, en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Uğur UZUNER

Trabzon 2006

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Literatür Özeti	2
1.2.1. <i>Primula</i> Türlerinde Heterositulus.....	5
1.2.2. ITS (Internal Transcribed Spacer).....	7
1.2.2.1. ITS'nin Genel Özellikleri	9
1.2.2.2. ITS Bölgesinin Filogenetik Analizi.....	11
1.2.2.3. rDNA Çoklu Gen Ailesinin Fonksiyonel Sınırlamaları ve Evolusyonu.....	12
1.2.2.4. Taksonomide Tercih Edilme Nedenleri.....	13
1.2.2.5. Taksonomik Seviyelerde Kullanımı	13
1.2.2.6. rDNA Bölgeleri	13
1.2.2.6.1. Küçük Alt Birim rDNA (SSU).....	14
1.2.2.6.2. 5,8S rDNA	14
1.2.2.6.3. Büyük Alt Birim rDNA (LSU).....	14
1.2.3. Nümerik (Sayısal) Taksonomi	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	16
2.1. Besiyeri Kimyasallar ve Vektörler.....	16
2.2. Materyal Temini ve Saklanması.....	16
2.3. Morfolojik İncelemeler	18
2.4. ITS Bölgesinin Filogenetik Analizi.....	18

2.5.	Yapraklardan Genomik DNA İzolasyonu	20
2.5.1.	Kuru Yapraklardan Genomik DNA İzolasyonu	20
2.5.2.	Yaş Yapraklardan Genomik DNA İzolasyonu	21
2.6.	PCR Uygulamaları	22
2.7.	PCR Uygulamalarının Tekrarlanabilirliği	23
2.8.	Agaroz Jel Elektforezi	23
2.9.	Klonlama ve Baz Dizin Analizi	23
2.10.	Veri Analizi.....	23
2.11.	Modeltest 3.6 İle En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi.....	24
3.	BULGULAR	26
3.1.	Morfolojik Bulgular.....	26
3.2.	Morfolojik Analiz Bulguları	33
3.3.	Moleküler Bulgular	34
3.4.	Maksimum Parsimoni Analizi Bulguları	41
4.	TARTIŞMA	43
5.	SONUÇLAR	48
6.	ÖNERİLER	50
7.	KAYNAKLAR	51
8.	EKLER	56
	ÖZGEÇMİŞ	66

ÖZET

Bu çalışmada 9 *Primula* L. (Primulaceae) taksonuna ait 19 populasyon, nrDNA ITS bölgelerinin polimorfizmi açısından incelenmiştir.

İncelenen bitki materyali, araştırma alanı olarak seçilen Kuzey Anadolu'dan 2005 yılında yapılan arazi çalışmaları ile toplanmıştır. Toplanan örneklerin önce geleneksel yöntemlere göre tanımlamaları yapılmış ve her örnek herbaryum örneği haline dönüştürülmüştür. Daha sonra, ITS profillerinin belirlenmesi amacıyla her populasyondan uygun yöntemlerle hazırlanan yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Populasyon örneklerine ait ITS bölgesi evrensel primerler kullanılarak PCR yoluyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA bölgelerinin baz dizin analizleri yapılmış ve PAUP programıyla değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu çalışılan populasyonlar arası benzerlik ilişkisini ortaya koyan parsimonik ağaç oluşturulmuştur. Moleküler verilerden elde edilen sonuçlar, 26 morfolojik karaktere dayalı kümeleme analizi sonuçları ile karşılaştırılmış ve çalışılan taksonlar arasındaki ilişkiler tam olarak ortaya konulmaya çalışılmıştır.

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

Anahtar Kelimeler: *Primula*, Primulaceae, nrDNA, ITS PCR

SUMMARY

Polymorphism in nrDNA ITS Region of Wild *Primula* L. (Primulaceae) Taxa Distributed in North Anatolia

In this study, 19 populations belonging to 9 wild *Primula* L. (Primulaceae) taxa were investigated with respect to nrDNA ITS regions.

Plant materials used in this study were collected from North Anatolia during the field work in 2005. Vouchers were identified firstly according to traditional methods and stored as herbarium specimens. Genomic DNA's were isolated from healthy leaves of each populations to perform ITS studies. ITS regions of the examined populations were amplified by using universal primers and then sequenced. These ITS bands were aligned to use analysis processes. All ITS sequences were analyzed by using PAUP 4012b software and parsimony tree were formed in order to explain relationships among populations. Molecular evidences inferred from sequencing data were compared with morphological results in order to explore the exact relationships among the examined populations.

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

Keywords: *Primula*, Primulaceae, nrDNA, ITS PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. ITS bölgelerinin genomik DNA üzerindeki yerleşimi	8
Şekil 2. ITS primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri	9
Şekil 3. <i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>vulgaris</i> (A), <i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>sibthorpii</i> (Hoffmanns.) W.W.Sm. & Forrest (B), <i>P. veris</i> L. subsp. <i>columnae</i> (Ten.) Lüdi. (C), <i>P. veris</i> L. subsp. <i>macrocalyx</i> (Bunge) Lüdi (D).	29
Şekil 4. <i>P. megaseifolia</i> Boiss. & Bal. (A), <i>P. elatior</i> (L.) Hill subsp. <i>meyeri</i> (Rupr.) Valentine & Lamond (B), <i>P. auriculata</i> Lam. (C), <i>P. longipes</i> Freyn & Sint. (D)	32
Şekil 5. <i>P. algida</i> Adams.....	33
Şekil 6. UPGMA fenogramı üzerinde <i>Primula</i> populasyonlarının konumu.....	35
Şekil 7. Bazı <i>Primula</i> örneklerinin ITS bölgelerine ait DNA bantları.	36
Şekil 8: ITS bölgelerinin PAUP ile analizi sonucunda elde edilmiş Maksimum Parsimoni ağacı.....	42

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Değişik bitkilere ait ITS1 bölgeleri içindeki korunmuş baz dizin motifleri.....	10
Tablo 2. Araştırmada kullanılan taksonlara ait toplama bilgileri	17
Tablo 3. Araştırmada kullanılan taksonlara ait morfolojik karakterler.....	19
Tablo 4. Nümerik analizlerde kullanılan morfolojik veri matrisi.....	27
Tablo 5. ITS PCR sonucunda elde edilen nükleotit uzunlukları	37
Tablo 6. ITS bölgelerine dayalı örnekler arasındaki benzerlik yüzdeleri	38

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ETS	: External Transcribed Spacer
hLRTs	: Hiyerarşik olasılık oran testleri
IGS	: Intergenic Spacer
KTUB	: KTU Biyoloji Bölümü Herbariumu
mat K	: Maturase K geni
NaOCL	: Sodyum Hipoklorit
NOR	: Nükleolar Organizer Region
nrDNA	: Nüklear ribozomal DNA
NTS	: Non Transcribed Spacer
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVPP	: Polivinilpolipropodilen
RFLP	: Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
snoRNP	: Küçük nükleolar ribonükleoprotein
ss	: Homozigot resesif allel
Ss	: Heterozigot allel
SS	: Homozigot dominant allel
cpDNA	: Kloroplast DNA
RNaz	: Ribonükleaz
ETOH	: Etil alkol/ etanol
nt	: nükleotit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Çalışma konusunu oluşturan *Primula* L. cinsi, Primulaceae familyasının en büyük cinsidir. Primulaceae üyelerinin kökleri özel koku maddeleri içermektedir (Zeybek ve Zeybek, 1994). *Primula* cinsi (Primrose), taksonomistler, ekolojistler, genetikçiler ve bahçıvanlar için birçok yönden araştırma konusu olup, büyük ilgi uyandırmaktadır. Dünyada *Primula* cinsine ait türlerin süs bitkisi olarak yaygın şekilde kültüri yapılmaktadır (Mizuhiro ve ark., 2001). Ortaçağ botanikçileri döneminden beri Avrupa herbaryumlarında olduğu bilinen *Primula*'nın, Darwin'in (1877) heterositulus üzerindeki öncü çalışmasıyla ilk bilimsel kabulü gerçekleşmiştir (Mast ve ark., 2001). Primulaceae familyasında heterositulus ve alternatif sistem homositolus, cins ve cins içi seviyelerde sistematik müdahalelerde önemli rol oynamaktadır (Richards, 1993). Bu cinsin üyeleri, kromozom sayılarındaki ve morfolojilerindeki varyasyon nedeniyle sitotaksonomistlerin de ilgisini çekmektedir. Türkiye'de yayılış gösteren bazı türlerin kromozom sayıları (Ayaz ve İnceer, 2003), polen morfolojileri (Pınar ve ark., 2005) ve anatomik özellikleri incelenmiştir (Beyazoğlu, 1989).

Primula cinsi, dünyada 425 tür ile temsil edilmektedir (Mast ve ark., 2001). Bunların %75'i gen merkezi olarak ifade edilen Himalaya dağ zincirinde ve Batı Çin'de yayılış göstermektedir (Richards, 1993). Bu cinse ait doğada hala tanımlanmamış çok sayıda türün olduğu düşünülmektedir (Richards, 1993). *Primula*'nın üyeleri, çeşitliliğin merkezi olan Asya'nın yüksek dağlarının yanı sıra Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'nın yüksek enlemlerinde, az bir kısmı da Güney Amerika, Etiyopya, Cava adası ve Sumatra'da yayılış göstermektedir (Richards, 1993).

Lamond'a (1978) göre *Primula* cinsi ülkemizde 3 alt cinste yer alan 8 tür ve bu türlere bağlı 11 takson ile temsil edilmektedir. Bunlardan *P. davisii* W.W. Sm ve *P. longipes* Freyn & Sint. taksonları, ülkemizin önemli gen kaynakları içinde yer alan endemik bitkilerdir. Bu endemiklerden *P. longipes*, araştırma bölgemizde de bulunmaktadır. Araştırmaya konu olan türlerin hepsinde heterositulus gözlenmektedir. *P. vulgaris* Huds. türü, araştırma bölgesinde iki alttürle temsil edilmekte ve bu iki takson alttür seviyesinde adlandırılmış olmasına rağmen, araştırma bölgesinde aynı habitat

içerisinde doğal olarak bulunmaktadır ve morfolojik açıdan birbirleriyle oldukça benzerlik göstermektedir. Bu durum, bu taksonları kesin sınırlarla birbirinden ayırmada çoğu zaman güçlükler sebeptir.

Günümüzde bitki türlerinin tanımlanmasında morfolojik karakterin yanı sıra moleküler verilerin kullanılması hız kazanmıştır. Bu amaçla nükleer DNA ve mtDNA'sı üzerindeki birçok özgün bölgeden yararlanılmaktadır. Özellikle daha önceden kullanılan morfolojik karakterlerle çözüme kavuşturulamayan pek çok sistematik problem, bu bölgelerin kullanımı sayesinde aşılabilmektedir. Bu moleküler yöntemlerden birisi de, nrDNA üzerinde yerleşmiş ve çalışılan cinsin sistematik problemlerinin çözümünde güvenilirliği kanıtlanmış moleküler metotlardan birisi olan ITS (Internal Transcribed Spacers) PCR'dır. Yapılan bu türlü çalışmalarda, taksonların nrDNA ITS bölgeleri çoğaltılıp baz polimorfizmine bakılarak taksonlar arasındaki akrabalık dereceleri belirlenmektedir. Geleneksel taksonomik yöntemleri desteklemek amacıyla kullanılan anatomik, morfolojik, sitolojik ve karyolojik verilerin yanında, günümüzde yukarıda sözü edilen moleküler veriler, sıkça kullanılarak çok sayıda takson içeren grupların sistematik problemlerinin çözümüne katkıda bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, araştırma bölgesinde doğal olarak yayılış gösteren bazı *Primula* türlerinin modern sistematikte sıkça kullanılan ve günümüzde oldukça geçerli olan ITS PCR yardımıyla filogenisinin yeniden inşasını sağlamak, bu amaca yönelik olarak taksonlar arasındaki akrabalık ilişkisini ortaya koyabilecek ağaç topolojileri elde etmek, elde edilecek sonuçları morfolojik verilerle karşılaştırmak ve daha sonra gerçekleştirilebilecek çalışmalara sağlam bir zemin oluşturmaktır.

1.2. Literatür Özeti

Primula cinsine ait türlerin % 90'ında heterositus, %10'unda ise homositus gözlenmektedir. Bu durum sadece *Primula* için sınırlı değildir, 28 farklı familyaya ait belli sayıdaki türde heterositusun varlığı belgelenmiştir (Barret ve ark., 2000). Bu karakter, tür seviyesinde *Primula* taksonları için ayırt edici güvenilir bir karakterdir (Kelso, 1991). Buna rağmen heterositus ve homosituslu bazı türler, cinsin aynı seksiyonunda birlikte bulunabilmektedirler (Barret, 1992).

Primula cinsine ait bazı türlerin, halk ilacı ve drog olarak kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle *P. veris* L., *P. vulgaris* Huds. ve *P. elatior* (L.) Hill türlerinin

yaprak ve rizomlarından elde edilen özütlerin diüretik, antispazmodik, ağrı kesici, ateş düşürücü, balgam sökücü, öksürük giderici, sakinleştirici, uykusuzluk hastalıklarını giderici olarak ve soğuk algınlığı, akut ve kronik bronşit hastalıklarının tedavisinde eski tarihlerden bu yana yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Prajapati ve ark., 2003).

Daha önce Kuzey Anadolu Bölgesi'nden toplanan Primulaceae familyasının 5 cinsine (*Anagallis*, *Lysimachia*, *Androsace*, *Primula*, ve *Cyclamen*) ait taksonların kök, gövde ve yaprak anatomileri arasındaki farklılıklar ortaya konulmuştur. Yapılan inceleme sonrasında *Primula* taksonlarında kök yapısında endoderma çeper kalınlaşmalarının diğer cinslerdeki taksonlara nazaran daha fazla gerçekleştiği bulunmuştur (Beyazoğlu, 1989).

Gövde morfolojileri üzerinde yapılan incelemelerde, *Primula* ve *Androsace* Lamond üyelerinde gövde skeyp iken *Anagallis* L. ve *Lysimachia* L. örneklerinde normal dallı gövde yapısının bulunduğu tespit edilmiştir. *Primula*, *Lysimachia* ve *Androsace* örneklerinde iletim demetleri birbirine çok yaklaşarak kapalı bir halka oluşturmaktadır (Beyazoğlu, 1989).

Yaprak anatomisi üzerindeki çalışmalarda *Primula* ve *Lysimachia* örneklerinde palizat parankimasının tek sıra halinde bulunduğu, diğer cinslere ait türlerde ise palizat parankimasının iki sıradan oluştuğu bulunmuştur. *Primula*, *Cyclamen* L. ve *Lysimachia* türlerinin yapraklarında orta damar hakimiyeti mevcutken diğer cins üyelerinde damar hakimiyetinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Beyazoğlu, 1989).

Yaprak vernasyonu, Primulaceae familyasında kullanılan önemli taksonomik bir karakterdir. *Primula* dışındaki çoğu cinste yaprak vernasyonu, involute (tomurcuk içinde yaprakların içe doğru kıvrılması) karakterden değişkenlik göstermeyebilir. Buna rağmen *Primula*'da revolute(yaprakların dışa doğru kıvrılması) ve involute olmak üzere her iki vernasyon tipi oluşabilir (Richards, 1993).

Primula bitkilerinde polen morfolojisi, taksonomik karakter olarak kullanılmaktadır. *Primula* cinsine ait türler için 3 temel polen tipi tanımlanmıştır, bunlar; kolporoidat, stefanokalpat ve sinkalpat' tır (Mast ve ark. 2001). Yakın tarihte yürütülen bir çalışmada Türkiye'de doğal yayılış gösteren 8 *Primula* türü ve bu türler içinde yer alan 7 alttürün polen morfolojileri araştırılmış ve bu taksonlarda polen morfolojilerinin trikalpattan, triparasinkalpat-tetrakalpata doğru değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Pınar ve ark., 2005).

Primula'nın geleneksel sistematik çalışmaları önceleri az sayıda karakterle yürütülmekteydi. Heterositulus ve homositulusa ilave olarak bu karakterler; temel

kromozom sayısı ($x= 8,9,10,11$ ve 12), farinanın (unsu örtü) mevcudiyeti veya yokluğu, yaprak vernasyonu ve polen ekzin morfolojisiydi. *Primula*'daki filogenetik akrabalıkları değerlendirmede onların varsayılan önemine rağmen bu 5 karakter, her zaman diğer örneklerle ilişkili ayırt edici sonuçlar ortaya koymamaktadır. Bu nedenle moleküler örnekleme, bu cinsin taksonlarının filogenetik ilişkilerini test etmede bağımsız filogenetik hipotezler sunabilir (Mast ve ark., 2001).

Rusya'nın Karadeniz kıyıları üzerinde *P. vulgaris* türünün alttür *vulgaris* ve alttür *sibthorpii* taksonları için geçiş zonlarında bulunan karışmış popülasyonlarının biyocoğrafik dağılımı araştırılmış (Kosenko ve ark., 2005). Yapılan incelemeler sonucunda alttür *sibthorpii* popülasyonlarının çalışma bölgesindeki yayışının her geçen gün daha yoğun olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

İsviçre'nin Zürih kentinde yapılan diğer bir çalışmada *Aleuritia* (Duby) Wendelbo seksiyonunun üreme sistemleri, ploidy seviyesi, biyocoğrafik durumlarına bağlı değişimsel hızı araştırılmış, poliploidi, homositulus ve Arktik dağılım arasında önemli derecede bir korelasyonun olduğu bulunmuştur (Guggisberg ve ark., 2005).

2000 yılında yapılan bir çalışmada, ITS ve cpDNA (kloroplast DNA'sı) dizin analizi sonuçları ile *Primula* cinsindeki filogeninin yeniden oluşturulması ve ortaya konulacak bu filogeninin üreme sistemi, morfolojik karakterler, kromozom sayısı ve biyocoğrafik dağılışı arasındaki değişimsel ilişkilerin açıklanmasında kullanılması amaçlanmıştır. Bu hedefe yönelik olarak *Primula*'nın 21 taksonu üzerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, seksiyonlar arasındaki ITS baz dizisi varyasyonunun akrabalıkların çözümünde etkili çok sayıda bilgilendirici veri sunduğu görülmüştür (Conti ve ark., 2000)

Türlere ait ITS baz dizinleri, allopatrik veya ayrı popülasyonlar arasındaki akrabalıkların araştırılması için yararlı deliller sunmaktadır. Örneğin *Calycadenia*'daki allopatrik türlerin bireyleri arasında ITS dizinindeki baz değişimi % 3,7'ye kadar değişiklik gösterirken; *Madiinae* türlerinde ise ITS1 dizin varyasyonu % 21,7 olarak bulunmuştur. Bu varyasyonların belirli sistematik seviyelerde ve alttürler arasında akrabalıkları çözmede bilgilendirici olduğu sonucuna da ulaşılmıştır. Bazı eski bitki gruplarında ise, ITS varyasyonunun düşük seviyelerde olduğu görülmüştür (Baldwin ve ark., 1992).

Sonuçta daha fazla takson örnekleme ve baz dizin analizi için diğer nrDNA bölgelerinden örneğin ETS (External Transcribed Spacer) bölgesi (Baldwin ve Markos, 1999) ve kloroplast DNA bölgelerinden örneğin Maturase K (mat K) geni (Soltis ve ark., 1996; Sang ve ark., 1997) ve IGS (Intergenic Spacer) (Taberlet ve ark., 1991) çoğu

poliploidi ve homositus taksonlar için hibrit orijinlerinin sorunlarını açıklamaya yardımcı olacak, aynı zamanda cinsin her iki atasal ve anasal filogenisini detaylı olarak ortaya koyacaktır. Çünkü filogenetiğin doğruluğu, hem incelenen takson hem de kullanılan karakter sayısına bağlıdır (Graybeal, 1998; Bremer ve ark., 1999). Birkaç DNA bölgesi ve farklı seksiyonlara ait kısmen detaylı örnekleme ve sonuçta cinsin tamamını kapsayan bir çalışma, *Primula*'daki çeşitliliğinin açıklanmasına katkı sağlayacaktır. Bu detaylar, bu büyüleyici cinsten, yetiştirme sistemleri ve çoklu seviyede allopatrik değişimi açıklamak için önemli olacaktır (Conti ve ark., 2000).

