KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAFKASYA'DA YAYILIŞ GÖSTEREN *PRIMULA* L. (PRIMULACEAE) TAKSONLARININ *MATK* GENİ BAKIMINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Murat Erdem GÜZEL

OCAK 2012
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAFKASYA'DA YAYILIŞ GÖSTEREN *PRIMULA* L. (PRIMULACEAE) TAKSONLARININ *MAT*K GENİ BAKIMINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Murat Erdem GÜZEL

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26.12.2011
Tezin Savunma Tarihi : 11.01.2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Murat Erdem GÜZEL Tarafından Hazırlanan

KAFKASYA'DA YAYILIŞ GÖSTEREN *PRIMULA* L. (PRIMULACEAE) TAKSONLARININ *MAT*K GENİ BAKIMINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 27/12/2012 gün ve 1435 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan	**: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ**	**……**
Üye	**: Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ**	**……**
Üye	**: Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU**	**....……**

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

"Kafkasya'da Yayılış Gösteren *Primula* L. (Primulaceae) Taksonlarının *mat*K Geni Bakımından Karşılaştırılması" adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışma Kafkasya Bölgesi ülkeleri olan Türkiye, İran, Azerbaycan, Rusya ve Ermenistan'dan toplanan 18 *Primula* L. (Primulaceae) taksonuna ait 43 populasyon üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans tez danısmanlığımı üstlenerek çalısmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ'ye minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK (110T045)'a, örneklerin temin edilmesinde yardımcı olan Vahid Farzaliev (Azerbaycan), Dr. Anush Nersesyan (Ermenistan), Ramazan Murtazaliev (Dağıstan) ve Lida Mahamadgolizad (İran)'a ayrıca literatür temininde yardımcı olan Tatyana Shulkina (USA)'ya, laboratuar çalışmalarının yürütülmesinde ve tezin yazılmasında yardımcı olan Arş. Gör. Mutlu GÜLTEPE'ye yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmaları sırasında beni yalnız bırakmayarak motive eden Müslüm TOKGÖZ'e, Arş. Gör. Aykut SAĞLAM'a ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. En önemlisi maddi ve manevi varlıklarıyla her zaman yanımda olan aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Murat Erdem GÜZEL
Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Kafkasya'da Yayılış Gösteren *Primula* L. (Primulaceae) Taksonlarının *mat*K Geni Bakımından Karşılaştırılması" başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ'nin sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 26/12/2011

Murat Erdem GÜZEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ III
TEZ BEYANNAMESİ IV
İÇİNDEKİLER V
ÖZET VII
SUMMARY VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ IX
TABLOLAR DİZİNİ X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ XI
1. GENEL BİLGİLER 1
1.1. Giriş 1
1.2. Çalışmanın Amacı 2
1.3. *Primula* L. (Primulaceae) Cinsinin Sistematikteki Yeri 3
1.4. *Primula* Cinsinin Dünyadaki Yayılış 3
1.5. *Primula* Cinsi Üzerinde Yapılan Çalışmalar 5
1.6. Filogenetik Sistematik 7
1.7. Bitki Sistematiğinde Kullanılan Karakterler 8
1.7.1. Yapısal Karakterler 8
1.7.2. Biyokimyasal Karakterler 10
1.7.3. Moleküler Karakterler 10
1.7.3.1. Kloroplast DNA (cpDNA)'sı 11
1.7.4. *matK* Geni 12
1.7.4.1. *matK* Geninin Sistematikte Kullanımı 13
1.7.4.2. *matK* Genin Çoğaltılması (Amplifikasyonu) İçin Kullanılan Primerler 14
1.8. DNA İzolasyonu 15
1.9. Kafkasya Bölgesinin Genel Özellikleri 15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR 17
2.1. Materyal Temini ve Saklanması 17
2.2. Çalışılılan Örneklerden DNA İzolasyonu 22
2.3. *matK* Genin Çoğaltılması 23

2.4. Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları 25
2.5. Baz Dizin Analizlerinin Gerçekleştirilmesi 25
2.6. Veri Analizlerinin Gerçekleştirilmesi 25
3. BULGULAR 27
4. TARTIŞMA 37
5. SONUÇLAR 42
6. ÖNERİLER 43
7. KAYNAKLAR 45
ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

KAFKASYA'DA YAYILIŞ GÖSTEREN *PRIMULA* L. (PRIMULACEAE) TAKSONLARININ *MAT*K GENİ BAKIMINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Murat Erdem GÜZEL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ
2012, 49 Sayfa

Bu çalışma ile Kafkasya bölgesinde yayılış gösteren 18 *Primula* L. (Primulaceae) taksonuna ait 43 populasyon *mat*K geni baz profili bakımından incelenmiştir. Çalışmanın yürütülmesi için gerekli bitki materyalleri Türkiye, Gürcistan, İran, Azerbaycan, Rusya ve Ermenistan'dan toplanmış veya herbaryumlardan temin edilmiştir. DNA izolasyonu silikajel içerisinde saklanan sağlıklı yapraklardan veya herbaryum örneklerinden yapılmıştır. *mat*K geni evrensel primerler kullanılarak çoğaltılmış, dizin analizleri hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Çalışılan taksonların baz sıraları hizalandıktan sonra tür içi ve türler arası akrabalık ilişkileri filogeneik programlar aracılığı ile belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda *mat*K geninin 1529 ile 1541 bp arasında bir uzunluğa sahip olduğu, ATG baz dizisiyle başlayıp TGA baz dizisiyle sonlandığı bulunmuştur. İncelenen taksonlardan *P. algida* ile *P. farinifolia*'nın % 99,8'lik benzerlik düzeyiyle birbirine en yakın, *P. longipes* ile *P. elatior* subsp. *pallasi*'nin % 91'lik benzerlik düzeyiyle birbirine en uzak türler olduğu tespit edilmiştir. Ülkemiz endemiği olan *P. longipes'*in *mat*K geni baz sırası açısından ait olduğu *Aleuritia* altcinsi taksonlarından çok önemli baz farklılıklarına sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca incelenen örneklerin *mat*K geni baz sıralarında altcins düzeyinde çok önemli delesyonlar ve insersiyonlar tespit edilmiştir. % GC içerikleri (Subgen. *Aleuritia*: 31,8-32,8; Subgen. *Primula*: 31,6-32,0) ve Pürin/Primidin oranları (Subgen. *Aleuritia*: 0,885-0,908; Subgen. *Primula*: 0,873-0892) $p<0.005$ düzeyinde istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kafkasya, cpDNA, *mat*K geni, polimorfizm, *Primula*, Türkiye