1.2.1. *Primula* Türlerinde Heterositus

Primula cinsine ait bitkilerin çoğunluğu heteromorfik çiçeklere sahiptir. Bu özelliğe sahip bitkilerde, kendini dölleme veya iç morfolojik fertilizasyonu azaltan ya da engelleyen diallelik uyumsuzluk sistemi sporofitik olarak kontrol edilmektedir. Heterositus gösteren bitkilere ait çiçeklerin pin (uzun situluslu çiçekler) ve thrum (kısa situluslu çiçekler) adıyla bilinen ve ayrı taksonlar üzerinde gelişen iki formu mevcuttur (Webster ve Gilmartin, 2006).

Thrum bitkiler, korolla tüpünün ağzında gözle görülebilen anterleri ihtiva eden çiçeklere sahiptir. Stigma, kısa bir situlus ve küçük stigmatik papilla yapısından ibarettir ve korolla tüpünün yaklaşık yarı uzunluğunda bulunur. Bu bitkilere ait polenler pin bitkilerinkine göre daha büyüktür. Pin bitkilerde ise, korolla tüpünün ağzında yerleşmiş uzun bir stigma ve uzun stigmatik papillaya sahip çiçekler mevcuttur. Anterler korolla tüpünün yaklaşık yarı yolunda yerleşmiş durumdadır. Polenler ise daha küçüktür. Çiçek morfolojisinde de ayırt edilebilir farklar tespit edilmiştir (Webster ve Gilmartin, 2006).

Primula'daki dış çaprazlamanın gerçekleşmesinde üreme organlarının karşılıklı düzenlenmesine yönelik gözlemler daha 19. yüzyılın ortalarında belgelenmiştir (Webster ve Gilmartin, 2006).

Bunu takiben iki farklı floral morfoloji arasındaki ilgili diğer ayrılıklar, *Primula*'nın değişik türlerinde rapor edilmiştir. Bu farklılıklar;

- Polen büyüklüğü; pin bitkiler tarafından üretilen polen, thrum bitkiler tarafından üretilenden daha küçüktür (Darwin, 1862; Ornduff, 1979; Heslop-Harrison ve ark., 1981).

- Polen sayısı; pin bitkilerdeki anterler, thrum bitkilerdekinden iki kat daha fazla polen üretir (Piper ve Charlesworth, 1986).
- Situlus hücre ve stigmatik papilla uzunluğu; thrum çiçeklerle karşılaştırıldığında pin çiçeklerde situlusta daha uzun hücreler mevcuttur ve daha uzun stigmatik papilla gözlenmektedir (Ganders, 1979; Heslop-Harrison ve ark., 1981).

Stigmatik papilla uzunluğunun, situlus uzunluğu ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Richards, 1993). *P. sinensis*'teki bir mutasyonun; situlus hücre uzunluğunu azaltmasının yanı sıra stigmatik papilla uzunluğunu da kısalttığı bulunmuştur (Mather, 1950). Pin ve thrum bitkilere ait situlus uzunluğundaki farklılıklar, polen sayısı, anter pozisyonu karakterlerinin tümü, S lokusu olarak bilinen ve birbirleriyle ilişkili olan, sırasıyla G, P ve A olarak adlandırılan genler tarafından kontrol edilmektedir (Webster ve Gilmartin, 2006).

- Situlus uzunluğu: kısa bir situlus ve stigma yüzeyindeki kısa bir papillayı G alleli kodlamaktadır (Briggs ve Walters, 1997). Resesif g alleli ise, uzun bir situlus ile daha uzun bir stigmatik papillayı kodlamaktadır.
- Polen Büyüklüğü: thrum bitkilere ait büyük polenleri kodlayan P allelidir. Bu nedenle resesif p alleli, thrum polenlerin çapının yaklaşık 2/3'ü kadar büyüklüğe sahip olan pin polenleri kodlamaktadır.
- Anter pozisyonu: korolla tüpünün ağzında thrum pozisyonunda anterleri kodlayan A allelidir, resesif a alleli ise, tüpün ortalama yarı uzunluğunda anter oluşumunu kodlamaktadır.

Her durumda thrum karakterleri kodlayan alleller dominant iken; pin karakterleri kodlayan alleller resesif karakterlidir. Thrum x thrum çaprazlamaları meydana gelmediği için thrumlar heterozigot *GPA/gpa*'dır. Bu nedenle pin bitkiler homozigot resesif *gpa/gpa* alleleline sahiptir (Webster ve Gilmartin, 2006).

Farklı polen boyutları thrum x thrum ve pin x pin çaprazlama ihtimallerini engellemektedir. Kısa situluslu çiçeklerin büyük polenleri stigma papillalarının aralıklarına uymadığından ve stigmanın çimlenmeyi sağlayıcı özel salgı maddesinin dışında kaldığından çimlenemez. Uzun situluslu çiçeklerin küçük polenleri aynı stigma papillaları aralıklarına uyup stigma üzerine otursa da stigma sıvısı çimlenmeyi engellediğinden döllenme olmaz. Böcekler tarafından yapılan tozlaşmada ancak kısa situluslu çiçeklerin iri polenleri uzun situlus üzerinde, uzun situluslu çiçeklerin küçük polenleri ise kısa situlusun stigmatı üzerinde çimlenebilir (Zeybek & Zeybek, 1994). Pin polenlerin besin

rezervlerinin miktarı, önemli derecede düşüktür ve pin bir polen, thrum bir stigma üzerinde aşağı doğru üreme tüpünü oluşturmak için yeterli besine sahip değildir.

Pin x pin çaprazlamalar meydana gelebilir; fakat frekansı oldukça düşüktür. Thrum polenler ise, pin bir situlus içinde üreme tüpünü oluşturmak için gerekli besin stoğuna sahiptirler. Bu nedenle kısa thrum situluslarda bu yapıyı gerçekleştirmeleri oldukça kolaydır. Ancak daha büyük çaptaki thrum üreme tüpü, thrum bir situlusun yüzeyini delmeyi başaramaz. Buna rağmen pin situlusu delilebilir. Sonuç olarak thrum x thrum tozlaşmasının gerçekleşmesi mekanik açıdan olanaksızdır (Webster ve Gilmartin, 2006). Bu durum autogaminin (kendi kendini dölleme) engellenmesine neden olurken, allogaminin (yabancı veya çapraz dölleme) gerçekleşmesine imkan sağlar. Böylece yeni gen kombinasyonlu bireyler meydana gelerek yeni yayılış alanlarına uyum kolaylaşmaktadır (Zeybek ve Zeybek, 1994).

Pin bitkiler S lokusu için homozigot resesif (*ss*) allelidir, thrum bitkiler ise heterozigot *Ss* allele sahiptir. Engellenmiş kendini dölleme gerçekleşebilmesine rağmen, böyle durumlarda tohum oluşumu ciddi olarak azaltılır (Webster ve Gilmartin, 2006). Homozigot doğru çaprazlama ile thrum bitkiler thrum x thrum bitki arasındaki güçlendirilmiş çaprazlamadan nadiren elde edilir (Weddeburn ve Richards, 1990).

Homozigot *SS* oluşumunu önleyen *S* lokusundaki ilave bir genin mevcut olduğu ileri sürülmektedir (Kurian ve Richards, 1997), ayrıca bu genotipin öldürücü olduğu ispatlanmıştır. Diğer genler *S* lokusu ile ilişkilidir, fakat heteromorfoloji oluşumuna direkt olarak katılmazlar (Webster ve Gilmartin, 2006).

1.2.2. ITS (Internal Transcribed Spacers)

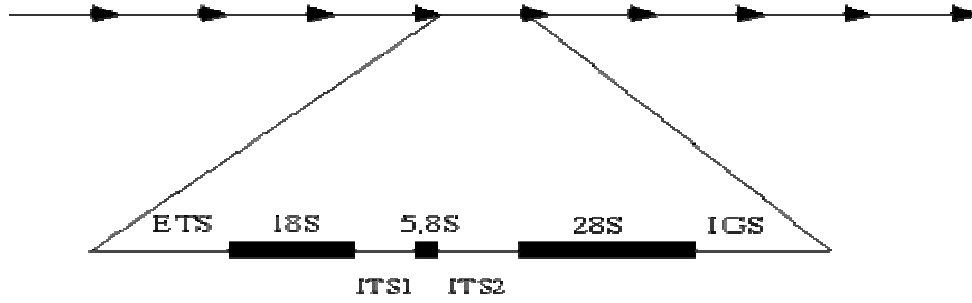
Bazı durumlarda bitki gruplarını doğal ortamlarında tanımlamada ve bir cinsin taksonlarını ayırt etmede zorluklarla karşılaşılabilir. Genellikle kullanılan anahtar karakterleri ya tam ayırt edici olmamakta ya da, gözlem anında belirgin bir durumda değildir. Özellikle kültürü yapılan türlerle, yaban tiplerin akrabalıklarının ortaya konmasında, türlerin teşhisi, toplanması ve korunması sırasında tanımlama büyük önem taşımaktadır (Baldwin ve ark., 1990).

Bitki germ plazması koleksiyonlarında tutulan materyallerin çoğunun yanlış isimle isimlendirildiği anlaşılmıştır (Baldwin ve ark., 1995). Örneğin pancar ve pirinç koleksiyonlarındaki türlerin tanımlanmasında aşırı karışıklıklar rapor edilmiştir. Yapılan

incelemeler, tür ya da alt türlere ait birçok grubun geleneksel metotlar kullanılarak yanlış tanımlanmış olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, taksonlarla ilgili yapılacak tüm bilimsel araştırmalar için öncelikle gerçekleştirilmesi gereken çalışma tam ve doğru teşhistir (Baldwin ve ark., 1995).

Moleküler biyolojideki son gelişmeler, türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesiyle bitki türlerinin tanımlanmasına imkân vermektedir. Buna yönelik olarak, rDNA'nın ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarda sıklıkla başvurulanan yöntemlerden biri haline gelmiştir (Baldwin ve ark., 1995).

Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri, çoklu gen yapılarından oluşur ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklindedir. Şekil 1'de, bu bölgelerin genel yapısı ve genomik DNA üzerindeki yerleşimleri basit olarak şematize edilmiştir.

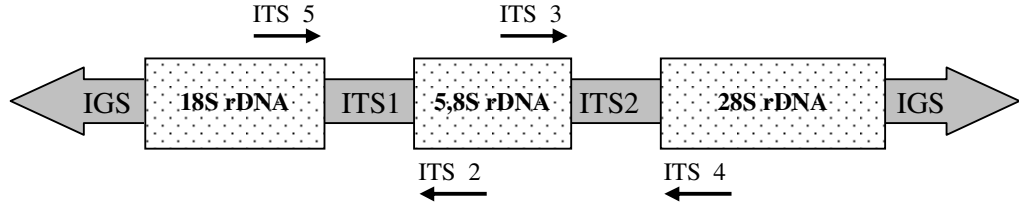


Şekil 1. ITS bölgelerinin genomik DNA üzerindeki yerleşimi

rDNA tekrarları; genomik DNA'nın NOR (Nükleolar Organizer Region) bölgelerinde yerleşmiş durumdadır ve 18S küçük alt birim (Small Subunit), 5,8S ve 28S büyük alt birim (Large Subunit) rDNA'ları kodlayan genlerden oluşmaktadır. ITS bölgeleri, genomik DNA üzerindeki bu rDNA tekrarları içinde yerleşmiştir. Bu bölgeler, rDNA'nın alt birimleri ile transkribe edilmektedir ve korunmuş bölgeleri (18S, 5,8S ve 28S) birbirinden ayıran iki kısımdan (ITS1 ve ITS2) oluşmaktadır (Baldwin ve ark., 1995). Bu ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak PCR alışımlarıyla kolayca elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS (ITS2, ITS3, ITS4 ve ITS5) primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri, Şekil 2'de gösterilmiştir.

rDNA genleri, kopya edilmeyen bölgeler (IGS) ve ITS bölgelerinin varlığıyla birbirinden ayrılmıştır. IGS bölgeleri (ETS ve NTS), komşu rDNA tekrar birimleri arasında yer almaktadır. ETS, ribozomal mRNA ile kodlanan dış kopya bölgesidir ve onun promotor

bölgesini ihtiva etmektedir. NTS (Non Transcribed Spacer) ise, tekrar birimleri arasında yerleşmiş kodlanmayan bölgelerdir (Baldwin ve ark., 1995). ITS1, 18S (SSU) ile 5,8S arasında yerleşmiştir. ITS2 bölgesi ise, 5,8S ile 28S (LSU) genlerini ayıran DNA bölgesidir. Bu gen yapılarını ihtiva eden rDNA tekrarlarının ökaryotik organizmalardaki kopya sayısı, 200-30.000 arasında değişiklik göstermektedir. Bu, bütün genomun yaklaşık % 1 veya daha fazlasını temsil etmektedir. Ayrıca genomik DNA'nın rDNA kopya sayısında ara sıra değişiklikler meydana gelebilmektedir.



Şekil 2. ITS primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri

1.2.2.1. ITS'nin Genel Özellikleri

- Ökaryotik organizmalarda 5,8S gen bölgesi, çoğunlukla ITS bölgeleri ile birlikte değerlendirilir. Bütün bölgenin toplam uzunluğu yaklaşık 700 bp kadardır.
- Bu bölgelerin korunmuş rDNA gen bölgelerine göre daha fazla değişkenlik gösterdiği kanıtlanmıştır.
- ITS1 ve ITS2 bölgelerinin filogenetik açıdan sundukları veriler farklı düzeydedir. Bu bölgelere dayalı analizlerde ITS1 verileri, daha fazla filogenetik çözümler sunmaktadır ve nükleotid içeriği ITS2'ye göre % 29 daha değişkendir.
- Bu bölgeler, rDNA'nın olgun 18S, 5,8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görev almaktadır (Baldwin ve ark., 1995).

1970'lerde DNA dizin analizi çalışmalarının hız kazanmasıyla, rRNA'lar ve komşu bölgeleri üzerindeki sekonder yapı çalışmaları büyük artış göstermiştir. Her tekrar birimi, olgun rRNA'ları oluşturacak olan bir prekürsör (preRNA) olarak kopya edilir (Baldwin, 1992).

ITS1 ve ITS2 bölgeleri ribozomal transkripsiyon ürününün bir parçası olmasına rağmen olgun ribozomal alt birimlerin yapısına dahil edilmezler. Ancak bu bölgeler, rRNA'ların olgunlaşması sürecine katkıda bulunmaktadır (Baldwin, 1992).

preRNA molekülünün çeşitli olgun RNA türlerine dönüşümünü sağlayan transkripsiyon sonrası süreçte her iki ITS bölgesi kesilip çıkarılır ve ortamdaki uzaklaştırılır. ITS bölgelerinin, bazı değişimleri sınırlamalarından nispeten uzak olduğuna inanılmaktadır. Bu durum Insekta'lardan ve Angiosperm'lerden elde edilen ITS bölgelerine dayalı filogenetik analiz sonuçları ile desteklenmektedir (Baldwin, 1999).

ITS1'de meydana gelebilecek delesyon-insersiyon olayları veya nokta mutasyonları, olgun SSU ve LSU rDNA'ların üretimine engel olabilmektedir. ITS2 bölgesinde oluşabilecek bu çeşit mutasyonlar sonucunda da büyük alt birim rRNA'ların oluşumu zarar görebilmektedir. ITS bölgesinin primer yapısında bu çeşit değişiklikler meydana gelmesine rağmen sekonder yapıları ileri derecede korunmuştur.

ITS bölgeleri, değişebilir bölgelerinin yanında korunmuş bölgeler de ihtiva etmektedir. Özellikle ITS1 bölgesinin merkezine yakın kısımlarında değişmeden kalabilen korunmuş bölgelerin varlığı tespit edilmiştir. Tablo 1'de, bazı bitki taksonlarının ITS bölgelerinde yer alan korunmuş bölgelere bazı örnekler verilmiştir (Baldwin, 1999).

Tablo 1. Değişik bitkilere ait ITS1 bölgeleri içindeki korunmuş baz dizin motifleri

Tür Adı	Korunmuş Bölge
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	GGCACG-AAAAGTGTCAAGGAA
<i>Nicotiana rustica</i> L.	GGCGTGAAAAGCGCCAAGGAA
<i>Oryza sativa</i> L.	GGCGCC-GACGGCGTCAAGGAA
<i>Triticum aestivum</i> L.	GGCGCC-GAAGGCGTCAAGGAA
<i>Gossypium longicalyx</i> Hutch. and Lee	GGCGTG-AATTGCGCCAAGGAA
<i>Gossypium robinsonii</i> L.	GGCGCG-AATCGCGCCAAGGAA
<i>Iliamna</i> spp. Rydberg	GGCGCG-AATTGCGCCAAGGAA

Ribozomal yapıdaki domainleri açıklamak için son zamanlarda rRNA-protein etkileşimleri araştırılmıştır. Olgun ökaryotik küçük alt birim rRNA'sı, ribozomun küçük alt birimini oluşturmak için 30 farklı ribozomal ve ribozomal olmayan proteine

bağlanmaktadır. Büyük alt birim sentezi için ise, 5,8S, 28S ve 50 kadar değişik proteinin görev aldığı belirlenmiştir.

Transkripsiyon ve preRNA'ların işlenmesi aşamalarının hepsi nükleolusta gerçekleşmektedir. Ökaryotik preRNA'nın işlenmesi süreci, küçük nükleolar ribonükleoprotein (snoRNP) partiküllerindeki proteinlerle bir arada bulunan küçük nükleolar RNA'ların (snoRNA) bir grubunu gerektirmektedir.

1.2.2.2. rDNA Çoklu Gen Ailesinin Fonksiyonel Sınırlamaları ve Evolusyonu

Yukarıda tanımlandığı gibi ITS bölgesi, ribozomal alt birimleri kodlayan rDNA içindeki gen bölgeleri arasında yer almaktadır. Nüklear DNA'daki bu bölgeler, spesifik kromozomların nükleolar organizatör bölgesinde ard arda sıralanmış tekrarlar şeklinde düzenlenir (Stappen ve ark., 1998). Her tam ünite, olgun 18S, 5,8S ve 26S RNA alt birimleri için işlenen bir prekürsör olarak kopya edilir ve ITS bölgesi, bu rRNA'nın olgunlaşma işlemine yardımcı olur.

Angiospermiler arasında, ITS1'in 5' ve 3' ucuna yakın kısımlarının yüksek derecede değişkenlik gösterdiği ve anlaşılır biçimde hizalanmadığı belirlenmiştir. Fakat merkeze yakın gövde yapıları benzer baz sıralarına sahiptir (Liu & Scharal, 1994). Bu bölgeler, yüksek derecede korunmuş sekonder yapıların oluşumunu sağlayan yüksek oranda G (guanin), C (Sitozin) ve T (Timin) içeriğine sahiptir. Bu nedenle ITS1'in merkezine yakın bir bölgesi, ileri derecede korunmuştur ve büyük bitki familyalarında, hatta tek yıllık ve çok yıllık bitkiler arasında da hizalanabilen bir baz içeriğine sahiptir (Liu & Scharal, 1994). Saç tokası biçimindeki bu küçük motif, 25 bp'den daha az baz içeriğine sahiptir. Bu üç bölgenin birleşimi ile oluşan yapı, ITS'nin primer dizin yapısından ziyade, sekonder yapısının korunmuş olarak kalmasına katkı sağlar ve bu durum, ITS1 bölgesinin sekonder yapı kararlılığını artırır. Baz içeriği açısından daha az değişkenlik gösterdiği bilinen ITS2 bölgesi için, korunmuş bölge yapıları üzerindeki çalışmalar daha az düzeydedir.

Ribozomal genlerin, büyük miktarlarda protein ürününe ihtiyaç duyulması nedeniyle çoklu gen familyası olarak var olduğuna inanılmaktadır (Ohta, 1991). Üstelik protein üretiminde ve DNA'nın işlenmesi aşamasında, ribozomların önemli fonksiyonlarının yanı sıra, rDNA kopyaları arasında tekdüzeliğe gereksinim vardır. rDNA'lar çoğunlukla türler arasındaki çeşitliliğin değişik seviyelerini oluşturan gen sürüklenmesi nedeniyle tür içinde yüksek oranda homojenlik gösterir (Polanco ve ark., 1998). Bir tür içinde rDNA'daki ara

bölgelerin kopyalarında görülen en yaygın varyasyon, basit baz çifti değişimleridir (Baldwin ve ark., 1995). Diğer varyasyonlar, ara bölgelerin küçük bir oranında meydana gelen insersiyon – delesyon olaylarını içerir. Bireylere ait kopya tekrarları arasındaki homojenite, gen dönüşümü ve eşit olmayan krossingover olayları sayesinde baz varyasyonu ile sonuçlanır (Li, 1997; Hurst ve Smith, 1998). Bu mekanizmalar sayesinde rDNA kopyaları özdeşleştirilir ve gen sürüklenmesi nedeniyle bir tür boyunca dağıtılır.

Gen dönüşümü, bir dizinin kendini değiştirmeden etkileşime girdiği diğer dizini bir şekilde transforme ettiği zaman meydana gelir. Bu durum, olası beş yoldan biriyle gerçekleşir; aynı lokusta iki allel arasında, iç kromatik değiş tokuş sırasında, kardeş kromatidlerin birbirlerini etkilemesi durumunda, homolog kromozomların allelik olmayan lokuslarında veya homolog olmayan kromozomlar arasında veya gen kopyaları arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Gen değişiminin, kromozom replikasyonundan hemen sonra bu olayların meydana gelmesi ile gerçekleştiği kabul edilir. Tek bir gen değişimi sırasında transfer edilen DNA miktarı büyük oranda değişiklik gösterebilir, fakat genlerin sayısında bir değişiklik meydana gelmez. Kromozomlar arasındaki ve içindeki değişiklikler çok yüksek dizin benzerlikleri gerektirmez ve kopyalanan ve elde edilen DNA sırasında bazen üstünlük görülebilir. Bu durum, kopyalanmış genlerin homojenizasyonuna yol açan gen değişiminin tekrarlayan döngüleri olarak ifade edilir.

1.2.2.4. ITS'nin Taksonomide Tercih Edilme Nedenleri

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

- Filogenetiğin yeniden inşasında yeterli veri sunacak kadar uygun bir büyüklüğe sahiptir (600-700bp).
- Cins ve tür içi seviyelerde ileri derecede korunmuş olan rDNA gen bölgelerine komşu olarak bulunmaktadırlar.
- PCR ile çoğaltılarak karşılaştırılmaları için büyüklüğü son derece elverişlidir.
- rDNA gen bölgelerine göre daha hızlı nükleotit baz değişimi gösterirler.
- Cins ve tür seviyesindeki filogenetik çalışmalarda DNA içerikleri, açıklayıcı bilgiler sunmaktadır.
- Genomik DNA üzerinde yüksek kopya sayısına sahiptirler.

Bu bölgelerin evrenselliği, alt birim unsurları ve bölgeler arasındaki farklı baz varyasyon oranları nedeniyle, sistematikte kullanılmaları yaygınlaşmıştır.

1.2.2.5. Taksonomik Seviyelerde Kullanımı

İki kopya bölgesi (ITS1 ve ITS2), yakın akraba olan taksonların karşılaştırılmasındaki kullanışlılığı nedeniyle, daha 1990'lı yıllarda hızlı bir şekilde çalışılmaya başlanmıştır. Mevcut veriler, ITS baz dizilerinin, Angiosperm'lerde değişik seviyelerde filogenetik açıdan kullanışlı olduğunu göstermektedir. Bu veriler, genetik sürüklenmelere yönelik etkili sinyaller ortaya koymaktadır (Baldwin ve ark., 1992).

Bitki sistematikindeki karşılaştırmalarda ve filogenetik analizlerde kullanılmak üzere, GENBANK veri bankasına 20 Haziran 2006 tarihine kadar, yalnızca yeşil bitkiler için 3016 adet ITS nükleotit baz sırası kaydı gerçekleştirilmiştir.

Bazı bitki gruplarında ITS1 ve ITS2'de yüksek oranda varyasyonla karşılaşılırken, bazılarında ise, nükleotit varyasyonunun az bir dizisine rastlanılmaktadır. Aynı toplam DNA değerlendirmelerinde; çoğu grupta ITS dizilerinin, cpDNA baz dizilerinden çok daha fazla değişkenlik gösterdiği ve daha bilgilendirici olduğu sonucuna varılmıştır (Baldwin ve ark., 1999).

ITS bölgelerinin, hibrit taksonlara yönelik filogenetik analizlerde kullanılması uygun görülmemektedir. Çünkü hibritlerden elde edilecek ITS bölgelerinin hangi atasal genomdan çoğaltıldığı bilinmemesi, güvenilir olmayan değerlendirmelere neden olacaktır (Baldwin ve ark., 1995).

rDNA tekrarlarının yüksek kopya sayısı nedeniyle (hücre başına 30.000'e kadar), ona göre küçük ebatla olan ITS bölgelerini PCR ile çoğaltmak oldukça kolaydır. Bu durum ITS bölgelerini filogenetik ve biyocoğrafik araştırmalar için ilgi çekici bir hale getirmektedir (Baldwin ve ark., 1992).

1.2.2.6. rDNA Bölgeleri

1.2.2.6.1. Küçük Alt Birim rDNA (SSU)

Küçük alt birim rDNA'sı yüksek derecede korunmuş DNA bölgelerinden biridir ve alem, şube ve sınıf seviyesindeki kategorilerde filogenetik çalışmaların yeniden inşası için

yoğun olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar 4000'den daha fazla takson için, bu bölgeye ait DNA baz sırası belirlenmiştir. Küçük ve büyük alt birim rDNA nükleotit baz sıralarında aşırı korunmuş ve değişebilir bölgelerin bulunması, ilgili özel sorular için optimal filogenetik cevaba izin veren bir dizi oranlar sağlamaktadır.

Küçük alt birim rDNA baz sıraları, ata soyların belirlenmesinde, temel ökaryot ve fungal soylar arasında, Angiospermiler içinde, hayvanların düzenlenmesi gibi farklı taksonomik seviyelerde filogeninin yeniden inşasında kullanılmaktadır (Baldwin ve ark., 1992).

1.2.2.6.2. 5,8S rDNA

rDNA tekrar birimleri içinde en küçük uzunluğa sahip olanı, 5,8S nüklear DNA'sıdır. rRNA'nın büyük alt biriminin bir parçasıdır ve lokus uzunluğu ile nükleotit içeriği ileri derecede korunmuştur. Bu bölgeye ait baz uzunluğu, arzu edilen kullanılabilir bir büyüklüğe sahip olmadığı (163-164 bp) ve filogeniye yeterli derecede veri sağlamadığı için, bu tip filogenetik çalışmalarda tek başına kullanılmaları uygun görülmemektedir. Bu nedenle nükleotit baz değişimlerinden, ITS bölgeleriyle birlikte değerlendirilmesi yoluyla yararlanılmaktadır (Baldwin ve ark., 1992).

1.2.2.6.3. Büyük Alt Birim rDNA (LSU)

Küçük alt birim rDNA'ya göre daha uzun yapıdadır ve baz içeriği açısından daha fazla varyasyon gösterir. Büyük alt birim rDNA'sı çok farklı alt birimlere sahiptir. Bu nedenle filumlar arasında önemli derecede gen varyasyonu gösterirler.

Küçük ve büyük alt birim rDNA'sı üzerinde değişebilir bölgeler veya yayılan segmentler olarak adlandırılan domainler mevcuttur. Ancak bu bölgelerdeki genişlemeler; rDNA baz dizinlerinin, akraba türleri ayırt etmede kullanılması için yeterli veri sunmamaktadır. Bu nedenle rDNA genlerinin gösterdiği varyasyonlardan, aile ve daha yukarı seviyelerde faydalanılmaktadır (Baldwin ve ark., 1992).

rDNA tekrarlarının ITS ve IGS bölgeleri, yüksek oranda varyasyon göstermeleri bakımından cinsler arasında, tür seviyesinde ve populasyonların çalışılmasında karşılaşılan taksonomik problemleri çözmeye kullanılmaktadır. Ancak IGS (4-5kb) bölgelerinin ITS bölgelerine göre daha uzun parçalara sahip olması ve dizin analizindeki zorluk nedeniyle,

filogenetik çalışmalarda çoğunlukla ITS bölgeleri tercih edilmektedir (Baldwin ve ark., 1992).

Yapılan RFLP çalışmaları, bu ara bölgelerin son 50 milyon yıl içinde ayrılmış olan yakın akraba taksonlar arasındaki filogeniyi ortaya koymada kullanılabileceğini göstermiştir (Baldwin ve ark., 1992).

1.2.3. Nümerik (Sayısal) Taksonomi

Bitkilerin morfolojik özelliklere göre sınıflandırılması Linnaeus (1753)'nin çok daha öncesindeki döneme kadar gitmektedir. Geçmişten günümüze kadar bitkilerin sınıflandırılmasında kullanılan yöntemler önemli gelişmeler göstermiştir. Bu gün bitki sistematğinde karşılaşılan problemlerin çözümünde birçok yöntemden faydalanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi de nümerik taksonomidir. Nümerik taksonomi, kısaca sınıflandırma işlemlerinin sayısal verilere dayandırılarak ifade edilmesi olarak tanımlanabilir (Sneath ve Sokal, 1973). Nümerik taksonomik çalışmalarda genellikle her tür karakter kullanılabilir. Bu karakterler arasında kimyasal karakterler, kromozom karakterleri, genetiksel, mikro ve makromorfolojik karakterler ve hatta genetik karakterler sayılabilir. Sınıflandırmanın çok sayıda karaktere dayandırılması, elde edilecek sonuçların güvenilirliğini artırması bakımından önemlidir. Bu nedenle nümerik analizlerin, çok sayıda karakter kullanılarak gerçekleştirilmesine çaba gösterilir.

Nümerik taksonomide kullanılan analizler kümeleme ve ordınasyon analizleri olmak üzere ikiye ayrılır (Podani, 1994) Bunlardan kümeleme analizleri, çalışılan populasyon, alttür, tür veya tür üstü kategorileri benzerlik veya farklılıklarına göre gruplandırır. Bu gerçekleştirilirken de öncelikle kullanılan karakterlerden yararlanılarak bir benzerlik matrisi oluşturulur ve bu benzerlik matrisinden hareket edilerek çalışılan örnekler gruplandırılır. Ordınasyon analizlerinde ise, çalışılan örnekler arasındaki varyasyon miktarı ve bu varyasyonu en iyi açıklayan karakterler tespit edilmeye çalışılır (Podani, 1994).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Besiyeri Kimyasallar ve Vektörler

Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve alındıkları firma adları aşağıda verilmiştir. Phenol:chloroform: isoamyl alcohol, agarose, bromophenolblue, ethidium bromide, RNase A, yeast extract, ammonium acetate, isoamyl alcohol kimyasalları Sigma, pGEM-T Easy Klonlama kiti ise, Promega firmasından temin edilmiştir.

CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide), Sigma, MJ33, LB (Luria Broth) Broth, Sigma, L2542, ammonium acetate, Sigma, A1542, TE (10 mM Tris HCL, pH: 8,3, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 1 mM, pH:8,0), PVPP (polyvinylpolypyrrolidone), Sigma, P6755, tris (2-aminoethyl) amine agarose, Sigma, A1579, yeast extract, Sigma, Y1327, NaCl (Sodyum chloride), Sigma, S6191, IPTG (isopropyl B- D -1- thiogalactopyrsonide), Sigma, 59740.

2.2. Materyal Temini ve Saklanması

Çalışmada kullanılan bitki materyali, 2005 yılı vejetasyon dönemi olan Mart-Ağustos aylarında yapılan arazi çalışmaları ile toplanmıştır. Toplanan örneklerle ilgili arazi çalışmaları, Kastamonu, Erzurum, Trabzon, Rize, Artvin ve Gümüşhane illerinde, 11 farklı istasyonda gerçekleştirilmiştir. Çalışma konusunu oluşturan populasyon örneklerine ait toplama bilgileri, Tablo 2’de verilmiştir.

Çalışmalar sırasında toplanan örneklerde, olgun bir bitkiye ait bitki kısımlarının bulunmasına dikkat edilmiştir. Örnekler toplanırken, kurduğunda değişebilecek fakat teşhis için önemli olan özellikler ayrıca kaydedilmiştir. Numaralandırılmış örnekler laboratuarda presler içerisinde sıkıştırılarak kurutulmuş ve herbaryum örneği haline getirilmiştir. Herbaryum örneği halindeki örnekler, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu’nda (KTUB) saklanmaktadır. Arazi çalışması sırasında toplanan her örneğe numara verilmiş ve o örnekle ilgili toplama bilgileri kaydedilmiştir. Ayrıca numaralandırılmış her örnekten, DNA izolasyonunda kullanılmak üzere taze yaprak örnekleri alınmıştır. Bu örnekler, % 10’luk sodyum

hipoklorit (NaOCl) ve % 70'lik etanol (ETOH) serilerinden geçirildikten sonra kurumaya bırakılmış ve daha sonra gerçekleştirilecek çalışmalar için -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

Tablo 2. Araştırmada yararlanılan bitkilere ait toplama bilgileri

Populasyon No	Tür adı	Toplandığı yer
1	<i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>vulgaris</i>	A7 Trabzon: Beşikdüzü, Yeni Camii Köyü, 01 v 2005, 970 m, Uzuner P11, KTUB
2	<i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>vulgaris</i>	A7 Trabzon: Beşikdüzü, Yeni Camii Köyü, 01 v 2005, 970 m, Uzuner P12, KTUB
3	<i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>sibthorpii</i> (Hoffmanns.) W.W.Sm. & Forrest	A7 Trabzon: Beşikdüzü, Yeni Camii Köyü, 01 v 2005, 970 m, Uzuner P13, KTUB
4	<i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>vulgaris</i>	A4 Kastamonu: Bozkurt, 11 v 2005 1200 m, Uzuner P15, KTUB
5	<i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>vulgaris</i>	A4 Kastamonu: Bozkurt, 11 v 2005 1200m, Uzuner P16, KTUB
6	<i>P. vulgaris</i> Huds. subsp. <i>sibthorpii</i> (Hoffmanns.) W.W.Sm. & Forrest	A4 Kastamonu: Bozkurt, 11 v 2005 1200 m, Uzuner P17, KTUB
7	<i>P. veris</i> L. subsp. <i>columnae</i> (Ten.) Lüdi in Hegi.	A7 Trabzon: Çaykara, Ablaryas Yaylası, 01 vi 2005, 2052 m, Uzuner P18, KTUB
8	<i>P. veris</i> L. subsp. <i>macrocalyx</i> (Bunge) Lüdi	A9 Artvin: Karagöl, 08 vi 2005, 1950 m, Uzuner P22, KTUB
9	<i>P. elatior</i> (L.) Hill subsp. <i>meyeri</i> (Rupr.) Valentine & Lamond	A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 24 vii 2005, 2850 m, Uzuner P26, KTUB
10	<i>P. elatior</i> (L.) Hill subsp. <i>meyeri</i> (Rupr.) Valentine & Lamond	A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 28 v 2005, 2920 m, Uzuner P29, KTUB
11	<i>P. megaseifolia</i> Boiss. & Bal.	A7 Trabzon: Beşikdüzü, Şahmelik Köyü, 10 iv 2005, 450 m, Uzuner P6, KTUB
12	<i>P. megaseifolia</i> Boiss. & Bal.	A8 Trabzon: Araklı, Sularbaşı Köyü, 14 iv 2005, 1120 m, Uzuner P7, KTUB
13	<i>P. longipes</i> Freyn & Sint.	A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 24 vii 2005, 2850 m, Uzuner P25, KTUB
14	<i>P. longipes</i> Freyn & Sint.	A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 28 v 2005, 3067 m, Uzuner P27, KTUB
15	<i>P. auriculata</i> Lam.	A7 Gümüşhane: Kadırğa Yaylası, 13 vi 2005, 2150 m, Uzuner P20, KTUB
16	<i>P. auriculata</i> Lam.	A8 Erzurum: İspir, Moryayla, 21 x 2005, 2450 m, Uzuner P30, KTUB
17	<i>P. algida</i> Adams	A9 Ardahan: Posof, Gönülaçan, 09 vi 2005, 2130 m, Uzuner P23, KTUB
18	<i>P. algida</i> Adams	A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 24 vii 2005, 2850 m, Uzuner P24, KTUB
19	<i>P. algida</i> Adams	A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 28 v 2005, 2920 m, Uzuner P28, KTUB

2.3. Morfolojik İncelemeler

Morfolojik incelemeler herbaryum materyalleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için önce tür teşhisinde önemli rol oynayan karakterler belirlenmiştir. Bitkilerin teşhisinde, başta Türkiye Florası (Lamond, 1978) olmak üzere, Avrupa Florası (Valentine ve Kress, 1972), Rus Florası (Federov, 1965) ve İran Florası (Rechinger, 1970)'ndan da yararlanılmıştır. Yapılan teşhisler sonunda, toplanan populasyon örneklerinin, Tablo 2'de verilen 9 *Primula* taksonuna dahil olduğu tespit edilmiştir. Teşhislerde faydalanılan morfolojik karakterler, Stereo-binoküler mikroskop altında yapılan incelemelerle tespit edilmiştir.

Toplanıp teşhis edilen taksonlar üzerinde ayırt edici nitelikte olduğu düşünülen 26 morfolojik karakter tespit edilmiştir. Belirlenen karakterlerden 18 tanesi kantitatif nitelik taşıırken, diğer 8 tanesi var yok esasına dayalı binary özellik göstermektedir. Türlerle ilişkili olarak nümerik analizlerde kullanılmak üzere belirlenmiş spesifik karakterler Tablo 3'de verilmiştir. Bu karakterlere ait veri matrisi oluşturulmadan önce, her bir takson örneği üzerinde en az 6 (6-10) ölçüm gerçekleştirilmiştir.

2.4. ITS Bölgesinin Filogenetik Analizi

ITS bölgesinin filogenetik analizi 4 adımda gerçekleştirilmektedir.

- Genomik DNA izolasyonu,
- ITS bölgesinin PCR ile çoğaltılması,
- DNA'nın direkt dizin analizi ile okunması veya klonlama sonrasında okuma,
- DNA analizleri,
 - a) ITS baz sıralarının hizalanması,
 - b) Filogenetik analizlerin gerçekleştirilmesi,

Günümüzde ITS bölgesinin PCR ile çoğaltılması, yakın akraba türlerin ve populasyonların filogenetik analizi için popüler bir seçenek durumundadır. ITS bölgelerinin bu popülerliği korunmuş rDNA bölgelerine bağlanabilen evrensel primerlerin üretilmesiyle artmıştır. ITS baz sıralarının analizi sonucunda elde edilen veriler, taksonomik kategorilerdeki mevcut problemlerin çözümünde önemli katkılar sağlamaktadır. Genellikle taksonlara ait ITS

varyasyonlarına bakılarak ilgili taksonların akrabalıkları belirlenmeye çalışılır (Baldwin ve ark., 1995).

Tablo 3. Araştırmada kullanılan taksonlara ait morfolojik karakterler

Değişkenler	Karakterlerin Adı	Birimi
X ₁	Bitkinin boyu	cm
X ₂	Yaprak eni	cm
X ₃	Yaprak boyu	cm
X ₄	Taban yaprak sayısı	adet
X ₅	Yaprak uç kısmının şekli	sivri:1, küt: 0
X ₆	Yaprak alt yüzeyindeki basit tüy durumu	var:1, yok: 0
X ₇	Yaprak kenarlarının dişliliği	var:1, yok:0
X ₈	Brakte boyu	cm
X ₉	Brakte sayısı	adet
X ₁₀	Braktelerin uç kısmının şekli	sivri:1, küt: 0
X ₁₁	Pedisel boyu	cm
X ₁₂	Çiçek durumundaki çiçek sayısı	adet
X ₁₃	Kaliks boyu	cm
X ₁₄	Korolla boyu	cm
X ₁₅	Kaliksın uç kısmının şekli	sivri:1, küt: 0
X ₁₆	Kaliks tüpünün uzunluğu	cm
X ₁₇	Korolla tüpünün uzunluğu	cm
X ₁₈	Korolla tüpünün kaliks tüpüne oranı	X ₁₂ /X ₁₃
X ₁₉	Kaliks dişlerinin uzunluğu	mm
X ₂₀	Kaliks dişlerinin kalikse oranı	X ₁₅ /X ₁₃
X ₂₁	Skeyp durumu	var:1, yok:0
X ₂₂	Skeypte basit tüy durumu	var:1, yok:0
X ₂₃	Kapsül büyüklüğü	mm
X ₂₄	Kapsülün kalikse göre durumu	uzun:1, eşit veya kısa: 0
X ₂₅	Bitki boyunun taban yaprak sayısına oranı	X ₁ / X ₄
X ₂₆	Situlus uzunluğu	mm

2.5. Yapraklardan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için arazi çalışması sırasında seçilmiş ve -20 °C'de depolanmış olgun, sağlam ve yaş *Primula* yaprakları ile preslenerek suyu uzaklaştırılmış ve herbaryum örneği haline getirilmiş örneklerden alınan kuru yapraklar kullanılmıştır. Mevcut çalışmanın temel materyalini teşkil eden bitki DNA'larının izole edilmesinde, iki farklı metottan faydalanılmıştır. Yaş yapraklardan DNA izolasyonu için kısmi değişikliğe uğratılan Lodhi metodundan (Beriş, 2001); kuru yapraklardan izolasyon için ise Soltis (Doyle & Doyle, 1987)'in DNA izolasyon metodundan faydalanılmıştır. İzole edilen DNA'lar, daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere fenol ekstraksiyonu ile temizlenmiştir. Her iki yöntem de kullanılarak türlere ait DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir, ancak kuru yapraklardan yapılan izolasyonlardan daha olumlu ve kararlı sonuçlar alındığı için çalışmada bu yöntemden daha fazla yararlanılmıştır.