Master Thesis

SUMMARY

COMPARATION OF THE WILD *PRIMULA* L. (PRIMULACEAE) TAXA BASED ON *MAT*K GENE DISTIRBUTED IN THE CAUCASUS

Murat Erdem GÜZEL

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ
2012, 49 Pages

In this study, 43 populations belong to 18 *Primula* L. (Primulaceae) taxa distributed in Caucasus were investigated in terms of *mat*K polymorphism. Plant materials used in this study collected during field study in Turkey and Georgia or obtained from several herbaria in Iran, Azerbaijan, Russia and Armenia. Total genomic DNA was extracted from silica-dried material and/or herbarium material. *mat*K gene was amplified using universal primers and sequencing by Macrogen Inc. After aligned all the sequences, intraspesific and interspesific relationships were explored by using a phylogenetic program of MEGA5. As a result of the phylogenetic analysis, it was determined that the *mat*K has a length of 1529 to 1541 bp, begins with ATG codon and finishes with TGA codon. Furthermore, *P. algida* and *P. farinifolia* are the closest taxa with a 99,8 % similarity level, *P. longipes* and *P. elatior* subsp. *pallasi* are the farest taxa. In addition, statistically significant differences ($p<0.005$) in the GC % content and Purin/Pirimidin ratio were determined between subg. *Aleuritia* and subg. *Primula*. Lastly *P. longipes* endemic to Turkey includes several base substitutions differing from the rest of *Aleuritia* members.

Key Words: Caucasus, cpDNA, *mat*K gene, polymorphism, *Primula*, Turkey

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. *Primula* cinsinin Dünya üzerindeki genel yayılışı 4
Şekil 2. *matK* geninin kloroplast DNA'sı üzerindeki yerleşimi 12
Şekil 3. Kafkasya Bölgesi 16
Şekil 4. Çalışılan taksonların Kafkasya Bölgesindeki dağılışı 17
Şekil 5. Kullanılan primerlerin şematik yerleşimi 24
Şekil 6. Çalışılan taksonlar aralsındaki tür üstü (seksiyon/altcins) seviyede filogenetik ilişkiler 35
Şekil 7. Çalışılan taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiler 36

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. *matK* genini çoğaltmak için kullanılan bazı evrensel primerler 14
Tablo 2. Çalışılan taksonların toplama bilgileri ve taksonomik düzeyleri 18
Tablo 3. Bu çalışmada kullanılan primerler ve en uygun PCR şartları 24
Tablo 4. *matK* geninin PCR ile çoğaltılması için kullanılan kimyasallar 24
Tablo 5. Çalışılan taksonların *matK* geni uzunlukları (bp) 27
Tablo 6. *matK* geninin bazı özellikleri 28
Tablo 7. Çalışılan *Primula* taksonlarında *matK* geninin yapısal durumu 30
Tablo 8. Çalışılan tüm taksonlara ait "Benzemezlik Matriksi" 31
Tablo 9. Çalışılan örneklerin *matK* geni baz profili 32

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	:	Baz çifti
AFLP	:	Artırılan Parça Uzunluğu Çeşitliliği
cpDNA	:	Kloroplast DNA
dH_2O	:	Distile su
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	:	Deoksinükleozit trifosfat
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ETS	:	External Transcribed Spacer
IGS	:	Intergenic Spacer
KTUB	:	KTU Biyoloji Bölümü Herbaryumu
*mat*K	:	Maturase K geni
ML	:	Maksimum Likelihood
$MgCl_2$	:	Magnezyum klorür
nrDNA	:	Nüklear ribozomal DNA
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD	:	Pairwise Distance
PVPP	:	Poly Vinyl Polypyrrolidone
RNA	:	Ribonükleik Asit
TAE	:	Tris-Asetik asit-EDTA
Taq	:	*Thermus aquaticus*
TE	:	Tris-EDTA
µl	:	Mikrolitre

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kafkasya bölgesi dünyanın önemli sıcak bölgelerinden biridir (Fayvush ve Tamanyan, 2011). Aynı zamanda birçok cinsin gen merkezi olan bölge biyoçeşitlilik bakımından da dikkat çekmektedir. Barındırdığı türlerin yaklaşık dörtte biri endemiktir (Williams, 2004). Bu bölgede yayılış gösteren önemli cinslerden biri olan *Primula* L. (Primulaceae) içerdiği tür sayısı bakımından Primulaceae familyasının en büyük cinsidir. *Primula* cinsi Kafkasya'da farklı kaynaklarda farklı sayılar verilmekle birlikte 25 takson ile temsil edilmektedir. Bunların 17'si ise Kafkas endemiğidir (Federov, 1965; Lamond, 1978, Schatz, 2006; Wendelbo, 1965). *Primula* cinsi süs bitkisi ve halk ilacı olarak kullanılabilen bir özelliğe de sahip olmasından dolayı sistematikçiler başta olmak üzere, ekologlar ve genetikçiler tarafından değişik açılardan araştırılmıştır ve araştırılmaya devam edilmektedir. Cinsin birçok çalışmaya konu olması temelde dört sebebe dayandırılmaktadır:

a. Ekolojik yönden dünyanın değişik yerlerinde yayılış gösterebilmesi; *Primula* cinsinin gen merkezi Himalaya Dağları ve Doğu Çin olmakla birlikte Arabistan, Afrika, Amerika, Kafkasya gibi çok değişik bölgelerde de yayılış göstermektedir (Richards, 2003),

b. Farklı iklim şartlarına uyum gösterebilmesi; genel olarak nemli ortamlarda bulunmakla birlikte çok değişik iklim şartlarına da uyum gösteren taksonları vardır. Örneğin, *P. verticillata* Forsskal Arabistan çöllerine, *P. buryana* Balf. ise Himalaya bölgesinde buzul taşları üzerinde yayılış göstermektedir (Richards, 2003),

c. Heterositulus durumu; *Primula* cinsi üyelerinin yaklaşık %91'inde heterositulus durumu görülür. Aynı türün bir bireyinde situlusu uzun, sitigma papillası büyük, polenleri küçük çiçekler meydana gelir. Bu türün diğer bireyi ise kısa situluslu, küçük papillalı, büyük polenli çiçekler verir. Bu durum autogamiyi (kedi kendine döllenme) engelleyerek allogamiyi (yabancı döllenme) teşvik etmektedir (Zeybek ve Zeybek, 2004). Bu durum taksonomi için problem teşkil edecek ve aynı zamanda genetik çeşitliliği artıracak olan yeni rekombinasyonların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır,

d. Doğal hibritleşmenin sıkça oluşabilmesi; Heterositulus durumundan dolayı tür içi veya yakın türler arasında sıkça doğal hibridizasyon gerçekleşmektedir. Bu doğal hibritlerin bir kısmı kısırken bir kısmı üreyimlidir.