2.5.1. Kuru Yapraklardan Genomik DNA İzolasyonu

Araştırmada kullanılan bitkilere ait DNA izolasyonlarının büyük çoğunluğu kuru yapraklardan izolasyonla gerçekleştirilmiş geri kalan bölümünde yaş yapraklar kullanılmıştır.

Her bir örnek için daha önceden seçilmiş taze ve olgun yaprakların kurutulmuş olanlarından 0,025 gr tartılarak cam kumu kullanılarak bir havan içerisinde öğütüldü. Toz haline getirilmiş yaprak numuneleri bir ependorf tüpüne transfer edildi. Üzerine önceden hazırlanmış CTAB tamponundan 500 µl eklendikten sonra, bu haldeki ekstrakta her bir örnek için 0,02 gr PVPP (polyvinylpolypropodylene) ve 10 µl β-merkaptolanol ilave edildi. Karışım bir pipet yardımıyla homojenize edildikten sonra 65°C'de 4 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alınarak 1 dak soğumaya bırakıldıktan sonra, oda sıcaklığında örnekler 10.000 - 14.000 rpm'de 1dak santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş örnekler üzerine 500 µl kloroform eklendikten sonra ve tüpler homojen olana kadar alt üst edildi, ardından aynı hızda 1 dak santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant kısım alınarak yeni tüplere aktarıldı, üzerine yeniden 500 µl kloroform ilavesi gerçekleştirildikten sonra tüpler 3 - 5 kez alt üst edildi ve aynı hızda 1 dak santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj ardından süpernatant kısım alınarak bir önceki aşama aynen tekrarlandı, daha sonra üst faz alınarak yeni bir ependorf tüpüne transfer edildi.

Tüplerden hacmi en fazla olanın kapasitesi belirlendi ve bu hacim baz alınarak diğer tüplere eşit oranda hacmin % 8'i kadar her tüpe 7,5 M Amonyum Asetat ilavesi yapıldı, tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra oluşan hacmin % 54'ü kadar izopropanol ilavesi yapıldı ve süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra +4°C'de en az 2 saat bekletildi (daha iyi bir sonuçlar için bir gece bekletilmesi tavsiye edilir).

Bir gece +4 °C'de bekletilen örnekler 3 dak önceki hızda (10.000 - 14.000 rpm'de) santrifüj edildi, süpernatant kısım atıldıktan sonra, şeffaf pellet üzerine 1ml % 70'lik etanol ilavesi yapıldı, tüpler birkaç defa alt üst edildikten sonra oda sıcaklığında 10-15 dak bekletildi. Alkol ilave edilmiş tüpler 3 dak önceki hızda (10.000 - 14000 rpm'de) santrifüj edildi, süpernatant döküldükten sonra tüm alkolün DNA dan uzaklaştırılması için tüpler kapakları açık şekilde 15 dak 37°C'de kurumaya bırakıldı. Daha sonra tüplerde bulunan DNA pelleti, 50 µl TE ilavesi ile çözüldü. Pelletin tamamen çözülmesi için örnekler, 15 dak 65°C'de su banyosunda tutuldu, ortamda bulunan RNA'ların uzaklaştırılması için her 100 µl'lik hacim için 1 µl RNaz ilavesi gerçekleştirildi.

2.5.2. Yaş Yapraklardan Genomik DNA İzolasyonu

Yaş yapraklardan DNA izolasyonu yapılması düşünülen yaprakların olgun, taze ve yeşil olmasına özen gösterilmiştir. İzolasyon yapılacak yaprakların toz ve yabancı maddelerden temizlenmesi sağlanmış ve orta damarları kesilerek alınmıştır. Bu yapraklardan 1gr tartılmış ve bir havan içerisinde gerekli miktarda sıvı azot kullanılarak ezilerek öğütülmüştür. Toz halindeki yaprak örnekleri 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine 5 ml ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Sonrasında polipropodilen tüpe 100 mg PVPP (sigma, P6755) eklenecek karıştırıldı (100 mg PVPP/g yaprak). Karışımı ihtiva eden tüpler 65°C'de 4 saat su banyosunda bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her bir tüpe 6 ml kloroform-izoamilalkol ilavesi yapıldı, tüpler 20 - 25 kez hafifçe alt üst edildikten sonra 6000 rpm'de 15 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin üst kısmında oluşan faz yeni tüplere aktarıldı, faz rengi berraklaşınca kadar bir önceki adımda bahsedilen kloroform ilavesi ve sonraki aşamalar en az üç kez tekrarlandı. Kloroform muamelesi sonrası elde edilen çözeltiliye, hacminin yarısı kadar 5 M NaCl eklendikten sonra ve birkaç kez hafifçe alt üst edildi.

Son durumdaki hacmin iki katı kadar % 96'lık soğuk etanol (-20°C) eklenerek DNA iplikçiklerinin oluşması amacıyla 2 saat veya daha uzun bir süre için buzdolabında (+4°C'de) bekletildi. Oluşan DNA ipliklerinin çöktürülmesi amacıyla sırası ile 3000 ve 5000 rpm'de 3 dak santrifüj edildi. Süpernatant kısım döküldü, ardından DNA ipliklerinin mevcut protein ve fenolik bileşiklerden arındırılması için %70'lik soğuk etanol ilavesi gerçekleştirildi. Tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra 5000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası etanol kısım (üst faz) atıldı, etanolun DNA ipliklerinden tümüyle uzaklaştırılması için 37°C'de 15 dak kurumaya bırakıldı. Tüplerin tabanında pellet halde bulunan DNA iplikleri 100 - 200 µl TE tamponu ilavesi ile çözüldü, daha sonraki kullanımlar için 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi. Her 100 µl'lik DNA solusyonuna ortamdaki RNA'ların uzaklaştırılması amacıyla 1 µl RNaz A ilavesi gerçekleştirildi, enzimin optimizasyonu için tüpler 37°C'de 15 dak bekletildi.

2.6. PCR Uygulamaları

İzole edilmiş DNA'lardan ITS bölgelerinin çoğaltılması için evrensel ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ve ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG G - 3') primerleri kullanılmıştır. Bu primerler yardımıyla, rDNA gen tekrarları arasında kalan ITS1, 5,8S ve ITS2 bölgeleri PCR yoluyla çoğaltılmıştır. Filogenetik açıdan daha fazla açıklayıcı bilgiler sunması nedeniyle bu üç bölge birlikte değerlendirilmiştir. Çift zincirli DNA üzerinden bu bölgelerin çoğaltılması 200 µl'lik tüplerde; 10X'lik reaksiyon tamponundan 3 µl, 2,5 mM MgCl₂'den 3 µl, 0,25 mM dNTP'den 5'er µl, 50 ng/µl her bir primerden 1 µl, 1 ünite Taq DNA polimeraz (Promega) ve yaklaşık olarak 50-100 ng kalıp DNA'dan 2 µl içeren karışım distile su ile 50 µl son hacme tamamlanarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan PCR denemeleri sonucunda belirlenen en uygun çoğaltılma şartları ve 36 döngüde gerçekleştirilen termal döngü protokolü;

94 °C'de 2 dak DNA çift zincirinin ayrılması (ön denatürasyon),

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

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

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

Toplam 36 döngü,

72 °C'de 10 dak son uzatma (final extension) şeklinde düzenlenmiş ve PCR uygulamaları Biometra Personal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.7. PCR Uygulamalarının Tekrarlanabilirliği

PCR koşullarının tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla, örnekler için çoğaltma işlemi birbirinden bağımsız olarak iki kez tekrar edilmiştir. PCR uygulamalarında olası bir kontaminasyonu engellemek için her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla, her gruba ait elektroforez işlemlerinde, 100 bp bantlar ihtiva eden DNA Ladder kullanılmıştır.

2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin elektroforezi, 5 µl yükleme tamponu (% 50 gliserol, % 0,05 bromofenolblue, 0,2 M EDTA) eklenerek agaroz jel ortamında yapılmıştır. On iki hücreli jel tepsi kullanılarak, % 1'lik agarozda, IX TAE (Trizma Base, Glacial Asetik Asid, EDTA) tamponunda 30 dak süre ile 96 voltta yürütülen örnekler, 0,25 µg/ml etidium bromid ile boyanmış ve UV ışığı altında Polaroid tip siyah-beyaz filmle görüntülenmiştir.

2.9. Klonlama ve Baz Dizin Analizi

Evrensel primerler kullanılarak genomik DNA'dan çoğaltılacak olan ITS bölgeleri, pGEM-T Easy vektörüne yapıştırılarak *E. coli* JM101 suşuna aktarılmıştır. Doğruluğu teyit edilen klonlardan "Promega Plazmit DNA İzolasyon kiti" kullanılarak plazmid izole edilmiş, ardından her taksona ait ITS bölgelerinin DNA dizin analizi gerçekleştirilmiştir.

2.10. Veri Analizi

Taksonlar arasındaki ilişkilerin ortaya konmasında iki farklı analiz gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki morfolojik temelli karakterlerin ölçümüne dayanan Nümerik (Sayısal) analizdir. Bu amaçla, araştırılan tüm populasyon örnekleri üzerinde 26

morfolojik karakter belirlenmiş ve bu karakterlerden elde edilen ölçümlerin ortalama değerleri, Tablo 2’de veri matrisi halinde verilmiştir.

Elde edilen bu veri matrisi, sayısal analiz yöntemlerinden Kümeleme Analizi (CA) yardımıyla değerlendirilmiştir. Analizlerde geleneksel taksonomik sonuçlara en uygun kümelemeyi veren UPGMA algoritması kullanılmıştır. Morfolojik analizler, Syn-Tax-pc (v.5,0) bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır (Podani, 1993).

Diğer analizi ise, rDNA ITS bölgelerine ait baz dizilerinin PAUP*4.012b (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) paket programı kullanılarak değerlendirilmesi oluşturmaktadır. Bu analiz işleminin gerçekleştirilebilmesi için, aşağıdaki şu işlemler takip edilmiştir. İlk aşamada, toplanan populasyon örneklerinden izole edilen DNA’lar, kalıp olarak kullanılmış ve bu örneklere ait rDNA ITS bölgeleri PCR yoluyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan ITS DNA parçalarının baz dizinin analizinin yapılabilmesi amacıyla klonlama çalışmaları yapılmıştır. Klonlama ve sonrasında gerçekleştirilen baz dizilerinin okunması işlemlerinin ardından elde edilen ITS baz sıraları, gerçekleştirilen bu moleküler analizlerde, ham veri olarak kullanılmıştır.

Her taksonun ITS bölgelerine ait nükleotit baz dizileri, Clustal X ve Clustal W (Thompson ve ark., 1997) programları kullanılarak alt alta hizalanmıştır. Daha sonra bu sıralar analiz edilmek üzere sırasıyla Fasta, Nexus ve PHYLIP formatlarına dönüştürülmüştür.

2.11. Modeltest 3.6 ile En Uygun Baz Değişim Modelinin Belirlenmesi

Nexus dosyası haline dönüştürülmüş verilerle ilgili, hiyerarşik olasılık oran testlerine (hLRTs) göre en uygun baz değişim modelinin belirlenmesi amacıyla Modeltest 3.6 (Posada ve Crandall, 1998) bilgisayar programından yararlanılmıştır. Belirlenen baz değişim modelinin Nexus veri dosyasında kullanılması ile Modelblock verilerini içeren veri dosyası oluşturulmuştur. Ardından elde edilen bu veriler, Model Scores dosyası oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Yapılan veri dönüşümleri sonrasında Model Scores dosyasına ait veriler ve bu verilere uygun -lnL değeri ile Lset değerleri elde edilmiştir. Oluşturulan bu değerler, Nexus veri dosyasına girilerek PAUP programında parsimonik analiz programı çalıştırılmıştır. Bu şekilde PAUP (Swofford ve ark., 2000) paket programı kullanılarak Maksimum Parsimoni (MP) analizi gerçekleştirilmiş ve taksonlar arasındaki akrabalıkları ortaya koyan filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu aşamada Modeltest baz

değişim modeline göre 10000 rastgele ilave tekrar oluşturulmuş ve Seç bağla testi (Bootstrapping) 1000 tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen filogenetik analizde araştırma bölgesinde yayılış gösteren *Primula* cinsi ile yakın filogenetik ilişkisi olduğu bilinen *Androsace maxima* L. türü (GenBank: AY275100) dış grup olarak kullanılmıştır.

Oluşturulan filogenetik ağacın görüntülenmesinde TreeView programından yararlanılmıştır.

Bu çalışmada araştırılan taksonlara ait populasyon örnekleri, en az iki farklı istasyondan toplanmış ve bu taksonlar arasındaki rDNA ITS bölgelerine dayalı akrabalık ilişkisi, morfolojik verilerden elde edilen fenogram ile karşılaştırılarak ortaya konulmaya çalışılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Morfolojik Bulgular

Araştırmada yararlanılan her populasyon örneği üzerinde önceden belirlenmiş morfometrik karakterlere dayalı ölçümler gerçekleştirilmiştir. Örnekler üzerinde belirlenen karakterlerin ölçümü sırasında bir populasyona ait her bir karakter için 6-10 arasında değişen ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen sayısal değerlerin ortalaması alınmış ve Tablo 4’de bu ölçümlere ait ortalama değerler verilmiştir. Tablo 4’de kullanılan populasyon numaraları Tablo 2’deki, karakter numaraları da Tablo 3’deki numaralar esas alınarak verilmiştir.

Yapılan morfolojik ölçümlerde kullanılan karakterlerden 5 tanesi, Türkiye Florasında bulunmayan bu çalışmada ilk kez kullanılmış karakterlerdir. Bu karakterler; korolla tüpünün kaliks tüpüne oranı (X_{18}), kaliks dişlerinin uzunluğu (X_{19}), kaliks dişlerinin kalikse oranı (X_{20}), bitki boyunun taban yaprak sayısına oranı (X_{25}) ve situlus uzunluğu (X_{26}) olarak tespit edilmiştir. Belirlenen bu karakterlerin populasyon örneklerine göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4). Yapılan ölçümlerin geçerliliğinin artırılması amacıyla milimetrik ölçümler binoküler mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda çalışmada kullanılan bütün örneklerde heterositulusun mevcut olduğu belirlenmiştir. Morfolojik ölçümlerde, türler arasında bazı değerlerin önemli varyasyonlar gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin bitkilerin boy uzunluklarının (X_1) 4,47 – 31,5 cm, yaprak eninin (X_2) 0,6 – 8,05 cm, pin çiçeklerdeki situlus uzunluğunun ise (X_{26}), 2,38 – 14,50 mm arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Herbaryum örneği haline getirilmiş olan taksonların dijital fotoğrafları çekilmiş ve araştırmadaki yayılış alanlarına ait bilgilerle bu çalışmada sunulmuştur.

Tablo 4. Nümerik analizlerde kullanılan morfolojik veri matrisi

Populasyon No	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	X ₂₀	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆
01	5,84	1,77	4,67	7,71	0	1	1	0	0	0	2,97	6,5	1,11	2,10	1	0,67	1,51	2,25	4,10	0,37	0	1	3,20	0	0,76	10,28
02	5,42	1,46	4,63	7,17	0	1	1	0	0	0	2,70	6,8	0,89	2,13	1	0,55	0,62	2,64	4,70	1,89	0	1	1,94	0	0,76	9,52
03	4,47	1,49	3,50	8,17	0	1	1	0	0	0	1,95	8,38	0,94	2,25	1	0,50	1,58	3,16	4,72	0,50	0	1	1,95	0	0,55	10,30
04	19,54	3,76	17,30	6	0	1	1	0	0	0	7,88	15,83	1,47	2,74	1	0,93	1,80	1,94	5,92	2,48	0	1	2,48	0	3,26	8,20
05	11,93	4,36	11,94	8,42	0	1	1	0	0	0	4,22	17,5	1,28	2,26	1	0,68	1,57	2,31	5,42	0,42	0	1	1,88	0	1,42	8,84
06	14,44	2,65	10,17	7,44	0	1	1	0	0	0	6,86	9	1,42	2,62	1	0,78	1,82	3,30	6,54	2,17	0	1	1,74	0	1,95	10,22
07	23,40	4,01	16,80	6,71	0	1	1	7,40	1,30	1	0,65	8,9	1,84	2,62	0	1,43	1,95	1,36	3,84	0,21	1	0	3,40	0	3,50	11,55
08	31,50	4,60	5,37	9	0	1	1	10,25	1,20	0	1,8	11,75	1,93	2,42	0	1,44	1,70	1,18	5,10	0,26	1	0	2,45	0	3,50	14,50
09	20,39	2,01	7,69	6	0	1	1	5	0,53	1	1,73	4,2	0,84	2,24	1	0,21	0,68	3,28	2,97	0,35	1	1	2,01	0	3,40	8,42
10	13,08	2,74	8,44	5,11	0	1	1	4,50	0,57	1	1,54	3,14	0,91	2,05	1	0,51	1,25	2,45	4,34	0,48	1	1	2,43	0	2,56	8,20
11	22,34	8,05	15,21	6,22	0	1	1	6,40	1,01	1	2,82	7,2	1,44	3,35	1	0,96	1,61	1,68	4,84	0,34	1	1	4,2	0	3,60	13,42
12	17,91	4,22	9,33	5	0	1	1	7,50	0,72	1	1,57	6	1,11	2,6	1	0,76	1,66	2,18	4,05	0,37	1	1	2,85	0	3,58	12,78
13	18,19	2,27	14,27	14,57	1	0	0	18	1,39	1	1,75	11,43	0,82	1,77	1	0,41	1,12	2,71	4,23	0,52	1	1	2,27	0	1,25	5,83
14	13,46	1,74	10,35	13,71	1	0	0	17	1,39	1	1,81	18,6	0,82	1,76	1	0,42	1,12	2,69	4,66	0,57	1	1	2,16	0	0,98	5,74
15	25,34	1,67	8,53	14,17	0	0	0	24,40	0,45	1	0,19	22	0,40	1,46	1	0,17	0,83	4,93	2,57	0,63	1	1	1,44	1	1,79	5,20
16	28,67	2,10	6,77	18,30	1	0	0	13,70	0,71	1	0,32	17,8	0,61	1,41	1	0,23	0,98	4,29	3,83	0,63	1	1	4,15	1	1,57	6,80
17	11,04	0,84	3,74	12,67	1	0	0	9,80	0,47	1	0,61	7	0,57	1,18	1	0,32	0,55	1,73	2,47	0,34	1	1	3,76	0	0,87	2,62
18	9,24	0,60	2,12	9,57	1	0	0	6,20	0,72	1	0,18	6,57	0,56	1,01	1	0,28	0,62	2,19	1,93	0,43	1	1	1,18	0	0,97	3,04
19	9,02	0,84	3,94	9,52	1	0	0	8	0,63	1	0,44	5,44	0,55	1,02	1	0,32	1,44	1,95	2,41	0,81	1	1	2,04	0	0,95	2,38

1. *P. vulgaris* Huds.

Bu taksonun ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren ve araştırma bölgesinde yer alan iki alttürü bulunmaktadır. Bu taksonlar, aşağıda belirtilen populasyonlarından toplanan örneklerle çalışmada yer almıştır.

P. vulgaris Huds. subsp. *vulgaris* (Şekil 3 A)

Araştırma alanındaki yayılışı: A7 Trabzon: Beşikdüzü, Yeni Camii Köyü, 01 v 2005, 970 m, Uzuner P11 - P12, KTUB; A4 Kastamonu: Bozkurt, 11 v 2005 1200 m, Uzuner P15 - P16, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Mart- Haziran

Yetiştirme ortamı: Çimenlik arazi, açık alanlar, 500 - 2100 m.