Bilim ve teknolojide yaşanan gelişmeler, içinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli doğal kaynağının genetik kaynaklar olduğunu göstermektedir. Bu kaynaklara sahip çıkmak, genetik materyalleri muhafaza etmenin yanında bu kaynakların faydaya dönüştürülmesini zorunlu kılmaktadır. Özellikle modern biyoteknolojide sağlanan gelişmeler, organizmaların bir bütün olarak değerlendirilmesinin yanında gen düzeyinde de değerlendirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu nedenle doğal kaynaklarımızı oluşturan her türlü canlı organizmanın her yönüyle araştırılması bir zorunluluk olmuştur (Bayazit, 2007). Son yıllarda dünyanın her yerinde, doğal türlerin sahip olduğu zengin çeşitliliği ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalar büyük hız kazanmıştır. Ülkemizin Doğu Karadeniz Bölgesini de içerisine alan Kafkasya bölgesi yaklaşık 6,500 vasküler bitki türünü barındırmaktadır ve bunların yaklaşık dörtte biri endemiktir (Williams, 2004).

1.2. Çalışmanın Amacı

Çalışmanın amaçlarını genel olarak şu başlıklar altında toplayabiliriz:

a. Kafkasya bölgesinde yayılış gösteren *Primula* L. cinsine ait bazı taksonların *mat*K geni dizinlerinin belirlenmesi,

b. Çalışılan taksonlar arasındaki *mat*K geni polimorfizimin ortaya konulması,

c. *mat*K geninin *Primula* cinsi içindeki taksonomik değerinin belirlenmesi,

d. Geleneksel sınıflandırmadan kaynaklanan problemlerin çözümünde *mat*K geninin kullanılabilirliğinin ortaya konulması,

e. Kafkasya'da doğal olarak yayılış gösteren *Primula* cinsine ait taksonların akrabalık ilişkilerinin moleküler verilere dayalı olarak ortaya konulmasıdır.

1.3. *Primula* L. (Primulaceae) Cinsinin Sistematikteki Yeri

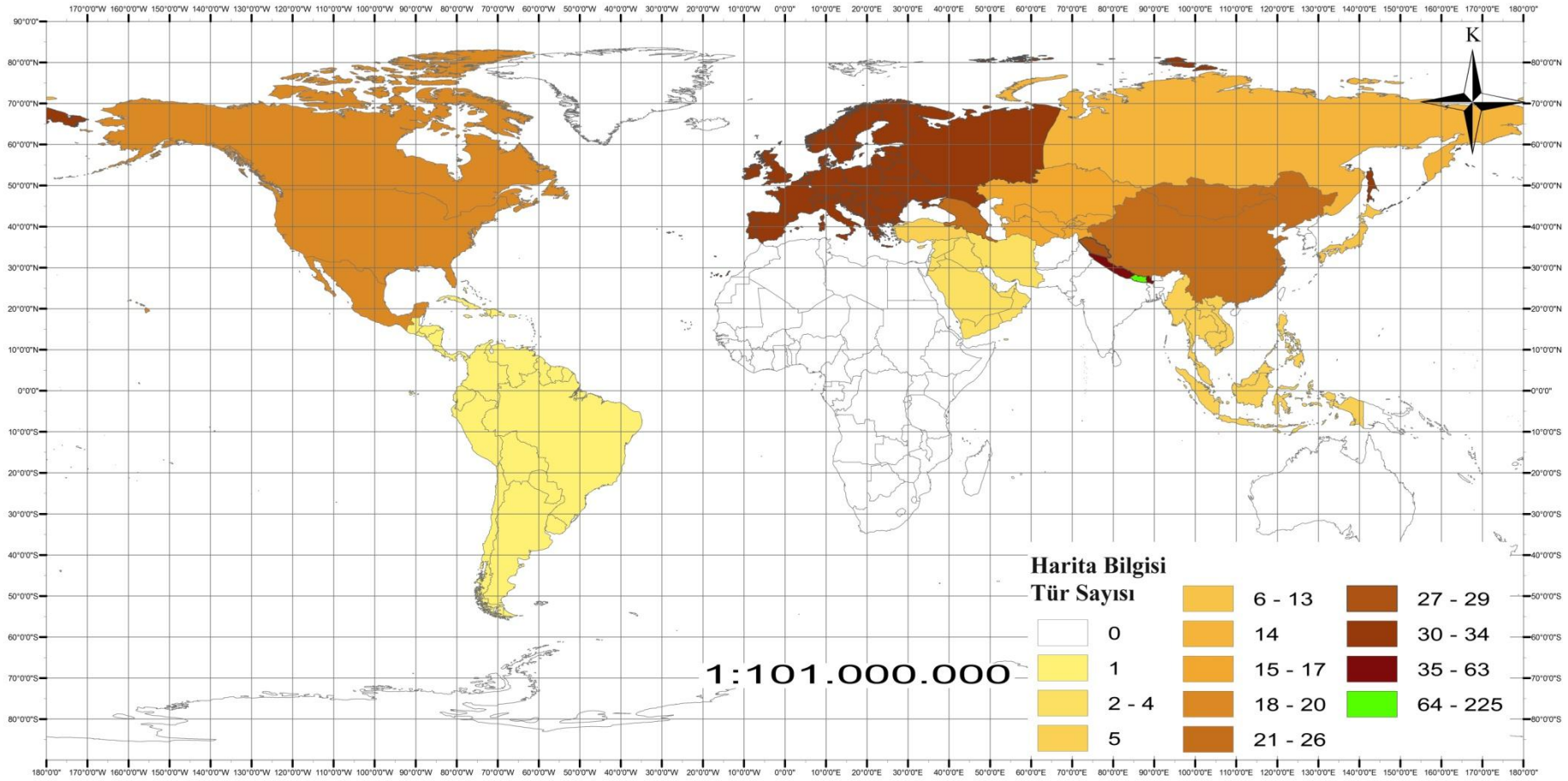
Cronquist (1981)'a göre *Primula* cinsinin bitkiler alemindeki yeri aşağıdaki gibidir.