P. vulgaris Huds. subsp. *sibthorpii* (Hoffmanns.) W.W.Sm. & Forrest (Şekil 3. B)

Araştırma alanındaki yayılışı: A7 Trabzon: Beşikdüzü, Yeni Camii Köyü 01 v 2005, 970 m, Uzuner P13, KTUB; A4 Kastamonu: Bozkurt, 11 v 2005 1200 m, Uzuner P17, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Mart - Haziran

Yetiştirme ortamı: Çimenlik arazi, açık alanlar, - 850 - 2200 m.

2. *P. veris* L.

Bu tür, araştırma bölgesinde de yayılış gösteren iki alttürü ile ülkemizde temsil edilmektedir. Bu çalışmada her iki taksona ait birer populasyon örneğinden yararlanılmıştır.

P. veris L. subsp. *columnae* (Ten.) Lüdi. (Şekil 3 C)

Araştırma alanındaki yayılışı: A7 Trabzon: Çaykara, Ablaryas Yaylası, 01 vi 2005, 2052 m, Uzuner P18, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Nisan- Haziran

Yetiştirme ortamı: Alpin çayırlar, açık alanlar, 1225 - 2135 m.

P. veris L. subsp. *macrocalyx* (Bunge) Lüdi (Şekil 3 D)

Araştırma alanındaki yayılışı: A9 Artvin: Karagöl, 08 vi 2005, 1950 m, Uzuner P22, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Nisan - Haziran

Yetiştirme ortamı: Alpin çayırlar, açık alanlar, 1800 - 2500 m.



Şekil 3. *P. vulgaris* Huds. subsp. *vulgaris* (A), *P. vulgaris* Huds. subsp. *sibthorpii* (Hoffmanns.) W.W.Sm. & Forrest (B), *P. veris* L. subsp. *columnae* (Ten.) Lüdi. (C), *P. veris* L. subsp. *macrocalyx* (Bunge) Lüdi (D)

3. *P. megaseifolia* Boiss. & Bal. (Şekil 4 A).

Bu tür, araştırma bölgesinde doğal yayılış göstermektedir ve çalışmaya iki farklı popülasyondan toplanan örneklerle dahil edilmiştir.

Araştırma alanındaki yayılışı: A7 Trabzon: Beşikdüzü, Şahmelik Köyü, 10 iv 2005, 450 m, Uzuner P6, KTUB; A8 Trabzon: Araklı, Sularbaşı Köyü, 14 iv 2005, 1120 m, Uzuner P7, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Mart- Nisan

Yetiştirme ortamı: Yapraklı orman altı, 50 - 1100 m.

4. *P. elatior* (L.) Hill

Bu tür ülkemizde yayılış gösteren üç alttür ile temsil edilmektedir. Ancak bu çalışmada *P. elatior* subsp. *meyeri* alttürüne ait iki farklı popülasyon örneği kullanılmıştır.

P. elatior (L.) subsp. *meyeri* (Rupr.) Valentine ve Lamond (Şekil 4 B).

Araştırma alanındaki yayılışı: A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 24 vii 2005, 2850 m, Uzuner P26, KTUB; A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 28 v 2005, 2920 m, Uzuner P29, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Mayıs- Temmuz

Yetiştirme ortamı: Alpin çayırlar, açık alanlar, 1820 - 3300 m.

5. *P. auriculata* Lam. (Şekil 4 C).

Bu tür araştırma bölgesinde toplanan iki popülasyon ile çalışmamıza dahil edilmiştir.

Araştırma alanındaki yayılışı: A7 Gümüşhane: Kadırga Yaylası, 13 vi 2005, 2150 m, Uzuner P20, KTUB; A8 Erzurum: İspir, Moryayla, 21 x 2005, 2450 m, Uzuner P30, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Mayıs - Ağustos

Yetiştirme ortamı: Çimenlik arazi, açık alanlar, 1250 - 3150 m.

6. *P. longipes* Freyn & Sint. (Şekil 4 D).

Bu tür, araştırma bölgesinde doğal yayılış gösteren ve bu çalışmaya dahil edilen tek endemik taksondur. İki farklı lokaliteden toplanan örneklerle çalışmada kullanılmıştır.

Araştırma alanındaki yayılışı: A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 24 vii 2005, 2850 m, Uzuner P25, KTUB; A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 28 v 2005, 3067 m, Uzuner P27, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Temmuz - Ağustos

Yetiştirme ortamı: Çimenlik arazi, açık alanlar, 1625 - 3400 m.

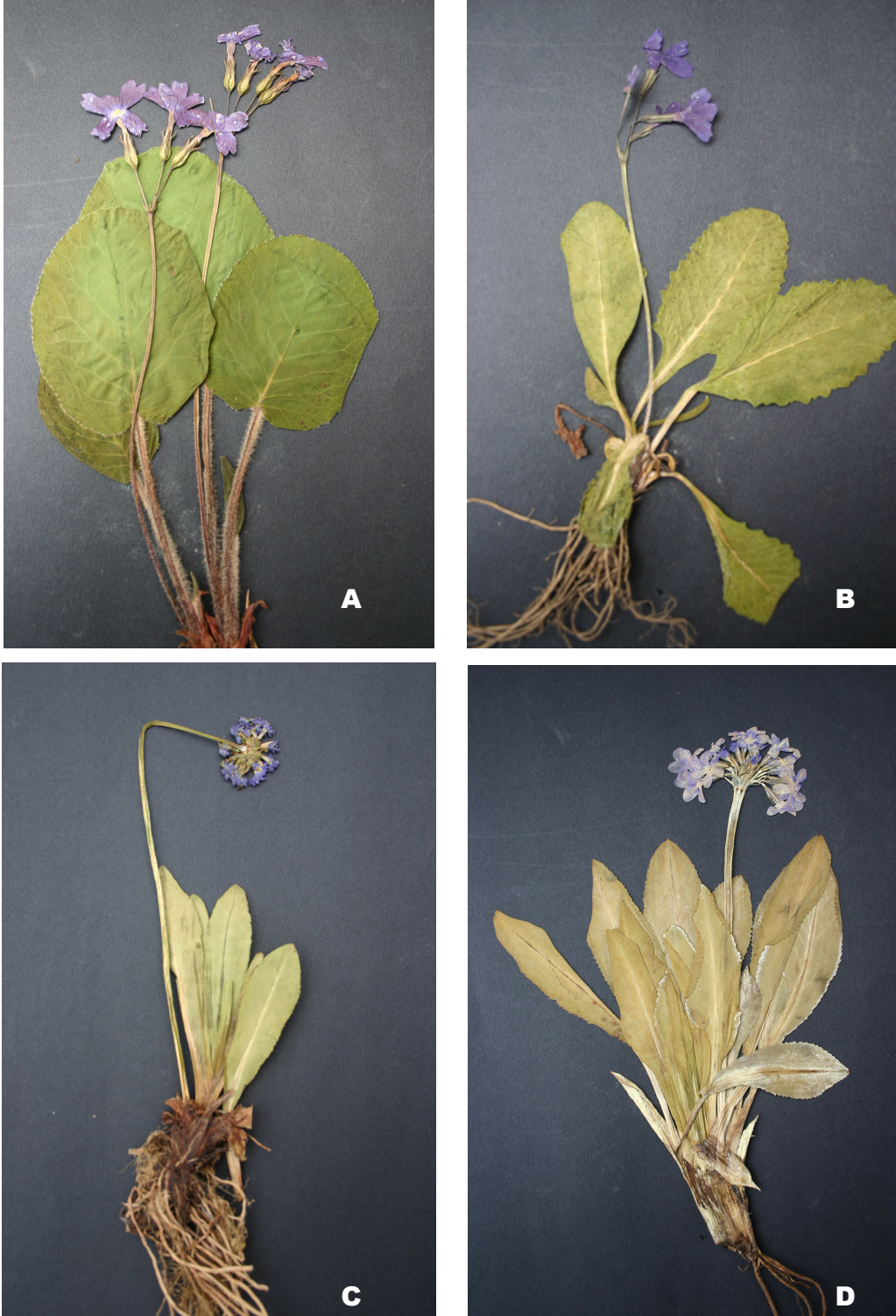
7. *P. algida* Adams (Şekil 5).

Bu tür çalışmamıza konu olan Kafkas orijinli türlerden biridir. Üç farklı popülasyondan toplanan örneklerle çalışmamıza dahil edilmiştir.

Araştırma alanındaki yayılışı: A9 Ardahan: Posof, Gönülaçan, 09 vi 2005, 2130m, Uzuner P23, KTUB; A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 24 vii 2005, 2850 m, Uzuner P24, KTUB; A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 28 v 2005, 2920 m, Uzuner P28, KTUB.

Çiçeklenme zamanı: Temmuz- Ağustos

Yetiştirme ortamı: Çimenlik arazi, açık alanlar, 2000 – 3600 m.



Şekil 4. *P. megaseifolia* Boiss. & Bal. (A), *P. elatior* (L.) Hill subsp. *meyeri* (Rupr.) Valentine & Lamond (B), *P. auriculata* Lam. (C), *P. longipes* Freyn & Sint. (D)



Şekil 5. *P. algida* Adams

3.2. Morfolojik Analiz Bulguları

Kümeleme analizi, morfolojik bulgular bölümünde tanımlamaları verilen taksonları temsil eden populasyonlar üzerinde gerçekleştirilen sayısal analizlerden birincisini oluşturmaktadır. Bu analizde ilk işlem, Tablo 4’de verilen 19 populasyona ait ortalama veri matrisinden her populasyonun diğer populasyonlara olan uzaklıklarının bilgisayar yardımıyla hesaplanmasıdır. Populasyonların birbirlerine olan uzaklıkları, bir başka ifade ile farklılık (dissimilarity) veya benzerlik mesafeleri, Euklidean Katsayısı yardımıyla belirlenmiştir. Euklidean veri matrisinin bir gruplandırma yöntemi olan UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) ile değerlendirilmesinden elde edilen fenogram, Şekil 6’da gösterilmiştir. Bu fenogramın kofenetik korelasyon katsayısı, $r= 0,92$ olarak bulunmuştur.

Oluşturulan bu fenogram incelendiğinde, çalışılan populasyon örneklerinin temelde iki grup oluşturduğu, 0,6 benzerlik çizgisinde ise, 3 grup altında toplandıkları açıkça görülmektedir. Oluşan bu gruplardan *P. algida*, *P. longipes* ve *P. auriculata*

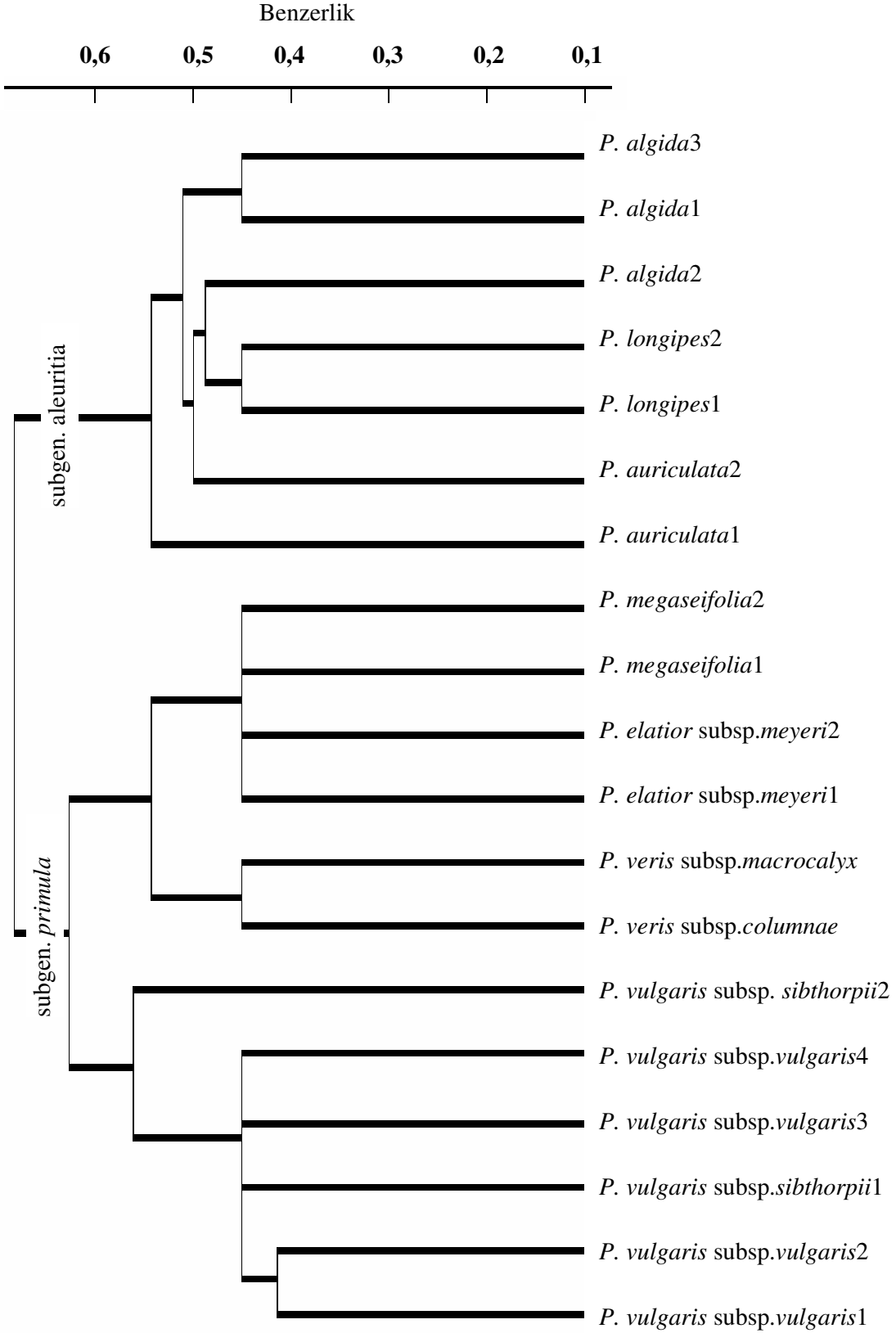
populasyonlarının oluşturduğu grup subgen. *aleuritia*, çalışılan diğer örneklerin oluşturduğu grubun ise, subgen. *primula* altcinsine dahil olduğu belirlenmiştir.

Primula altcinsine ait taksonların kendi aralarında tekrar iki gruba ayrıldığı, *P. vulgaris* populasyonlarının bir grup oluşturduğu, *P. veris*, *P. elatior* ve *P. megaseifolia* taksonlarına ait populasyonların kendi aralarında daha fazla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak populasyon seviyesindeki bazı gruplaşmalarda, aynı türe ait değişik populasyon örneklerinin farklı yerleşimlere sahip olduğu ve farklı türlere ait populasyonlarla bir grupta yer aldığı görülmüştür. *P. vulgaris*'i temsil eden bütün populasyonlar, tek bir grup altında toplanmıştır. Ancak alttür seviyesinde, *P. subsp. sibthorpii* populasyonlarının bir grup oluşturması beklenirken aynı bölgeden toplandıkları *P. vulgaris* subsp. *vulgaris* populasyonları ile daha yakın benzerlik gösterdikleri görülmüştür. Bu durumda *P. vulgaris*'in morfolojik olarak diğer türlerden çok daha kolay ayrılabilirdiği, ancak alttür düzeyinde morfolojik karakterlerin bazı örnekleri gruplandırmada tam olarak yeterli olmadığı görülmüştür. *P. algida*'nın *algida2* populasyonu, *P. longipes*'in populasyonlarıyla daha yakın bir şekilde bağlanmıştır. Benzer şekilde *P. auriculata*'yı temsil eden her iki populasyonun farklı seviyelerde başka taksonlarla bağlandığı, kendi aralarında bir grup oluşturmadığı görülmüştür.

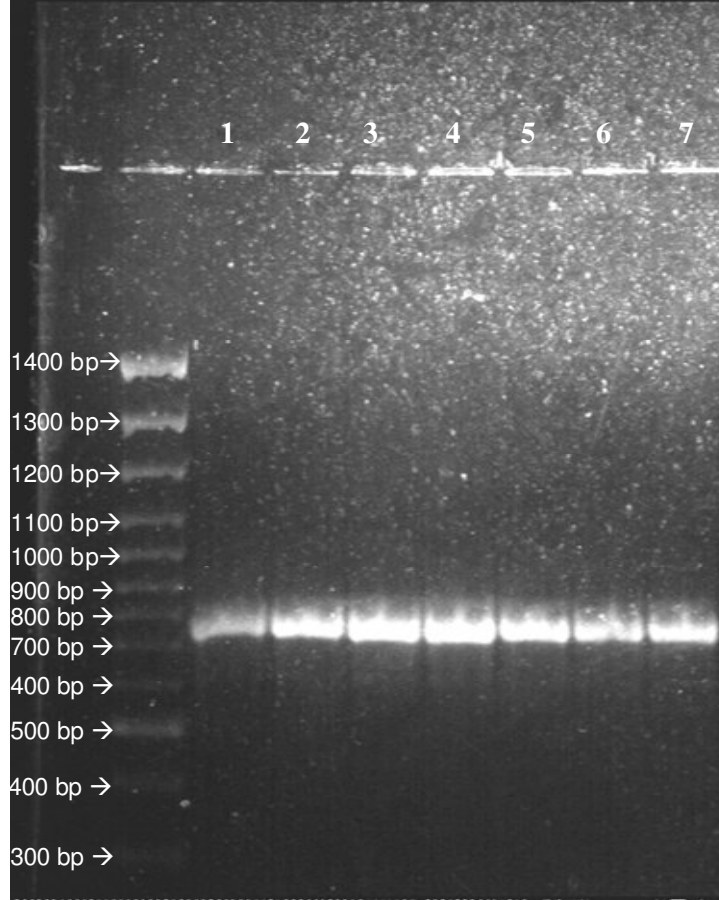
Morfolojik analizlere dayalı bu bulguların populasyon örneklerini ayırmada yetersiz kalma nedenlerinin; kullanılan morfolojik karakterlerin örnekler için yeterince ayırt edici olmaması, çalışılan populasyon örneği sayısının az olmasının, örneklerin yetişme ortamlarına ait iklimsel özelliklerin ve yükseltilerin farklılıklar göstermesi ve populasyon örnekleri için belirlenen karakter özelliklerinin fazla değişkenlik arz etmesinin etkili olduğu düşünülmektedir.