Alem: Plantae
Altalem: Tracheobionta
Bölüm: Magnoliophyta
Sınıf: Magnoliopsida
Altsınıf: Dilleniidae
Takım: Primulales
Aile: Primulaceae
Cins: *Primula* L.

1.4. *Primula* Cinsinin Dünyadaki Yayılışı

Çalışmaya konu olan *Primula* cinsi, genel olarak kuzey yarım kürenin nemli ve ılıman bölgelerinde yayılış gösterir. Dünyada yaklaşık 430 türle temsil edilen bu cins Primulaceae familyasının en büyük cinsidir. Üyelerinin büyük bir kısmı (%52) Himalaya dağları ile Doğu Çin'de bulunmaktadır. *Primula* cinsinin gen merkezi hem tür hem seksiyon (38 seksiyondan 26'sı) çeşitliliğinin en fazla olduğu Doğu Sino-Himalaya dağlarıdır (Richard, 2003). *Primula* cinsinin Dünya üzerindeki genel yayılış haritası Şekil 1'de verilmiştir.

Primula cinsi Kafkasya bölgesinde yer alan Azerbaycan'da 5, Gürcistan'da 16, Ermenistan'da 4 (Federov, 1965), Türkiye'nin kuzeydoğusunda 11 (Lamond, 1978), İran'nın kuzey batısında 5 (Wendelbo, 1965) ve Rusya'nın güneyinde (Kuzey Kafkasya) 17 (Federov, 1965) olmak üzere 25 takson ile temsil edilmektedir. Bu taksonlardan 18 tanesi bu çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 1. *Primula* cinsinin Dünya üzerindeki genel yayılışı (Richards, 2003; Schatz, 2006; Wendelbo, 1965 verilerine göre ARGIS 9.3'de çizilmiştir).

1.5. *Primula* Cinsi Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Cins bütün dünyada süs bitkisi olarak üretilen önemli bitki kültürleri içerir (Abou-El-Enain, 2006). Tür içi çaprazlamalardan kararlı hibritler elde edilmesi bu türlerin yaygın şekilde süs bitkisi olarak kullanılmasına ve kültüre edilmesine olanak sağlamaktadır (Mizuhiro vd., 2001).

Primula cinsine ait bazı türlerin, halk ilacı ve drog olarak kullanıldığı bilinmektedir (Prajapati vd., 2003). Özellikle *P. veris* L., *P. acaulis* L. *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 kullanılmaktadır (Prajapati vd., 2003).

Türkiye endemiği olan *P. longipes* Freyn & Sint. (Primulaceae) türünden elde edilen özütlerin *Bacilovirüs*'ün replikasyonuna etkilerini araştırılmıştır (Katı, 1998). Bu çalışmada *P. longipes* özütlerinin, *Bacilovirüs*'de replikasyonu azalttığı bulunmuştur. Anadolu'da *P. veris*'in kökleri, taşıdığı saponin glikozitleri nedeniyle balgam söktürücü, idrar artırıcı ve hafif bir yatıştırıcı etkiye sahiptir. Çiçekleri terletici, yatıştırıcı ve balgam söktürücü etkilere sahiptir. Taze yaprakları çıban tedavisi için kullanılır. *P. elatior* ve *P. vulgaris* de Anadolu'da benzer etkilere sahip oldukları için kullanılmaktadır (Baytop, 1999). *P. veris*'in çiçekleri taşıdığı saponin nedeniyle hoş kokuluyken, *P. elatior* çiçeklerinde ise saponin az olduğundan dolayı çiçekleri kokusuzdur (Zeybek ve Zeybek, 1994).

Cins üzerindeki geleneksel sistematik çalışmalar daha çok heterositulus, homositulus, polen morfolojisi, temel kromozom sayısı, yaprak vernasyonu ve farinanın varlığı-yokluğu üzerine yoğunlaşmaktadır (Mast vd., 2001). *Primula* cinsinde filogenetik akrabalıkların değerlendirilmesinde bu karakterlerin varsayılan önemine rağmen, çoğu zaman taksonları ayırt etmede iyi sonuçlar ortaya koymamaktadırlar. Bu nedenle çok sayıda örnekleme yoluyla yapılan moleküler çalışmalar, taksonların filogenetik ilişkilerini açıklamada bağımsız filogenetik hipotezler sunabilir (Mast vd., 2001).

Primulaceae başta olmak üzere 28 çiçekli bitki familyasında mevcut olduğu bilinen heterositilus, evrimsel uygulamalarda ve yeniden çoğaltım çalışmalarında karmaşık bir problem olarak görülmektedir (Barrett vd., 2000). Primulaceae familyasında heterositulus ve alternatif bir sistem olan homositulus cins ve cins içi seviyelerde sistematik çalışmalarda önemli yer tutmaktadır (Richards, 2003). *Primula* cinsine ait türlerin yaklaşık

% 91'i heterositulus, % 9'u ise homositulus özellik göstermektedir. Bu karakter seksiyon seviyesinde genellikle güvenilir bir karakter olarak görülmesine rağmen (Kelso, 1991), tür seviyesinde karışıklığa sebep olmaktadır (Barrett, 1992). *P. sinensis* Sabine'de heterositulus durumunu genetik açıdan incelenmiştir. *P. sinensis*'teki bir mutasyonun; situlusun yanı sıra stigmatik papilla uzunluğunu da kısalttığı bulunmuştur (Mather, 1950). Bir çok cinste olduğu gibi *Primula* cinsinde de polen morfolojisi özellikle seksiyon seviyesinde taksonomik bir karakter olarak kullanılmaktadır. Polen dimorfizmi, farklı boyutlardaki polen tanecikleri, seksin yapısındaki varyasyon ve heterositulus durumu ile ilişkilendirilmektedir (Anderberg ve El-Ghazaly, 2000). Bu cinsin farklı türlerinde polen morfolojisi için en dikkat çekici ayrım apartürlerin sayısında ve düzenlenmesinde görülmektedir (Schou, 1983). *Primula* sect. *Carolinella*'nın polen morfolojisi üzerine yapılan bir çalışmada polenlerin trikolpat, trikolporat, trisinkolpat veya polikolpat olduğu kaydedilmiştir (Anderberg ve El-Ghazaly, 2000). Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren *Primula* cinsine ait 8 tür ve bunlara ait 7 alttürün polenleri üzerine yapılan araştırmada polen morfolojilerinin trikolporatden, triparasinkolpat-tetrakolpata doğru değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Pınar vd., 2005).