3.3. Moleküler Bulgular

Araştırma bölgesinden toplanan 9 taksona ait 19 populasyon örneğinin genomik DNA'ları, daha önceki bölümde bahsedilen izolasyon prosedürleri takip edilerek izole edilmiştir. Her bir örneğe ait nükleer DNA'lardan yararlanılarak ITS PCR gerçekleştirilmiştir. Taksonlara ait bazı ITS PCR ürünleri DNA ladder ile birlikte agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. PCR sonucunda elde edilen ITS bantlarının bir kısmı Şekil 7'de görüntülenmiştir. Her populasyon örneğine ait genomik DNA üzerinden çoğaltılmış ITS baz sıraları, ekler kısmında verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonrasında



Şekil 6. UPGMA fenogramı üzerinde *Primula* populasyonlarının konumu (r: 0,92)



Şekil 7. Bazı *Primula* örneklerinin ITS bölgelerine ait DNA bantları (1 - *P. vulgaris* subsp. *vulgaris* / P11, 2 - *P. veris* subsp. *columnnae* / P22, 3 - *P. elatior* subsp. *meyeri* / P26, 4 - *P. megaseifolia* / P6, 5 - *P. longipes* / P25, 6 - *P. auriculata* / P20, 7 - *P. algida* / P23)

taksonlara ait ITS dizinleri uzunluk varyasyonunun 695 - 714 bp arasında değişiklik gösterdiği; bütün ITS nükleotit uzunluğundaki G+C içeriğinin ise, % 51,0 - % 55,4 arasında değiştiği bulunmuştur. Her takson için elde edilen ITS bantları ile ilgili bu şekildeki ITS uzunluğu, G+C içeriği ve pürin/ primidin değerlerini içeren veriler, Tablo 5'de verilmiştir. Tablo 5'de yer alan örnek kodları, populasyon örneklerinin herbaryum numaraları dikkate alınarak oluşturulmuştur. Bütün çalışılan örneklerin ITS bölgeleri arasındaki benzerlik ilişkileri, Clustal W programından yararlanılarak oluşturulduğunda, bazı türler için baz varyasyonunun %18 oranında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin, *P. megaseifolia* / P6 - *P. algida* / P23, *P. longipes* / P27 - *P. megaseifolia* / P6, *P. megaseifolia* / P6 - *P. longipes* / P25, *P. veris* subsp. *columnnae* / P22 - *P. longipes* / P27, *P. longipes* / P27 - *P. algida* / P23 ve *P. algida* / P23 - *P. longipes* / P25 populasyon

örnekleri arasındaki ITS baz dizisi benzerliği % 82 olarak bulunmuştur. Diğer populasyon örnekleri arasındaki benzerlik oranları, bu değer (% 82) ile % 100 arasında değişiklik göstermektedir. Örnekler arasındaki ITS baz varyasyonlarına dayalı % benzerlik değerleri, Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. ITS PCR sonucunda elde edilen nükleotit uzunlukları, G+C ve Pürin/ Primidin içeriği

Tür adı	Populasyon No	ITS uzunluğu (bp)	% G+ C	Pürin/ Primidin İçeriği
<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	P11/ <i>vulgaris1</i>	711	53	360 / 352
<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	P12/ <i>vulgaris2</i>	712	53,1	360 / 352
<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>sibthorpii</i>	P13/ <i>sibthorpii1</i>	712	53,1	360 / 352
<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	P15/ <i>vulgaris3</i>	712	52,7	361 / 351
<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	P16/ <i>vulgaris4</i>	712	52,9	361 / 351
<i>P. vulgaris</i> subsp. <i>sibthorpii</i>	P17/ <i>sibthorpii2</i>	712	52,9	361 / 351
<i>P. veris</i> subsp. <i>columnae</i>	P18/ <i>columnae</i>	712	51,8	360 / 352
<i>P. veris</i> subsp. <i>macrocalyx</i>	P22/ <i>macrocalyx</i>	714	51,0	357 / 357
<i>P. elatior</i> subsp. <i>meyeri</i>	P26/ <i>meyeri1</i>	713	52,9	361 / 352
<i>P. elatior</i> subsp. <i>meyeri</i>	P29/ <i>meyeri 2</i>	713	52,6	360 / 359
<i>P. megaseifolia</i>	P6/ <i>megaseifolia1</i>	711	51,3	353 / 358
<i>P. megaseifolia</i>	P7/ <i>megaseifolia2</i>	710	52,7	358 / 352
<i>P. longipes</i>	P25/ <i>longipes1</i>	695	54,0	356 / 339
<i>P. longipes</i>	P27/ <i>longipes2</i>	697	53,8	356 / 341
<i>P. auriculata</i>	P20/ <i>auriculata1</i>	700	53,7	355 / 345
<i>P. auriculata</i>	P30/ <i>auriculata2</i>	700	54,0	355 / 345
<i>P. algida</i>	P23/ <i>algida1</i>	704	55,4	339 / 365
<i>P. algida</i>	P24/ <i>algida2</i>	704	53,4	354 / 350
<i>P. algida</i>	P28/ <i>algida3</i>	701	53,2	355 / 346

Tablo 6. ITS bölgelerine dayalı örnekler arasındaki benzerlik yüzdeleri

Dizin A	Uzunluk (nt)	Dizin B	Uzunluk (nt)	%Benzerlik
P11	711	P12	712	99
P11	711	P13	712	99
P11	711	P15	712	99
P11	711	P16	712	99
P11	711	P17	712	99
P11	711	P6	711	95
P11	711	P7	710	98
P11	711	P18	712	98
P11	711	P22	714	96
P11	711	P26	713	98
P11	711	P29	713	98
P11	711	P25	695	85
P11	711	P27	697	85
P11	711	P20	700	89
P11	711	P30	700	88
P11	711	P23	704	84
P11	711	P24	704	88
P11	711	P28	701	88
P12	712	P13	712	99
P12	712	P15	712	99
P12	712	P16	712	99
P12	712	P17	712	99
P12	712	P6	711	95
P12	712	P7	710	98
P12	712	P18	712	98
P12	712	P22	714	96
P12	712	P26	713	98
P12	712	P29	713	98
P12	712	P25	695	85
P12	712	P27	697	85
P12	712	P20	700	89
P12	712	P30	700	88
P12	712	P23	704	84
P12	712	P24	704	88
P12	712	P28	701	88
P13	712	P15	712	99
P13	712	P16	712	99
P13	712	P17	712	99
P13	712	P6	711	95
P13	712	P7	710	98
P13	712	P18	712	98
P13	712	P22	714	96
P13	712	P26	713	98
P13	712	P29	713	98
P13	712	P25	695	85
P13	712	P27	697	85
P13	712	P20	700	89
P13	712	P30	700	88
P13	712	P23	704	84
P13	712	P24	704	88
P13	712	P28	701	88
P15	712	P16	712	99
P15	712	P17	712	100
P15	712	P6	711	95
P15	712	P7	710	98
P15	712	P18	712	98

Tablo 6.'nın devamı

Dizin A	Uzunluk(nt)	Dizin B	Uzunluk (nt)	%Benzerlik
P15	712	P22	714	96
P15	712	P26	713	98
P15	712	P29	713	98
P15	712	P25	695	85
P15	712	P27	697	85
P15	712	P20	700	89
P15	712	P23	704	84
P15	712	P24	704	88
P15	712	P28	701	88
P16	712	P17	712	99
P16	712	P6	711	95
P16	712	P7	710	97
P16	712	P18	712	97
P16	712	P22	714	95
P16	712	P26	713	98
P16	712	P29	713	98
P16	712	P25	695	85
P16	712	P27	697	85
P16	712	P20	700	89
P16	712	P30	700	88
P16	712	P23	704	84
P16	712	P24	704	88
P16	712	P28	701	88
P17	712	P6	711	95
P17	712	P7	710	98
P17	712	P18	712	98
P17	712	P22	714	96
P17	712	P26	713	98
P17	712	P29	713	98
P17	712	P25	695	85
P17	712	P27	697	85
P17	712	P20	700	89
P17	712	P30	700	88
P17	712	P23	704	84
P17	712	P24	704	88
P17	712	P28	701	88
P6	711	P7	710	97
P6	711	P18	712	94
P6	711	P22	714	92
P6	711	P26	713	95
P6	711	P29	713	95
P6	711	P25	695	82
P6	711	P27	697	82
P6	711	P20	700	86
P6	711	P30	700	86
P6	711	P23	704	82
P6	711	P24	704	85
P6	711	P28	701	85
P7	710	P18	712	97
P7	710	P22	714	95
P7	710	P26	713	98
P7	710	P29	713	98
P7	710	P25	695	85
P7	710	P27	697	84
P7	710	P20	700	89
P7	710	P30	700	88

Tablo 6.'nın devamı

Dizin A	Uzunluk (nt)	Dizin B	Uzunluk (nt)	%Benzerlik
P7	710	P23	704	83
P7	710	P24	704	87
P7	710	P28	701	87
P18	712	P22	714	98
P18	712	P26	713	97
P18	712	P29	713	97
P18	712	P25	695	85
P18	712	P27	697	85
P18	712	P20	700	88
P18	712	P30	700	88
P18	712	P23	704	84
P18	712	P24	704	88
P18	712	P28	701	88
P22	714	P20	700	87
P22	714	P30	700	86
P22	714	P23	704	82
P22	714	P24	704	87
P22	714	P28	701	86
P26	713	P29	713	99
P26	713	P25	695	85
P26	713	P27	697	85
P26	713	P20	700	89
P26	713	P30	700	89
P26	713	P23	704	84
P26	713	P24	704	88
P26	713	P28	701	88
P29	713	P25	695	85
P29	713	P27	697	85
P29	713	P20	700	89
P29	713	P30	700	89
P29	713	P23	704	84
P29	713	P24	704	88
P29	713	P28	701	88
P25	695	P27	697	98
P25	695	P20	700	87
P25	695	P30	700	86
P25	695	P23	704	82
P25	695	P24	704	87
P25	695	P28	701	86
P27	697	P20	700	87
P27	697	P30	700	86
P27	697	P23	704	82
P27	697	P24	704	87
P27	697	P28	701	86
P20	700	P30	700	99
P20	700	P23	704	89
P20	700	P24	704	94
P20	700	P28	701	93
P30	700	P23	704	88
P30	700	P24	704	93
P30	700	P28	701	92
P23	704	P24	704	94
P23	704	P28	701	94
P24	704	P28	701	99

3.4. Maksimum Parsimoni Analizi Bulguları

Nexus dosyası halindeki veriler, Modeltest 3.6 programında analiz edildiğinde, hiyerarşik olasılık oran testlerine (hLRTs) göre en uygun baz değişim modelinin TrN+G (Hasegawa vd., 1985) olduğu görülmüştür . Model Scores dosyası oluşturduğunda ise -lnL değeri, - lnL= -3524,7153 olarak kaydedilmiştir.

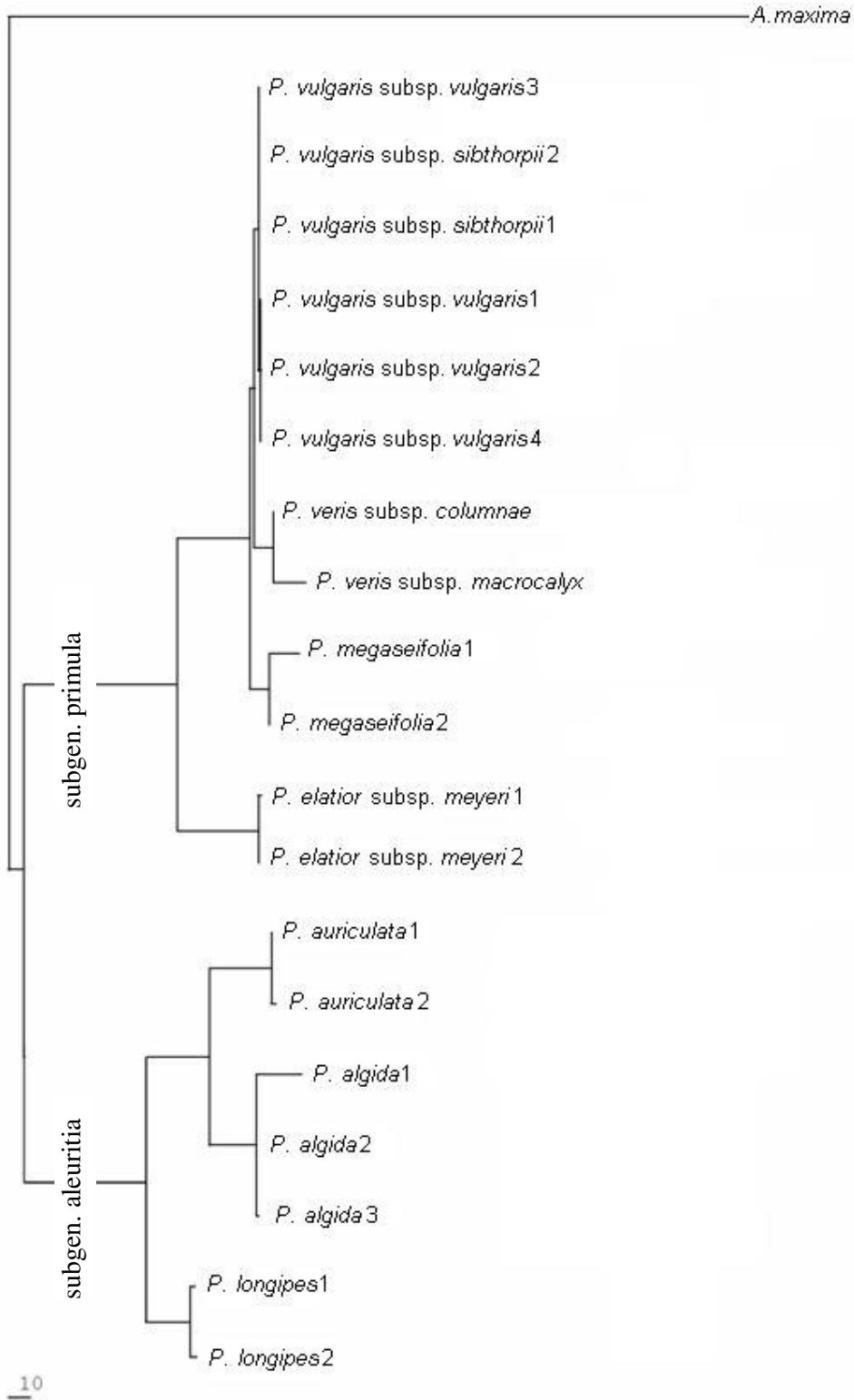
Baz frekanslarının ise 0,2348 (A), 0,2789 (C), 0,2627 (G) ve 0,2236 (T) olduğu bulunmuştur.

ITS dizilerine dayalı oluşturulmuş parsimoni analizinde toplam 713 karakter incelenmiş ve bunlardan % 25,9'unun sabit karakterli, % 42,9'unun ise değişken karakterli olduğu, fakat parsimonik bilgi içermediği, % 32'sinin ise parsimonik bilgi içerdiği sonucuna varılmıştır.

Höristik inceleme sonucunda toplam 7,854,974 farklı ağaç topolojisi oluşturulmuş ve en iyi parsimonik ağaçların skoru 148 olarak bulunmuş ve bunlardan 5 tanesi kaydedilmiştir.

Bu kaydedilen ağaçlardan taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiyi en iyi yansıtan Maksimum Parsimoni ağacı Şekil 8'de verilmiştir.

ITS dizin analizleri sonucunda elde edilen Maksimum Parsimoni ağacında, 19 populasyon örneğinin temelde iki grup oluşturduğu görülmüştür. ITS baz polimorfizmine dayalı olarak subgenus. *primula* taksonları olan *P. veris*, *P. elatior* subsp. *meyeri*, *P. megaseifolia* ve *P. vulgaris* bir grup oluştururken, subgenus. *aleuritia* içinde yer alan *P. algida*, *P. auriculata* ve *P. longipes* taksonlarının da başka bir grup oluşturduğu görülmüştür. Çalışmada kullanılan aynı türe ait populasyon örneklerinin de kendi aralarında gruplar oluşturdukları görülmüştür. Çalışmada iki farklı lokaliteden toplanan *P. vulgaris* türüne ait 6 populasyon örneği kendi içinde bir grup oluşturmuştur. Farklı üç populasyondan alınan *P. algida* örnekleri, kendi içinde ayrı bir grup oluşturmuştur. Aynı *P. algida* örneklerinin, coğrafik dağılışa bağlı olarak ITS dizilerindeki benzerlik oranlarının farklılık gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 8. ITS bölgelerinin PAUP ile analizi sonucunda elde edilmiş Maksimum Parsimoni ağacı

4. TARTIŞMA

Son yıllarda rDNA'nın ITS bölgelerine dayalı filogenetik analizler taksonomik pozisyonun ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Bu analizler aynı zamanda taksonomik açıdan çok kompleks olan bir çok cinsin, türün veya fazla sayıda takson ihtiva eden grupların filogenetiğinin yeniden inşası çalışmalarında da kullanılmaktadır.

Bir cinsin filogenisinin inşasında, genelde tek bir gen ağacı yeterli veriler sağlarken, *Saxifraga* L. gibi cinslerin filogenetik tarihinin ortaya konulmasında ITS ağaçlarının da aynı güvenilirlikte kullanışlı deliller ortaya koyduğu ispatlanmıştır (Baldwin ve ark., 1995).

Conti ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *Primula* cinsindeki filogenetik yapı ve karakter değişiminin açıklanmasında ITS baz dizilerinin önemi araştırılmıştır. Elde edilen filogenetik sonuçlar ışığında cinsin *auricula* Duby ve *aleuritia* (Duby) Wendelbo seksiyonlarının monofiletik karakterli olduğu sonucuna varmışlardır. Bu seksiyonlardan *aleuritia* ülkemizde de temsil edilmektedir. Ancak çalışılan örnekler içerisinde ülkemiz örnekleri bulunmamaktadır.

Türkiye Florası kayıtlarına göre *Primula* cinsi ülkemizde sekiz tür ve bu türlere dahil 11 taksonla temsil edilmektedir (Lamond, 1978). Ülkemiz türleri Wendelbo (1961) tarafından tanımlanmış yedi alt cinsten üçü içerisine dahil olmaktadır. *P. davisii* türü, altcins *sphondylia* (Dubg) Rupr.; *P. vulgaris*, *P. veris*, *P. elatior* ve *P. megaseifolia* türleri, altcins *primula*; *P. auriculata*, *P. longipes* ve *P. algida* türleri ise, altcins *aleuritia* (Duby) içerisinde yer almaktadır (Lamond, 1978).

P. vulgaris türü, *P. vulgaris* subsp. *vulgaris* ve *P. vulgaris* subsp. *sibthorpii* olmak üzere iki alt tür ile ülkemiz ve araştırma bölgemizde temsil edilmektedir. Türkiye Florasında bu alttürler için teşhis anahtarı, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren bu iki alttürü birbirinden ayırmada belirgin karakterler ortaya koymamaktadır. Ayrıca bu iki alttür, aynı coğrafik bölgenin çakışan yükseltilerinde doğal olarak bir arada yetişmektedir. Bu iki takson arasındaki morfolojik farklar yaprak ayasının petiyole doğru daralma biçimi ve korolla rengiyle sınırlı kalmaktadır. *Primula*'da korolla renginin ayırt edici sağlam bir karakter olmadığı ve sıcaklığa bağlı olarak birçok taksonda çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir (Karlsson, 2002). Çünkü sıcaklık ve toprak gibi ekolojik faktörlerin çiçek renginin değişmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Aynı yetiştirme

ortamında her iki alttür, aynı korolla rengine sahip örnekler olarak bir arada bulunabilmekte, bu da, bu taksonları belirgin bir şekilde birbirinden ayırt etmede güçlüklerle sebep olmaktadır.

Benzer bir durum çalışma bölgemizde de tespit edilmiştir. Diğer türlerden *P. elatior* ülkemizde üç alttürle, *P. veris* ise iki alttürle temsil edilmektedir. Bu alt türlere ilişkin teşhis anahtarındaki açıklamaların özellikle *P. veris* için, yeterince ayırt edici olduğunu söylemek güçtür. Çünkü tanımlayıcı karakter olarak ifade edilen yaprak ayası taban şeklindeki morfolojik değişikliğin aynı bitki üzerinde bile farklılık gösterebildiği gözlenmiştir.

Araştırmada kullanılan örnekler üzerinde gerçekleştirilen morfolojik karakterlere ait ölçümlerde önemli değişkenliklerin olduğu belirlenmiştir. Örneğin çalışılan tüm taksonlar üzerindeki ölçümlerde bitki boyunun 4,47 - 31,50 cm arasında, uzun situluslu bitkilerde ölçülen situlus uzunluğunun ise 2,38 - 14,55 mm arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Morfolojik ölçümlerde gözlenen bu şekildeki varyasyonların kümeleme analizi sonucunda oluşan fenogramda bazı türler arasındaki yakınlık ilişkilerinin beklenen şekilde oluşmamasında etkili olduğu düşünülmektedir. Bu durum araştırılan örneklerin yakınlık ilişkilerini ortaya koymada sadece morfolojik karakterlerin yeterli olamayacağını, filogenetik akrabalıklarının belirlenmesinde daha açıklayıcı bilgiler sunan yöntemlerin kullanılması gerektiğini açıkça göstermektedir.

ITS dizin analizleri sonucunda elde edilen Maksimum Parsimonide, 19 populasyon örneğinin temelde iki grup oluşturduğu görülmüştür. ITS baz polimorfizmine dayalı bu moleküler analiz sonucunda aynı altcins (subgenus *primula*) dahil olan *P. veris*, *P. elatior* subsp. *meyeri*, *P. megaseifolia* ve *P. vulgaris* örnekleri kendi aralarında bir grup oluştururken, *aleuritia* altcinsi içinde yer alan *P. algida*, *P. auriculata* ve *P. longipes* taksonlarının da başka bir grup oluşturduğu görülmektedir. Dış grup olarak seçilen ve kardeş cins *Androsace*'ye ait olan *A. maxima* ise, bu iki altcins grubunun da dışında kalmıştır.

Çalışmada iki farklı lokaliteden toplanan *P. vulgaris* türüne ait 6 populasyon örneği kendi aralarında kendi aralarında yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Aynı istasyondan toplanmış *vulgaris* 1 ve *vulgaris* 2 taksonları Kastamonu/ Bozkurt'tan toplanan *vulgaris* 4 taksonu ile % 99 oranında benzerlik göstermiş, bu üç örneğin daha düşük oranda *sibthorpii1*, *sibthorpii2* ve *vulgaris3* populasyonlarının oluşturduğu gruba yakın yer aldığı gözlenmiştir. Alttür *vulgaris*'in çalışılan tüm populasyon örnekleri farklı iki bölgeden

toplanmasına rağmen kendi aralarında yüksek oranda yakınlık göstermiş ve Şekil 7’de de görüldüğü gibi diğer türlerden kesin olarak ayrılmıştır.