Primula cinsine ait 8 tür üzerinde yürütülen bir çalışmada temel kromozom sayısı X= 8, 9 veya 10 olarak bulunmuştur (Abou-El-Enain, 2006). *Primula* cinsine ait Türkiye'de yayılış gösteren 4 tür üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise temel kromozom sayısı X= 9 veya 11 olarak bulunmuştur (Ayaz ve İnceer, 2003).

Yaprak vernasyonu Primulaceae familyasında yapılan sistematik çalışmalar için kullanılan diğer önemli bir karakterdir. *Primula* dışındaki çoğu cinste yaprak vernasyonu değişkenlik göstermeyebilir. Buna rağmen *Primula* cinsinde revolute (yaprakların dışa doğru kıvrılması) ve involute (tomurcuk içinde yaprakların içe doğru kıvrılması) olmak üzere her iki vernasyon tipi de oluşabilir (Richards, 1993). Fakat revolute tip daha sık görülür. *Primula* cinsinin morfolojik analizlerinde kullanılan yaprak vernasyonu, brakte şekli, farinanın varlığı-yokluğu gibi morfolojik karekterler sınırlı düzeyde sistematik öneme sahiptir (Trift vd. 2002).

Yukarıda bahsedilen karekterlerin yanında anatomik karakterler de *Primula* cinsinin sistematiğinde kullanılmıştır. Coğrafik olarak Kafkasya bölgesi sınırları içerisine giren Türkiye'nin 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 cinsi taksonlarında kök yapısında endoderma çeper kalınlaşmalarının diğer cinslerdeki taksonlara nazaran daha fazla gerçekleştiği bulunmuştur (Beyazoğlu, 1989).

Şimdiye kadar klasik yöntemlerle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar *Primula* cinsin sistematik problemlerini çözmede önemli katkılar sağlamasına rağmen cinsin temel filogenetik yapısını ortaya çıkartmak için nrDNA üzerinde gerçekleştirilen ITS- PCR çalışmalarının çok kullanışlı olduğu Conti vd. (2000)'nin yaptığı çalışmada belirtilmiştir. Uzuner (2006), Kuzey Anadolu doğal *Primula* taksonlarının nrDNA ITS bölgeleri bakımından incelemiş ve morfolojik özellikleri arasındaki ilişkileri ortaya koymuştur. Benzer şekilde Gültepe vd. (2010), Türkiye'deki *Primula* cinsine ait tüm taksonların nrDNA ITS polimorfizmini incelemiş ve sistematik bakımdan tür düzeyinde ayırt edici olduğu sonucuna varmıştır. Zhang ve Kadereit (2004), *Primula* sect. *Auricula*'yı ITS ve AFLP'ye göre sınıflandırmıştır. Martins vd. (2003), Primulaceae s.l.'nın ITS'e dayalı olarak filogenetik analizini çalışmıştır.

1.6. Filogenetik Sistematik

Sistematik, çeşitli bilim dallarından sağlanan verilerle organizmaları sınıflandıran ve aralarındaki akrabalık ilişkilerini belirlemeye çalışan bir bilim dalıdır. Geçmişten günümüze kadar bilim adamları birçok sınıflandırma yöntemleri üzerinde durmuşlardır. Geleneksel sınıflandırma renk, şekil, boy gibi kolay gözlenebilir karakterlere dayanmaktadır. Doğal sınıflandırma, tüm morfolojik benzerlikleri esas alır. Fenetik sınıflandırma, taksonların sahip oldukları karakterlere eşit ağırlık vererek aralarındaki benzerliği esas alır.

Bitki sistematiği, değişen ve gelişen tekniklerle son yıllarda farklı bir boyut kazanmıştır. Önceden genel morfolojik karakterlere göre yapılan sınıflandırma günümüzde disiplinler arası çalışmalarla daha güçlü karakterler üzerinden yürütülmektedir. Geçmişte, var olan bitkileri kendi aralarında basitçe sınıflandırmak olan amaç; günümüzde bitkilerin filogenisini veya evrimsel tarihini gözler önüne sermek haline dönüşmüştür. Buna bağlı olarak günümüzde bitki sistematiği alanındaki disiplinler arası çalışmaların en dikkat çekicisi olan ve popülaritesi gittikçe artan moleküler sistematiktir. Moleküler yöntemler kullanılarak bitkilerin filogenetik yapısı hakkında birçok hipotez öne sürülmüştür. Bu çeşit filogenetik hipotezler yeni çalışmalara sıkça konu olmaktadır. Şu ana kadar yapılan filogenetik analizler birçok geleneksel görüşü destekleyici bilgiler sunmakla birlikte bitki

evolosyonu hakkında anlayışımızı temelden etkileyecek şaşırtıcı bilgiler de ortaya koymuştur (Judd vd., 2008).

Sınıflandırma bitkiler hakkındaki bilgileri organize ederek onları teşhis etmek için fonksiyonel anahtarlar üretir. Bir sınıflandırma inşa etmenin birçok yolu vardır. Örneğin bitkiler tıbbi kullanım amacına göre veya tercih ettiği habitatına göre (ekolojik sınıflandırma) sınıflandırılabilir. Filogenetik tabanlı sınıflandırma ise canlıların akrabalık (evolosyenel) ilişkilerini temel alarak onları düzenlemeye çalışır. Bu tarz bir sınıflandırmayı oluşturmak için iki temel basamak vardır. Bunlardan birincisi filogenetik veya evrimsel tarihi belirlemektir. İkincisi ise sınıflandırmayı bu evrimsel tarih üzerine oturtmaktır (Judd vd., 2008).

1.7. Bitki Sistematiğinde Kullanılan Karakterler

Bitkileri güvenilir şekilde sınıflandırmak ve geçmişleri hakkında mantıklı filogenetik hipotezler ortaya koymak amacıyla çeşitli karakterler kullanılmaktadır. Bu karakterler bitkilere bağlı çok farklı kaynaklardan ve değişik gelişim aşamalarından toplanabilir. Bu veriler genel olarak yapısal, biyokimyasal (fitokimyasal) ve moleküler karakterler olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir.