Aynı altcins içinde *P. vulgaris*’e ait populasyonlar, *P. veris*’in çok yakın benzerlik gösteren iki alttürünün oluşturduğu gruba daha yakın iken, *P. megaseifolia* grubuna daha az benzerlik gösterdiği görülmüştür. *P. elatior* subsp. *meyeri*1 ve *P. elatior* subsp. *meyeri*2 populasyonları, birbirlerine oldukça benzer bulunmuştur, ancak diğer üç türe (*P. vulgaris*, *P. veris* ve *P. megaseifolia*) ait grubun üyeleri birbirlerine daha az oranda benzerlik göstermiştir.

İkinci grubu oluşturan altcins *aleuritia* taksonlarının, kendi populasyon örnekleri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği, tür seviyesinde *P. algida* ve *P. auriculata* türlerinin birbirine daha yakın olduğu bulunmuştur. *P. longipes* populasyonları ise, bu iki türün oluşturduğu gruba daha uzak benzerlik göstermiştir.

Yapılan çalışmalar sonrasında, taksonlara ait ITS dizinleri uzunluk varyasyonunun 695 - 714 bp arasında değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Bantlara ait G+C içeriğine bakıldığında, altcins *primula* taksonları için bu değerler % 51,0 – 53,1 arasında değişmekte iken, altcins *aleuritia* mensuplarında G+C içeriği % 53,2 – 55,4 arasında varyasyon göstermektedir. Bu da, *aleuritia* taksonlarında G+C içeriğinin daha fazla olduğunun bir göstergesidir. Populasyon örneklerinin ITS dizin analizlerinde bulunan pürin ve primidin içeriğine bakılmış; ancak bu şekilde baz içeriğine dayalı olarak örnekler arasında önemli bir fark tespit edilememiştir.

ITS1, 5,8S ve ITS2 bölgelerinin bütününe dayalı analizler sonunda, örnekler arasındaki benzerlik oranının %82’ye kadar düştüğü belirlenmiştir. Türler arasında belirlenen bu %18’lere varan baz farklılıkları, ITS bölgelerinin bu taksonları ayırmada oldukça etkili olduğunun açık bir göstergesidir.

Elde edilen bu maksimum parsimoni analizine ait sonuçlar, morfometrik veriler ışığında oluşturulmuş fenogram ile karşılaştırıldığında, altcinslere ait türlerin taksonomik ilişkilerine paralel olarak her iki ağaçta da temelde iki grup oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak oluşan fenogram detaylı bir şekilde incelendiğinde, bazı populasyon örneklerinin farklı türlere ait populasyonlarla aynı grup içerisinde yer aldığı kolaylıkla görülebilir (Şekil 6). Örneğin *algida* 2 populasyonu diğer *algida* (*algida*1) populasyonuna nazaran *P. longipes* populasyonlarına daha yakın olarak yerleşmiştir, benzer şekilde aynı türün iki farklı *P. auriculata* populasyonu birbirine yakın ilişki göstermesi beklenirken, *P. algida* ve *P. longipes* populasyonlarına değişik kısımlardan bağlanmıştır. *P. vulgaris* türünün farklı

lokaliteden alınmış 6 populasyon örneği, kendi aralarında bir grup oluşturmasına rağmen, alttür populasyonları arasında beklenen yakınlık ilişkisi tam olarak gözlenememiştir. Morfolojik karakterlere dayalı analizlerden elde edilen sonuçlarda gözlenen bu belirsizliklerin, kullanılan populasyon örneklerinin azlığından ve değişik iklim koşullarında ve farklı yükseltilerde bitki gelişiminin farklılık gösterebilmesinden kaynaklanan bir durum olduğu düşünülebilir.

Morfolojik özelliklere dayalı incelemelerde *aleuritia* altcinsine ait *P. algida*, *P. auriculata* ve *P. longipes* türlerinin yaprak morfolojilerinin benzerlik gösterdiği görülebilir. Bu üç türün yaprak uç kısmının şekli akut yapıdadır, yaprak alt yüzeyinde sekonder damarlanmalar belirgin değildir, yaprak kenarlarındaki dişler kör, ince ve sıg yapıdadır ve yaprak alt yüzeyi ile skeyp üzerinde basit tüy varlığına rastlanılmamıştır. Her üç türün taksonlarında genellikle tek bir skeyp gelişimi gözlenmektedir. Yapılan gözlemlerde *longipes* türlerinin yaprak kenarlarındaki unsu örtü yoğunluğu, *P. auriculata* ve *P. algida* türlerine göre daha fazladır. Bu durum, parsimoni ağacında *P. longipes* örneklerinin diğer iki tür örneklerinden daha uzakta yer alma nedenleri arasında sayılabilir. *P. auriculata* ve *P. longipes*'in nemli yerlerde, *P. algida*'nın ise, çayırılık alanlarda yayılış gösterdiği bilinmektedir. Habitatlarındaki bu farklılığa rağmen, parsimoni analizinde *P. auriculata* ve *P. algida*'nın birbirlerine daha yakın olarak yerleştiği görülmüştür. Tespit edilen bu özellikler bu üç türe ait populasyonların kendi aralarında bir grup oluşturmalarına geçerli deliller olarak gösterilebilir.

Diğer araştırma örneklerinin yer aldığı altcins *primula* örnekleri morfolojik karakterler açısından kendi içinde benzerlikler içerirken, altcins *aleuritia*'dan birçok yönden farklılık göstermektedir. Yaprak alt yüzeylerinde ikincil damarlanmalar oldukça belirgindir, yaprak alt kısmında ve skeyp üzerinde değişen yoğunluklarda basit tüy varlığı gözlenmiştir. Yalancı gövde sayısı iki ya da daha fazla olabilmektedir.

Her iki analize dayalı olarak gerçekleştirilen değerlendirmelerde, elde edilen ağaçların kolları arasındaki örtüşmenin altcins seviyesinde uygunluk gösterdiği, ancak daha alt seviyelerde bütünüyle beklenen nitelikte olmadığı görülmüştür. *P. megaseifolia* ve *P. meyeri* populasyonları fenogram ağacında oldukça yakın gruplanırken, Maksimum Parsimoni ağacında ise, bu örneklerin birbirlerine daha uzak benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Aynı altcinsine ait *P. veris*'in iki alttürünün oluşturduğu grup fenogram üzerinde, *P. megaseifolia* ve *P. meyeri* populasyonlarına yakın olarak yerleşmişken, parsimoni analizinde bu grup üyeleri *P. vulgaris* populasyonlarına daha yakın benzerlik göstermiştir.

Fenogram analizinde, altcins *primula* taksonlarından *P. vulgaris* popülasyonuna ait örneklerin oluşturduğu grubun, altcinsin diğer üyelerine daha az benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Parsimoni analizinde ise, altcins *primula* içinde diğer örneklere en az benzerlik gösteren popülasyon grubunun, *P. elatior* subsp. *meyeri* popülasyon örneklerinin oluşturduğu grup olduğu görülmüştür. Altcins *aleuritia* grubuna dahil olan her popülasyon örneği, kendi türüne ait grup içinde yer almıştır. Ancak fenogram analizinde, bu grupta yer alan *P. longipes* haricindeki popülasyon örneklerinin düzenli bir yerleşim göstermediği görülmüştür.

ITS analizlerine dayalı ağaçta, araştırmaya konu olan popülasyonlar arasındaki filogenetik ilişki, ileri derecede ortaya konulmuştur. Altcins ve türler parsimoni analizi ile tamamen birbirinden ayrılmış, hatta popülasyon seviyesinde aynı türün farklı popülasyonları oldukça yakın benzerlik göstererek bir grup oluşturmuştur.

Çalışmada kullanılan popülasyonların farklı coğrafik alanlara göre ITS polimorfizimleri farklılıklar göstermektedir. Araştırılan popülasyonlar içinde üç farklı bölgeden alınan *P. algida* üyelerinden *algida 2* (Rize/İkizdere), *algida 3* (Trabzon / Çaykara) popülasyonu ile daha yakın benzerlik verirken, Ardahan'dan toplanan *algida 1* popülasyonu bu iki örneğe uzak bağlanmıştır. Bu sonuç, ITS bölgelerinin coğrafik ayrımlara bağlı genetik sürüklenmeleri açıklamada kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak daha fazla alandan daha çok popülasyonun örneği alınarak çalışmanın yapılması ile bir coğrafik gruplaşmanın derecesi tespit edilebilir.

5. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışma ile, *Primula* cinsine ait toplam 19 populasyon örneği arasındaki filogenetik ilişkinin ortaya konmasında rDNA ITS baz dizilerinin kullanışlı olduğu sonucuna varılmıştır. ITS baz sıralarının analizi sonrasında, çalışılan örnekler arasındaki yakınlık ilişkilerinin, aynı örneklerin morfolojik analizleri ile genelde uygunluk gösterdiği, ancak populasyon seviyesindeki yerleşimlerde ise bazı farklılıkların ortaya çıktığı görülmüştür.

Yapılan literatür taramaları sonrasında bu cinsin Türkiye taksonları ile ilgili olarak, daha önce yapılmış böyle bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla Kuzey Anadolu'da doğal olarak yetişen 9 *Primula* taksonuna ait ITS baz sıraları ilk kez bu araştırma ile belirlenmiştir. Çalışılan taksonlardan *P. longipes* türü Türkiye'ye endemik bir türdür. Gerçekleştirilen bu çalışmada bu türe ait ITS dizin analizi ilk kez elde edilmiştir ve bu çalışma ile türün gen kaynaklarına önemli bir veri kazandırılmıştır. Bu çalışmada kullanılmak üzere toplanmış *Primula* taksonlarına ait örnekler teşhisleri yapıldıktan sonra herbaryum örneği haline getirilmiş ve KTUB herbaryumuna kazandırılmıştır.

Araştırmanın gerçekleştirildiği taksonlara ait rDNA ITS bölgelerinin toplam uzunluğunun 695-714 bp arasında polimorfizm gösterdiği bulunmuştur. Baz dizilerinin detaylı analizi neticesinde çalışılan bu örnekler için ITS bölgelerinin tür seviyesinde hatta populasyon seviyesinde dahi baz polimorfizmi gösterdiği anlaşılmıştır.

Yapılan moleküler ve morfometrik analizler sonucunda oluşturulan dendogramların genel olarak birbirine benzer sonuçlar ortaya koyduğu belirlenmiştir. Araştırma bölgesi ile sınırlı analiz sonucunda ise, çalışılan bütün *Primula* türleri populasyon seviyesinde birbirlerinden tamamen ayrılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, daha önce *Primula* türleri ile yapılan sistematik çalışmaları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

Yapılan moleküler analiz sonucunda araştırmaya konu olan taksonların kendi altcinsleri içinde bir grup oluşturduğu görülmüştür. Altcins *aleuritia*'ya ait taksonlar bir grupta yer alırken, *primula* altcinsine ait taksonlar diğer bir grupta toplanmıştır. Bu gruplar içinde yer alan aynı türe ait farklı lokaliteden alınmış taksonlar kendi aralarında yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Morfolojik verilere göre daha açıklayıcı bilgiler sunan bu sonuçlar, araştırılan örnekleri kesin olarak birbirinden ayırmıştır.

Morfolojik analizlere dayalı sonuçların daha az bilgilendirici olma nedenleri arasında; kullanılan karakterlerin örnekler için yeterince spesifik olmaması, çalışılan populasyon örneği sayısının az olması, toplanan örneklerin yetiştikleri ortamlara ait iklimsel özelliklerinin farklılıklar göstermesi, populasyon örnekleri için belirlenen karakterlerinin fazla değişkenlik arz etmesi gibi özelliklerin etkili olabileceği sonucuna da varılmıştır.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmaya konu olan *Primula* cinsi, Primulaceae familyasının en büyük cinsidir. Cinsin türleri arasında görülen heterositulus ve türler arası hibritleşmeler bu türlerin teşhisini güçleştirmektedir. Türkiye’de yayılış gösteren bazı *Primula* türlerinin kromozom sayıları henüz belirlenmemiştir. Bu gerçekleştirilirse, ITS polimorfizminin, morfolojik verilerin yanında kromozom sayıları ile uygunluğu da değerlendirilebilir.

P. vulgaris türünün aynı coğrafik alanda birlikte bulunan iki alttürünün çok fazla sayıda popülasyonu üzerinde gerçekleştirilecek moleküler çalışmalar bu taksonlarda karşılaşılan morfolojik ayırım problemlerinin aşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu amaçla *Primula* içindeki temel filogenetik yapıyı çözmek için nrDNA üzerinde gerçekleştirilen ITS (Internal Transcribed Spacers) PCR metodunun yanı sıra diğer nrDNA bölgelerinden örneğin ETS (External Transcribed Spacer) ve IGS (Intergenic Spacer) bölgesi ve kloroplast DNA bölgelerinden örneğin Maturase K (mat K) gen bölgeleri kullanılarak bu popülasyon örneklerinin filogenetik ilişkilerini ortaya koyan daha fazla moleküler veri elde edilebilir.

Bu çalışma, 5’i alttür olmak üzere toplam 9 *Primula* taksonunu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türkiye’de yayılış gösteren fakat bu çalışmada kullanılmamış bu cinsin *sphondylia* altcinsine dahil ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi’ne endemik olan *P. davisii* W. W. Sm. türü ile diğer iki alttürü *P. elatior* subsp. *pallasii* ve *P. elatior* subsp. *pseudoelatior*’u da kapsayacak bir rDNA ITS analizi, tüm Türkiye *Primula*’larının filogenetik ilişkilerini daha kesin bir şekilde açıklamada etkili olacaktır.

Coğrafik dağılış yoğunluklarına bağlı olarak daha geniş bir alanı kapsayan ve fazla sayıda popülasyon örneği içeren çalışmalarla *Primula* cinsi üzerindeki ITS’e dayalı analizler güçlendirilebilir. *Primula* popülasyonlarının araştırma bölgesindeki coğrafik dağılışı göz önünde bulundurularak değişik lokalitelerden toplanacak çok sayıdaki popülasyon örneği ile çalışılması durumunda, örnekler arasındaki filogenetik ilişkinin daha net olarak ortaya konulmasına katkı sağlanacaktır. Bu sayede coğrafik dağılışın ITS polimorfizmi üzerindeki etkileri daha güçlü delillerle desteklenebilecektir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi sırasında faydalanılan modern moleküler metotlardan sağlanan kazanımlar, diğer pek çok taksonomik seviyede karşılaşılan bu gibi problemlerin çözümüne katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Ayaz, S., & İnceer, H., 2003. Chromosome Counts of Some *Primula* L. Species (Primulaceae), Biologia, Bratislava, 58, 1, 45 - 48.
- Baldwin B. G., 1992. Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: an Example from the Compositae. Molecular Phylogeny evolution, 1, 3 - 16.
- Baldwin, B. G., Kyhos D. V. & Dvorak, J., 1990. Chloroplast DNA Evolution and Adaptive Radiation in the Hawaiian Silversword Alliance (Asteraceae). Annual Botanical Garden, 77, 96 - 109.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter J. M., Wojciechowski, M. F., Campell, C. S. & Donoghue, M. J., 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden, 250-272.
- Baldwin, B. G., & Markos, S., 1999. Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae), Molecular Phylogeny evolution, 10, 449 - 463.
- Barrett S. C. H., 1992. Evolution and Function of Heterostyly, Monographs on Theoretical and Applied Genetics, 15, Springer- Verlag, Berlin.
- Barrett S. C H, Jesson L. K & Baker A. M., 2000. The Evolution and Function of *L* Styler Polymorphisms in Flowering Plants, Annals of Botany 85, 253 - 265.
- Beriş, Fatih Şaban, 2001. Çay Bitkisinin (*Camellia sinensis* L. (O. Kuntze)) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Tekniği ile Moleküler Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Beyazoğlu, A.,1989. Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yayılış Gösteren Bazı Primulaceae Taksonları Üzerinde Anatomik Çalışmalar. Turkish Journal of Botany, 3, 3 - 16.
- Bremer, B., Jansen, R., K., Oxelman, B., Lantz, H. & Kim, K. J., 1999. More Characters of More taxa for A Robust Phylogeny, Case Study From the Coffee Family (Rubiaceae), Systematic Biology, 48, 413 - 435.
- Briggs, D. and S.M. Walters., 1997. Plant Variation and Evolution, 3rd ed. Cambridge:University Press.
- Conti E., Suring, E., Boyd D., Jorgensen, J., Grant J. & Kelso, S., 2000. Phylogenetic Relationships and Character Evolution in *Primula* L.: the Usefulness of ITS Sequence data. Plant Biosystems, 134, 385 - 392.

- Darwin C. 1862. On the Two Forms or Dimorphic Conditions in the Species of *Primula*, and on Their Remarkable Sexual Relations. Journal of the Proceedings of the Linnean Society, Botany 6, 77 - 96
- Doyle, J. J., 1992. Gene Trees and Species Trees: Molecular Systematics as One-Character Taxonomy, Systematic Botany, 17, 144 - 163.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L., 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue, Phytochemical Bull., 19, 11 - 15.
- Federov, A., 1965. Prepared by an A. Federov of *Primula* Genus Taxonomy, in edit by Flora of USRR, 86 – 151, S.
- Ganders, F. R., 1979. The Biology of Heterostyly, New Zealand Journal of Botany, 17, 607 - 635.
- Gaskett, A. C., Conti, E. & Schiestl, F. P., 2005. Floral Odor Variation in two Heterostylous Species of *Primula*, Journal of Chemical Ecology, 31, 1223 - 1228.
- Graybeal, A., 1998. Is it Better to Add Taxa or Characters to A difficult Phlogenetic Problem? Systematic Biology, 47, 9 - 17.
- Guggisberg, A., Kelso, S. & Conti, E., 2005. Evolution of Breeding Systems and Ploidy Levels in *Primula* sect. *Aleuritia*, A Paradigm of the Secondary Contact Model, XVII International Botanical Congress_Vienna, Austria, Europe, 65, S.
- Heslop, H. Y., Heslop, H. J. & Shivanna, K. R., 1981. Heterostyly in *Primula* 1. Fine Structural and Cytochemical Features of the Stigma and Style in *Primula vulgaris* Huds. Protoplasma, 107, 171 - 187.
- Karlsson, M. G., 2002. Flower Formation in *Primula vulgaris* is Affected by Temperature, Photoperiod and Daily Light Integral, Scientia Horticulturae, Elsevier, 95, 99-110.
- Kelso, S., 1991. Taxonomy and Phytogeography of *Primula* sect. *Cunelifolia* in North America, Madrano, 38, 37 - 44.
- Kosenko, Y. V., Volkova, P. A. & Shipunov, A. B., 2005. The Analysis of Transition between two *Primula vulgaris* subspecies, XVII International Botanical Congress Vienna, Austria, Europe, 416, S.
- Kurian, V. & Richards A. J., 1997. A New Recombination in the Heteromorphy “S” Supergene in *Primula*, Heredity, 78, 1 - 10.
- Lamond, J., 1978. In Edit. by Davis P. H., Flora of Turkey and The East Aegean, Islands, 6, 112 - 120.
- Li, W., 1997. Molecular Evolution. Sunderland, MA: Sinauer Assoc., Inc.
- Liu, J.S. and C.L. Scharal. 1994. A Conserved Sequence in the Internal Transcribed Spacer1 of Plant Nuclear rRNA Genes. Plant Molecular Biology, 26, 775 - 778.

- Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. ve Reisch, B. I., 1994. A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and Vitis Species. Plant Molecular Biology, 12, 1, 6 - 13.
- Martins, L., Oberprieler, C. & Helwig, F. H., 2003. A Phylogenetic Analysis of Primulaceae s.l. Based on Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Sequence Data, Plant Systematic Evolution, 237, 75 - 85.
- Mast, A. R., Kelso, S., Richards, J., Lang, D. J., Feller, D. M. S. & Conti, E., 2001. Phylogenetic Relationships in *Primula* L. and Related Genera (Primulaceae) Based on Noncoding Chloroplast DNA, Int. Journal Plant Science, 162, 6, 1381 - 1400.
- Mast, A. R., Feller, D. M. S., Kelso, S. & Conti, E., 2004. Buzz-pollinated Dodecatheon Originated from within the Heterostylous *Primula* subgenus *Auriculastrum* (Primulaceae): a Seven-Region cpDNA Phylogeny and Its Implications for Floral Evolution, American Journal Botany, 91, 6, 926 - 942.
- Mather K., 1950. The Genetical Architecture of Heterostyly in *Primula sinensis*, Evolution 4, 340 - 352.
- Mizuhiro, M., Ito, K. & Mii, M., 2001. Production and Characterization of Interspecific Somatic Hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*, Plant Science, 161, 489 - 496.
- Ohta, T., 1991. Multigene families and the evolution of complexity. Journal of Molecular Evolution, 33, 34 - 41.
- Ornduff, R., 1979. Pollen How in *Primula vulgaris*. Botanical. Journal of the Linnean Society 78, 1 - 10.
- Pınar, N. M., Doğan, D., Akgül, G. & Geven, F., 2005. The Pollen Morphology of the Wild *Primula* L. (Primulaceae) Species in Turkey, XVII International Botanical Congress_Vienna, Austria, Europe, 327, S.
- Piper, J. & Charlesworth, B., 1986. The Evolution of Distyly in *Primula vulgaris*, Biological Journal of the Linnean Society, 29, 123 - 137.
- Podani, J., Syn-Tax-pc. Computer Programs for Multivariate Data Analysis in Ecology and Systematics, Version 5.0, Scienta Publishing, Budapest, 1993.
- Podani, J., 1994. Multivariate Data Analysis in Ecology and Systematic: A Methodological Guide to Syn-Tax 5.0 Package, SPB Academic Publishing, Netherlands.
- Polanco, C., A.I. Gonzalez, A. de la Fuente, and G.A. Dover. 1998. Multigene Family of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Reveals Contrasting Patterns of Homogenization for IGS and ITS Spacer Regions: A Possible Mechanism to Resolve This Paradox. Genetics 149, 243 - 256.
- Pomper, K. W, Azarenko, A. N, Bassil, N, Davis, J. W ve Mehlenbacher, S. A. 1998. Identification of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Self-Incompatibility Alleles in *Coryllus avellana* L., Theor. Appl. Genet., 97, 479 - 487.

- Posada, D. & Crandall K.A., 1998. Modeltest: Testing the Model of DNA Substitution. *Bioinformatics*, 14, 817 - 818.
- Prajapati, D. N., Knox, J. F., Emmons, J., Saeian, K., Csuka, M. E. & Binion, D. G., 2003. Leflunomide Treatment of Crohn's Disease Patients Intolerant to Standard Immunomodulator Therapy, *J Clin Gastroenterol*, 37, 2, 125 - 133.
- Rechinger, K. H., 1970. *Primula*. Flora Des Iranischen Hochlandes Und Der Umrahmenden Gebirge, *Flora Iranica*, 1 - 13.
- Richards J., 1993. *Primula*. Timber Press. Portland.
- Sang, T., Crawford, D. J. & Stuessy T. F., 1997. Chloroplast DNA Phylogeny, Reticulate Evolution, and Biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae), *American Journal Botany*, 84, 1120 - 1136.
- Sneath, P.H.A. ve Sokal, R.R., 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Soltis, P. S., Soltis D. E., and Doyle, J. J., 1992. Molecular Systematics of Plants, Chapman & Hall, New York, 14 – 35.
- Stappen, V. J., S. van Campenhout, S. Gama Lopez, and G. Volckgert. 1998. Sequencing of the Internal Transcribed Spacer Region ITS1 as A Molecular Tool in Detecting Variation in the *Stylosanthes guianensis* Species Complex. *Theoretical Applied Genetics*, 96, 869 - 877.
- Swofford, D. L., 2000. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 3. 11. Computer Program Distributed by The Illinois. Natural History Survey, Champaign III.
- Taberlet, P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J., 1991. Universal Primers for Amplification Three Non-coding Regions of Chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology*, 17, 1105 - 1109.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins., 1997. The ClustalX Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.*, 24, 4876 - 4882.
- Valentine, D., H. and Kress, A., 1972. *Primula* in edited by Flora of European, 3, 14 -29.
- Webster, M. A., and Gilmartin, P. M., 2006. Analysis of Late Stage Flower Development in *Primula vulgaris* Reveals Novel Differences in Cell Morphology and Temporal Aspects of Floral Heteromorphy, Centre for Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, The University of Leeds, *New Phytologist*, 1 - 13.
- Weddeburn, F. & Richards, A. J., 1990. Variation in within Morph incompatibility Inhibition Sites in Heteromorphic *Primula* L. *New Phytologist*, 116, 149 - 162.
- Wendelbo, P., 1961. Studies in the Primulaceae III: on the Genera Related to *Primula* with Special Reference to Their Pollen Morphology, *Flora of Turkey*, 19, 1 - 31.

Zeybek, N. & Zeybek, U., 1994. Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 2, 216 - 217.

8. EKLER

Ek 1. *P. subsp. vulgaris*1 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
TTTACAACCACCACTTGCCGCGACGTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCA
CTAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGT
GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCG
CAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
TTATGCAAGATTCGTACACTCCTAATAGCCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGCAATATTTGT
TGAATTTCTTGGCGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACACAA
GGCCCCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGGCC
CAAGGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTACATACGAGTTCACAGGTCGTGCAACTTTACA
GTTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 2. *P. subsp. vulgaris*2 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
TTTACAACCACCACTTGCCGCGACGTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGCGCGCAC
TAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGTG
TAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGC
AACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT
TTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTAT
TATGCAAGATTCGTACACTCCTAATAGCCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTTG
TTGAATTTCTTGGCGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACACA
AGGCCCCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGGC
CCAAGGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTACATACGAGTTCACAGGTCGTGCAACTTTAC
AGTTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 3. *P. subsp. vulgaris*3 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
 GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
 TTTACAACCACCACTTGCCGCGACGTTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCA
 CTAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGT
 GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCG
 CAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
 TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
 TTATGCAAGATTCATACACTCCTAATAGCCCGCAAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTT
 GTTGAATTTCTTGACGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACAC
 AAGGCCCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGG
 CCAAGGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTACATACGAGTTCACAGGTTCGTCAACTTTA
 CAGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA

Ek 4. *P. subsp. vulgaris*4 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
 GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
 TTTACAACCACCACTTGCCGCGACGTTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCA
 CTAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGT
 GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCG
 CAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
 TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
 TTATGCAAGATTCATACACTCCTAATAGCCCGCAAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTT
 GTTGAATTTCTTGCGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACAC
 AAGGCCCCCCCGTGGGAGGCGACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGG
 CCAAGGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTACATACGAGTTCACAGGTTCGTCAACTTTA
 CAGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 5. *P. subsp. sibthorpii1* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
 GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
 TTTACAACCACCACTTGCCGCGACGTTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGCCGCGCAC
 TAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGTG
 TAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGC
 AACTTGC GTTCAAAA ACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT
 TTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTAT
 TATGCAAGATTCGTACACTCCTAATAGCCCGCAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTTG
 TTGAATTTCTTTGGCGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACACA
 AGGCCCCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGGC
 CCAAGGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTACATACGAGTTCACAGGTTCGTGCAACTTTAC
 AGTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 6. *P. subsp. sibthorpii2* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
 GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
 TTTACAACCACCACTTGCCGCGACGTTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCA
 CTAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGT
 GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCG
 CAACTTGC GTTCAAAA ACTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
 TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
 TTATGCAAGATTCATACACTCCTAATAGCCCGCAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTT
 GTTGAATTTCTTTGACGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACAC
 AAGGCCCCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGG
 CCAAGGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTACATACGAGTTCACAGGTTCGTGCAACTTTA
 CAGTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 7. *P. veris* subsp. *columnae* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
TTTACAACCACCACTTGCCACGACGTTCGATCATCAGGACTCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCA
CTAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGT
GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGACTTCGGGCG
CAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTACAGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
TATGCAAGATTCTTACACTCGTAATAGCCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTTG
TTGAATTCCTTGACGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACACA
AGGCCCCCTGTGGGAGACAACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGGT
CCAAGGACTGTTCCGGTGCCCTCCCGATTTATATAACGAGTTCACGGGTCATGCAACTTTAC
AGTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 8. *P. veris* subsp. *macrocalyx* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGAAACAGTC
TTTACAACCACCACTTGCCACGACGTTCGATCATCAGGACTCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCA
CTAGTGCACACGGGGAGCCAGTATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGT
GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGACTTCGGGCG
CAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTACAGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TTTGCTATGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
TATGCAAGATTCTTACACTCGTAATAGCCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTTG
TTGAATTCCTTGACGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACACA
AGGCCCCCTGTGGGAGACAACGAGCACACACTCACCCAGCGAGGATGGACAAGGAAAGGT
CCAAGGACTGTTCCGGTGCCCTCCCGATTTATATACTAAGTTTATGGGTCATGCAACTTT
ACAGTTTTCAACAAAGATCCTTCCCTAGGTTTTCCCTCTGAAA

Ek 9. *P. megaseifolia*1 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCGTGACATCGTGTACGATACAGGCACCAAGCAAATGCC
GGTACTGGGTCAATGATACTCACGATAACAAATGAATCGTGCACGTCAGCATGCAACTGTC
TTTACAACCACCACTTGCTGGTACTTTGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCA
CTAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGTCCTAATGAGATTTGGTGT
GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCG
CAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
TATGCAAGATTCTTACACTCCTAGTAGCCCGCGAACGGGAGAAAGGAGCGCAATCTATTTG
TTGAATTCCTTGACGCAGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTCCACA
AGGCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGCGGGGATGGACAAGGAAAGGC
CCAAGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTATATACGAGTTCACGGGTCGTGCAACTTTACA
GTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 10. *P. megaseifolia*2 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTACGATCGAGGCACCAAGCAAATGGC
GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACAAACGAAACGTGCACGACAGCATGCAACAGTC
TTTACAACCACCACTTGCCGCGACGTTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCA
CTAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGTCCTAATGAGATTTGGTGT
GTAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCG
CAACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCAT
TTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTA
TATGCAAGATTCTTACACTCCTAGTAGCCCGCGAACGGGAGAAAGGAGCGCAATCTATTTG
TTGAATTCCTTGACGCAGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTCCACA
AGGCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGCGGGGATGGACAAGGAAAGGC
CCAAGACTGATCCGGTGCCCTCCCGATTTATATACGAGTTCACGGGTCGTGCAACTTTACAG
TTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 11. *P. subsp. meyeri*1 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGAAAATGGC
 GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGCAACAGTC
 TTACAACCACCACTTGCCGCGACGTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCAC
 TAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGTG
 TAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGC
 AACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT
 TTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTAT
 ATGCAAGATTCTTACACTCCTAACAGCCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTTGT
 TGAATTCCTTGACGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACACAA
 GGCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGAGAGGATGGACACAAGGAAAGG
 CCCACGGACTGATCTGGTGCCCTCCCGATTTATATACGAGTTCACGGGTTCGTGCAACTTTA
 CAGTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 12. *P. subsp. meyeri*2 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCACGATCGAGGCACCAAGAAAATGGC
 GCTACAGGGTCAATGAGACTCCCGATAACGAACGAAACGTGCACGACAGCATGCAACAGTC
 TTACAACCACCACTTGCCGAGACGTCGATCATCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCAC
 TAGTGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCAATGCCCTAATGAGATTTGGTGTG
 TAGCGACGCATTATGAGAGACACCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGC
 AACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT
 TTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTAT
 ATGCAAGATTCTTACACTCCTAACAGCCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGCAATCTATTTGT
 TGAATTCCTTGACGCGGATCGCGCCGGGGTTCGTTGCTTTGCCAGGAAATGTGTACACAA
 GGCCCCCGTGGGAGACGACGAGCACACACTCACCCAGAGAGGATGGACACAAGGAAAGG
 CCCAAGGACTGATCTGGTGCCCTCCCGATTTATATACGAGTTCACGGGTTCGTGCAACTTTA
 CAGTTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 13. *P. longipes1* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAGGCACCAAACAAATGGA
GCTCAGGGTCATAGAGTCTTCCGATTTCGATCGAAACGAGCGCGACAGCATGCAACAGTTTG
ACAACCACCACTTGCCGCGACGTCGACCGTCGGGACTCTTATTTAGGCCGACCGCGTACAA
AGGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTACTCACACCAGCACCCATAGGGGAGGTGAGGAGCG
ACGCTTTATGAGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGCACTTGCA
TTCAAAAACCTCGATGGTTACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTGCTACG
TTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTAATATGCAAG
ACGCCACCACTCCTAACATCCCGCGAACGGGAGCAAGAAGAGTGAATCTCTTTGTTGAATT
TCCTTGCGCGGTTTCGCGCCGGGGTTTCGTTGTTCTGCTAGGAATGCGAACAAGTGCCCTTA
GAGGACAACATGGCCGCAACCTAGCAAGGGAGTACACCGAAAAGGCCAGAGACCCGTCCGA
TGACTCCCGGAGTAGATAACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTAGCAGTTTTTCGACAATGATC
CTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 14. *P. longipes2* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAACTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAGGCACCAAACAAATGGA
GCTCAGGGTCATAGAGTCTTCCGATTTCGATCGAAACGAGCGCGACAGCATGCAACAGTTTG
ACAACCACCACTTGCCGCGACGTCGACCGTCGGGACTCTTATTTAGGCTGACCGCGTACAA
AGGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTACTCACACCAGCACCCATAGGGGAGTGTGAGAAGC
GACGCTTTATGAGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGCGCAACTTG
CGTTCAAAAACCTCGATGGCTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTGCTA
CGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTAATATGCA
AGACGCCACCACTCCTAACATCCCGCGAACGGGAGCAAGAAGAGTGAATCTCTTTGTTGAA
TTTCCTTGCGCGGTTTCGCGCCGGGGTTTCGTTGTTCTGCTAGGAATGCGAACAAGTGCCCT
TAGAGGACAACATGGCCGCAACCTAGCAAGGGAGTACACCGAAAAGGCCGGAGACCCATCC
GATGTCTCCCGGAGTAGATAACAAGTTCACGGGTCGTTCTGCTTAGCAGTTTTTCGACAATGA
TCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 15. *P. auriculata*1 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAGGCACCAAGAAAATGGT
GCTACAGGGTCAATAAGTCTGCCGAGGGATCGAAACGAGCGCGGCAACATGCAACAGTTTG
ACAACCACCACTTGCCGCGACGTCGATCGTCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCACAA
ATGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTACAAGCACCGACGCCATGATGGGAGTTGGTGGGTG
TAGCGACGCATTATGAGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATGGCTTTGGGCGCAA
CTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTT
GCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTATAT
GCAAGATTCTTACGCTCCAAGCAACCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGTTATCTCTTTGTTT
AATTTCTTGGCGCAGATCGCGCCGGGGTTCGTTGTTGTGCCGGGAATGCGAACCCGCACC
TCAGAGAGGCAACGCGTACGCACACCTAGCTAAGATGAACACCGAACGGCTCAAGACCGAT
CCGATGCCATCCCGTTTTAGGTACTTGTTCACGGGTCTGTGCAACTTTACAGTTTTTCGACAA
TGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 16. *P. auriculata*2 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAGGCACCAAGAAAATGGT
GCTACAGGGTCAATAAGTCTGCCGAGGGATCGAAACGAGCGCGGCAACATGCAACAGTTTG
ACAACCACCACTTGCCGCGACGTCGATCGTCGGGACTCGTTTTTAGGCCGACCGCGCACAA
ATGCACACGGGGAACCAATATCCGCTACAAGCACCGACGCCATGATGGGAGTTGGTGGGTG
TAGCGACGCGTTATGAGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATGGCTTTGGGCGCAA
CTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTT
GCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTATAT
GCAAGATTCTTACGCTCCAAGCAACCCGCGAACGGGAGCAAGGAGCGTTATCTCTTTGTTT
AATTTCTTGGCGCAGATCGCGCCGGGGTTCGTTGTTGTGCCGGGAATGCGAACCCGCACC
TCAGAGAGGCAACGCGTACGCACACCTAGCTGAGATGAACACCGAACGGCTCAAGACCGAT
CCGATGCCATCCCGTTTTAGGTACTTGTTCGCGGGTCTGTGCAACTTTACAGTTTTTCGACAA
TGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 17. *P. algida1* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCCGAGGGCCCTCCCCCGACTTGGGGTCTCGACCGCGCCCCACACAAATGCG
 CCTTCAGGGTCAATGATTCTACTGTTGGGATTGCCACGGCCCCCGCCGCGTGCAACCGTTG
 GACAACACCACTGGCCGCGCCCCCTACTCGTGGGACTCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCACA
 AACGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAAGCACCGACACCCTAATGGGAGTTGGTGGGT
 GTAGCGACGCATTATGAGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATGGCTTCGGGCGCA
 ACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
 TGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTATA
 TGTAAGATTCTTACGCTCCGAACAACCCGCGAACGGGAGAAGGAGCGTGATCTCTTTGTTG
 AATTTCCCTGGCGAGGATCACGCCGGGGTTCGTTGTTGTGTTAGGAAATGCGGACTCGCAG
 CCCCAGAGAGGGCAACGCGTACACACACCCAACAAGGATGTACACCGAACGGTCCGAGGAC
 CAATCCGATGCCATCCCGTTTTAGGTACTTGTTCACGGGTCATGCAACTTTACAGTTTTCG
 ACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 18. *P. algida2* Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTTCGCGATCGAGGCACCAAACAAATGGT
 GCTACAGGGTCAATGAGTCTACCGTTGGGATTGAAACGCGCGCGGCATCATGCAACAGTTT
 GACAACCACCACTTGCCGCGACGTCAATCGTGGGACTCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCACA
 AACGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAATCACCGACACCCTAATGGGAGTTGGTGGGT
 GTAGCGACGCATTATGAGACGCCAGGCAGACGTGCCCTCAGCCTAATGGCTTCGGGCGCA
 ACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
 TGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTATA
 TGTAAGATTCTTACGCTGCGAACAACCCGCGAACGGGAGCAGGAGCGTGATCTCTTTGTTG
 AATTTCCCTGGCGCGGATCACGCCGGGGTTCGTTGTTGTGTTAGGAAATGCGGACTCGCAG
 CCCCAGAGAGGGCAACGCGTACACACACCCAACAAGGATGTACACCGAACGGTCCGAGGAC
 CAATCCGATGCCATCCCGTTTTAGGTACTTGTTCACGGGTCATGCAACTTTACAGTTTTCG
 ACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA

Ek 19. *P. algida*3 Populasyon Örneğine Ait rDNA ITS Bölgesinin Baz Sırası

TTAAATTCAGCGGGTAATCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAGGCACCAAACAAATGGT
GCTACAGGGTCAATGAGTCTACCGTTGGGATTGAAACGCACGCGGCAGCATGCAACAGTTT
GACAACCACCACTTGCCGCGACGTCAATCGTCGGGACTCGTTTTTTAGGCCGACCGCGCACA
AACGCACACGGGGAGCCAATATCCGCTTCAATCACCGACACCCTAATGGGAGTTGGTGGGT
GTAGCGACGCATTATGAGACGCCAGGCAGACGTGCCCCAGCCTAATGGCTTCGGGCGCA
ACTTGCGTTCAAAAACCTCGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT
TGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCTAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGTTATA
TGTAAGATTCTTACGCTGGAACAACCCGCGAACGGGAGCAGGAGCGTGATCTCTTTGTTGA
ATTTCCCTGGCGCGGATCACGCCGGGGTTCGTTGTTGTGTTAGGAAATGCGGACTCGCAAC
CCCAGAGAGGGCAACGCGTACACACACCCAACAAGGATGTACACCGAACGGTCCGAGGACC
AATCCGATGATCCCGTTTTAGGTA CT TGTTCACGGGTCATGCAACTTTACAGTTTTCGACA
ATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGAAA

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Trabzon'un Vakfıkebir ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Beşikdüzü'nün Kalegüney Köyü'nde, ortaöğrenimini ise Beşikdüzü Atatürk Lisesi'nde tamamladı. 1998 yılında Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yükseköğrenimine başladı, 1999 - 2000 eğitim - öğretim döneminde Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne yatay geçiş yaparak lisans öğrenimine burada devam etti. Bu bölümden 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2003 - 2004 eğitim - öğretim döneminde K.T.Ü. Yabancı Diller Bölümü Yüksek Lisans İngilizce Hazırlık Programı'nı başarıyla tamamladı. Halen yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.