1.7.1. Yapısal Karakterler

Yapısal karakterler, morfolojik, anatomik, sitolojik, embriyolojik ve palinolojik karakterler olmak üzere beş grupta incelenebilir.

Morfolojik karakterler; bitkinin dış görünüşüyle ilgili (fenotipik) özelliklerdir. Bu karakterler bitkileri basitçe sınıflandırmak amacıyla kullanılan ilk özelliklerdir. Kök, gövde, yaprak, meyve, çiçek ve tohum özellikleri Angiospermae bitkilerinde morfolojik karakterleri oluştururlar. Morfolojik karakterleri gözlemlemek kolaydır. Fakat çevresel faktörlerden etkilenirler. Bu durum sistematikte morfolojik karakterlerin güvenirliğini azaltır ve yardımcı karakterlere ihtiyaç duyulur.

Anatomik karakterler; bitkilerin içyapısını (internal) kullanarak sınıflandırma yapmayı amaçlar. Bu karakterler ışık mikroskobuyla (IM), transmisyon elektron mikroskobuyla (TEM) veya taramalı elektron mikroskobuyla (SEM) incelenebilir. TEM ile incelenen karakterler ince yapısal karakterler olarak adlandırılırken SEM ile incelenenler

mikromorfolojik karakterler olarak adlandırılır. Sistematikte kullanılan başlıca anatomik karakterler;

- ✓ Sekonder ksilem ve floemin özellikleri,
- ✓ Nod anatomisi,
- ✓ Yaprak anatomisi,
- ✓ Salgı yapıları,
- ✓ Kristaller,
- ✓ Ksilem ve floemin gövdedeki dizilimi,
- ✓ Yaprak anatomisi ve gelişimi olarak sınıflandırılabilir.

Sitolojik karakterler; kromozomlardaki birçok özellik sistematik olarak öneme sahiptir. Bunlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

✓ Kromozom sayısı; bu karakter tek başına sistematikte güçlü bir karakter olarak kullanılmaktadır. Ancak kromozom sayısı aynı olan farklı türler ve kromozom sayısı farklı olan (poliploidi) aynı türler mevcuttur. Bununla beraber benzer kromozom sayıları yakın akrabalık ilişkilerini farklı kromozom sayılıları ise bazı üreme izolasyonlarını gösterir. (Levan vd., 1964).

✓ Kromozom morfolojisi; sentromerin kromozomun üzerindeki yerleşimine göre kromozom kolları farklı büyüklülerde olabilir. Sistematik öneme sahip olabilen bu iki karakter canlının karyotipi olarak adlandırılır.

✓ Özel bantlaşma durumları.

Embriyoloji; bitki embriyosu sistematik öneme sahip diğer önemli bir karakterdir. Sistematikte kullanılan embriyolojik karakterler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- ✓ Ovüller ve megagametofitlerin özellikleri,
- ✓ Embriyo ve endospermin özellikleri,
- ✓ Agamospermi durumu; Bazı bitkilerde döllenme olmadan ve haploid gametler oluşmadan embiyonun gelişmesidir.

Palinoloji; sistematik problemlerin çözümünde kullanılan diğer bir önemli özellik ise polen karakterleridir. Bu karakterle aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- ✓ Genel ornemantasyon
- ✓ Polen şekli
- ✓ Polendeki apartür sayısı ve şekli

1.7.2. Biyokimyasal Karakterler

Biyokimyasal karakterler 100 yılı aşkın bir zamandan beri bitki sistematiğinde kullanılmaktadır. Kimyasal bileşikler, bitki sistematiğinde tür içi (infraspesifik)/türler arası (interspesifik) çeşitlilik tespitinde familya ve daha yukarı taksomik grupların filogenetik ilişkilerini belirmeye kadar çok çeşitli amaçlar için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Sistematikte kullanılan iki genel kimyasal bileşik grubu vardır.

- ✓ Sekonder metabolitler; bitkilerde hayati önemi olmayan fonksiyonları yönetirler. Bunlara örnek olarak alkaloidler, terpenoidler, yağ asitleri ve flavonoidler verilebilir.
- ✓ Proteinler; aminositlerin peptit bağlarıyla bağlanması sonucu meydana gelen bir moleküldür (Judd vd., 2008). Bu amaçla türlerin özellikle izoenzim profilleri sistematikte sıklıkla kullanılmaktadır.

Biyokimyasal karakterler, morfolojik karakterlere göre çok daha etkili kullanılabilmekle birlikte, çevre koşulları, hastalık vb. faktörlerden etkilenmeleri, ayrıca kullanılan doku ve mevsimsel değişimlere göre farklılık göstermeleri ve sayıca azlığı bu karakterlerin dezavantajları olarak kabul edilmektedir (Meredith, 1992; Thomas vd., 1993).

1.7.3. Moleküler Karakterler

Son yıllarda nükleik asitlerden elde edilen bilgiler doğrultusunda sistematik problemlerin çözümlenmesi, türler arası ilişkilerin ve sistematik yapının yeniden ortaya konması çalışmaları hız kazanmıştır. Bu yolla elde edilen bilgiler sistematikte kullanılan diğer karakterleri desteklemek ve yeni filogenetik hipotezler oluşturmak amacıyla da kullanılmaktadır. Eğer birçok takson karşılaştırılmak isteniyorsa moleküler teknikleri kullanarak filogenetik hipotezler oluşturmak hızlı ve kolay olur (Judd vd., 2008). Günümüzde bu tekniklerin daha kolay şekilde uygulanmasına yardımcı olan en önemli gelişmeler baz sırası okuma ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniklerinin keşfi olmuştur.

Moleküler sistematik çalışmalarının çoğu başlangıçta restriksiyon bölge analizlerine dayanmaktaydı (Judd vd., 2008). Bu analizler ile bitkilerin gen haritaları çıkarılır. Fakat bu çalışmalar çok zamana ve emeğe gereksinim duyar (Judd vd., 2008). Bu zorluklarından dolayı bu yöntem günümüzde eskisi kadar sık kullanılmamaktadır (Judd vd., 2008). Moleküler sistematikte kullanılan farklı yöntemler arasında DNA baz sırasının okunması

özellikle cins üstü gruplarda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Hilu ve Liang, 1997). Bu teknik, diğer yöntemlere göre nispeten daha hızlı, kolay uygulanabildiği ve bağımsız karakterler sunduğu için filogenetik çalışmalarda yaygın bir araç haline gelmiştir (Johnson ve Soltis, 1994). Takson temsiliyetinden ödün vermeksizin filogenetik yapının inşasında yeterli veri sunan genomik bilgiler, filogenetik ilişkilerin doğru bir şeklide değerlendirilmesinde vazgeçilmezdirler (Hilu vd., 2003). Baz sırası bilgileri bir bütündür, bilgilendirici bölgelerin potansiyel boyutları büyüktür ve bilgisayar ağları aracılığıyla rahatça erişilebilir (Hilu ve Liang, 1997).

Çoğu poliploid ve heterostilus özelliğe sahip doğal ve hibrid taksonların filogenetiğinin açıklanmasında nüklear DNA (nrDNA) üzerinde bulunan ETS (External Trascribed Spacer), ITS (Internal Transcribed Spacers) (Baldwin ve Markos, 1999) ve IGS (Intergenic Spacers) (Taberlet vd., 1991) gibi moleküler bölgelerden elde edilen bilgilerin çok önemli olduğu bulunmuştur. Kloroplast DNA (cpDNA)'sı üzerinde yer alan genler ve bölgeler de filogenetik ilişkilerin açıklanmasında kullanılmaktadır (Taberlet vd., 1991; Johnson ve Soltis, 1994).

1.7.3.1. Kloroplast DNA (cpDNA)'sı

Yüksek oranda korunmuş sitoplazmik bir molekül olan cpDNA'sı klonal (rekombinasyon olmadan) olarak kalıtılmakta, poliploid kompleksler içerisindeki poliploid taksonları filogenetik ilişkileri ve poliploid soyların dökümanını sağlayan kuvvetli bir araç olduğunu göstermektedir. Ek olarak çoğu Angiospermae bitkilerinde maternal olarak kalıtılması ağırlıklı olarak agamik poliploid kompleksler arasındaki genetik ilişkiyi açıklamada bilgilendirici bir markır olarak kullanılabilmektedir (Erickson vd., 1983; Song ve Osborn, 1992; Gauthier vd, 1998; Segraves vd., 1999).

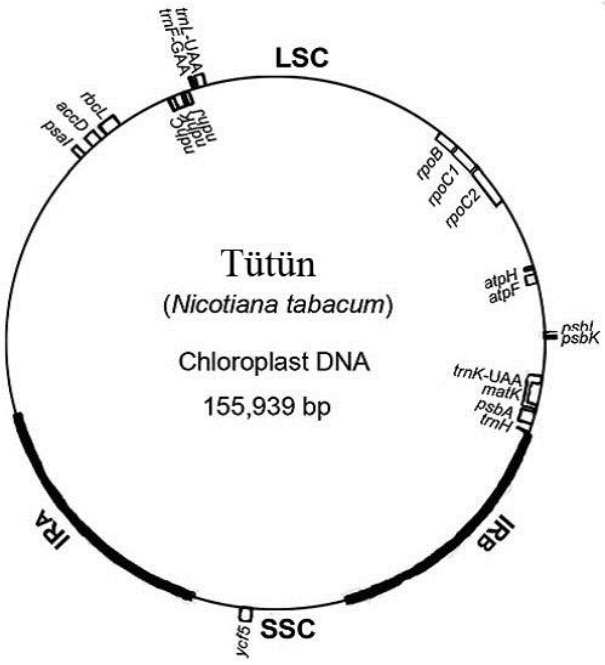
Kloroplast DNA sekans varyasyonu, bitkiler arasında bütün taksonomik seviyelerde filogenetik ilişkilerin yorumlanmasında mevcut ençok kullanılan araçlardandır. Genellikle, kodlanmayan bölgeler, kodlanan bölgelerden daha hızlı bir şekilde evrimleşmekte ve son zamanlarda yakın akraba taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin çalışılmasında uygulanmaktadırlar (Widmer, 1999).

Moleküler verilerin sık olarak bahsedilen avantajlarından biri de filogentik yapının ortaya konmasında sınırsız karakter sağlamasıdır (Randall, 1998). DNA sekans verilerinin üretilme kolaylığı son zamanlarda moleküler filogenetik analizlerin artmasına neden

olmuştur (Doyle, 1998). cpDNA bölgeleri (*trn*T-L ve *trn*L-F bölgeleri, *trn*L intronu) familyalar ve cinsler arası seviyelerde filogeni çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Taberlet ve ark., 1991). Filogenetik çalışmalar bitkilerde özellikle cpDNA'sının *rbc*L, *mat*K, *ndh*F gibi genlerin yoğun olarak analizlerine yönelmiştir (Olmstead ve Palmer, 1994). Filogenetik ilişkileri açıklamada kullanılan önemli bir moleküler markır olan *mat*K genine dayanarak Angiospermae bitkilerin filogenisi yeniden ortaya konulmuştur (Hilu vd. 2003).

1.7.4. *mat*K Geni

Eskiden *orf*K olarak bilinen *mat*K geni ilk olarak Sugita vd. (1985) tarafından tütün kloroplastı genomu çalışılırken keşfedilmiştir. *mat*K geni, kloroplast *trn*K geninin 3' ve 5' ekzonları arasında ve grup II intronu içerisine yerleşmiştir (Hilu ve Liang, 1997). Grup II intronlarından olan *trn*K geni intronun uzunluğu yaklaşık 2600 baz çiftidir (bp) ve bunun yaklaşık 1500 bp'lik bir kısmını *mat*K geni oluşturur (Johnson ve Soltis, 1994). Genin kloroplast genomu üzerindeki şematik yerleşimi Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. *mat*K geninin kloroplast DNA'sı üzerindeki yerleşimi (Vijayan ve Tsoa, 2010).

Çoğu bitki kloroplastında, *trn*K intronları arasında görülen bu yerleşim parazit bir bitki olan *Epifagus virginiana* (L.) W.P.C.Barton'da bir istisna gösterir. *E. virginiana'*da *mat*K geni *trn*K intronlarından bağımsız bir halde bulunur. Ayrıca *mat*K geninin baz sayısı bu bitkide 5' uçtaki delesyonlardan dolayı 1320 bp'e kadar inmiştir (Wolfe vd., 1992).

Bitki sistematiğinde filogenetik hipotezler oluşturmak için *mat*K geni yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun temel olarak önemli 5 sebebi vardır:

✓ Bu gen bitkilerde bolca bulunan kloroplast genomunda yer aldığı için çalışılması kolaydır.

✓ Yaklaşık 1500 bp uzunluğuyla moleküler çalışmalar için makul bir büyüklüğe sahiptir.

✓ Transversiyon/transisyon (pürinin pürine veya primidinin primidine dönüşmesi/pürinin primidine veya pirimidinin pürine dönüşmesi) oranının yüksek olması *mat*K genine yüksek filogenetik analiz özellik sağlar.

✓ Yüksek baz yer değiştirme (substitution) oranına sahiptir. Bu durum *mat*K genine dayanarak yapılan karşılaştırmalarda taksonlar arasında daha net ayrım vermesini sağlar.

✓ *mat*K geninin, kodlanan *trn*K ekzonlarının arasında yerleşmesi çoğaltılmasını kolaylaştırır.

1.7.4.1. *mat*K Geninin Sistematikte Kullanımı

Bitki sistematiğinde *mat*K geni son yıllarda çok önemli olarak görülmektedir. Çünkü bu alanda kullanılan diğer genlere kıyasla yüksek filogenetik bilgiler içerir (Muller vd., 2006). Hızla değişen *mat*K geni taksonların evrimsel geçmişini gözler önüne sermek için etkili bir bölgedir (Hilu vd., 2003). Angiospermae bitkilerden elde edilen *mat*K, *rbcL* ve *trnT-F* genlerine ait dizin verilerinin filogenetik analizi, *mat*K geninin daha fazla parsimonik (bilgilendirici) karakter sağladığı ve filogenetik ilişkilerin yeniden inşasında daha önemli olduğunu göstermiştir (Muller et al., 2006). *mat*K geninden elde edilen moleküler bilgiler en üst taksonomik düzeylerden en alt taksonomik düzeylere kadar filogenetik akrabalık sorunlarını çözmek için kullanılabilir (Johnson ve Soltis, 1994).

*mat*K geni bitki sistematiğinde kullanılan plastit genleri arasında ayrım gücü ve farklılaşma hızından dolayı göze çarpmaktadır. *mat*K genindeki değişim oranı *rbcL*'den nükleotit düzeyinde üç kat, aminoasit düzeyinde ise altı kat daha fazladır (Johnson ve

Soltis, 1994). Bu yüzden Hilu vd. (2003) *mat*K'dan "hızlı farklılaşan bir gen" olarak bahsetmiştir.

*mat*K geninin 3' ucu, 5' ucuna göre daha iyi korunmuştur. Bu yüzden 5' ucun, 3' uca göre daha fazla filogenetik bilgi içerdiği bulunmuştur (Hilu ve Liang, 1997). Saxifragaceae familyası üzerinde yapılan moleküler bir çalışmada, *mat*K genin 3' ucundaki 754 bp'lik parçanın % 40'lık baz varyasyonu ve % 15,6 potansiyel bilgi verici olduğu bulunmuştur (Johnson ve Soltis, 1994). Hilu vd. (2003) *mat*K geni baz sırasına dayanarak Joinvilleaceae ile Poaceae'nin kardeş familya olduğunu ileri sürmüştür. Jianhua vd. (1999), *mat*K geni baz sırasından elde ettikleri bilgileri kullanarak Hamamelidaceae familyasında filogenetik akrabalığı incelemiştir.

1.7.4.2. *mat*K Genin Çoğaltılması (Amplifikasyonu) İçin Kullanılan Primerler

*mat*K genini PCR uygulamalarında çoğaltmak için çok farklı primerler dizayn edilmiştir. Bunlardan bazıları Tablo 1'de verilmiştir. Bu primerlerin çoğu korunmuşluk düzeyi *mat*K genine göre yüksek olan *trn*K kodlama bölgeleri (Johnson ve Soltis, 1994) dikkate alınarak dizayn edilmiştir. Bazı primerler ise *mat*K bölgesinin içerisinden dizayn edilmiştir. Fakat bu primerler genelde evrensel olmayıp sadece dizayn edildiği cinse özgüdür. Bu durumun sebebi *mat*K geninde transversiyon/transisyon oranın yüksek ve delesyonların veya insersiyonların *trn*K kodlama bölgesinden fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Hilu vd. 2003).

Tablo 1. *mat*K genini çoğaltmak için kullanılan bazı evrensel primerler.

Primer	Baz Sırası
ACmatK100F	CTCGACTGTATCAACAGAATC
ALImatK470F	CCCTATCCCATTCATCTCG
GNmatK1056R	TCCCTGGTAATGAACTCTGC
MATKFA490F	GAAATCTTGGTTCAAAYCCTTCG
PI-matK-1060F	ACTTRTGGTCTCAAC
trnK1280R	ATAAAAGCAAACCCCTCTG
trnK2R	AACTAGTCGGATGGAGTAG

1.8. DNA İzolasyonu

Moleküler bitki sistematiği çalışmalarında ilk adım kullanılacak taksonların DNA'sını başarılı bir şekilde izole etmektir. DNA izolasyonu tohumdan, yaş yapraklardan, silika jelde kurutulmuş yapraklardan, herbaryumda muhafaza edilmiş yapraklardan veya mumyalanmış yapraklardan yapılabilir. Rogers ve Bendich (1994)'in bildirdiğine göre bitkilerden başarılı bir şekilde DNA izolasyonu için aşağıdaki koşulların gerçekleşmesi gerekmektedir.

✓ Hücre duvarı parçalanarak hücresel organellerin açığa çıkması gerekmektedir. Bu işlem genellikle bitki dokusunun sıvı azot, kuru buz ya da sıcak ekstraksiyon solüsyonu içerisinde öğütülmesi ile gerçekleştirilir.

✓ DNA'nın ekstraksiyon solüsyonu içerisinde serbest kalması için hücre membranının parçalanması gerekmektedir. Bu işlem için genelde CTAB (Hexadecyl Tri Metil Amonyum Bromide) ya da SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) gibi deterjanlar kullanılmaktadır.

✓ DNA nükleazlardan korunmalıdır. Bu amaçla EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) kullanılmaktadır. EDTA pek çok nükleaz için kofaktör olarak gerekli olan Mg^{+2} iyonlarına bağlanarak onları şelatlar. İlave olarak tampon/doku karışımına kloroform ve/veya fenol karışımı eklenerek DNA'dan proteinlerin ayrılması sağlanır.

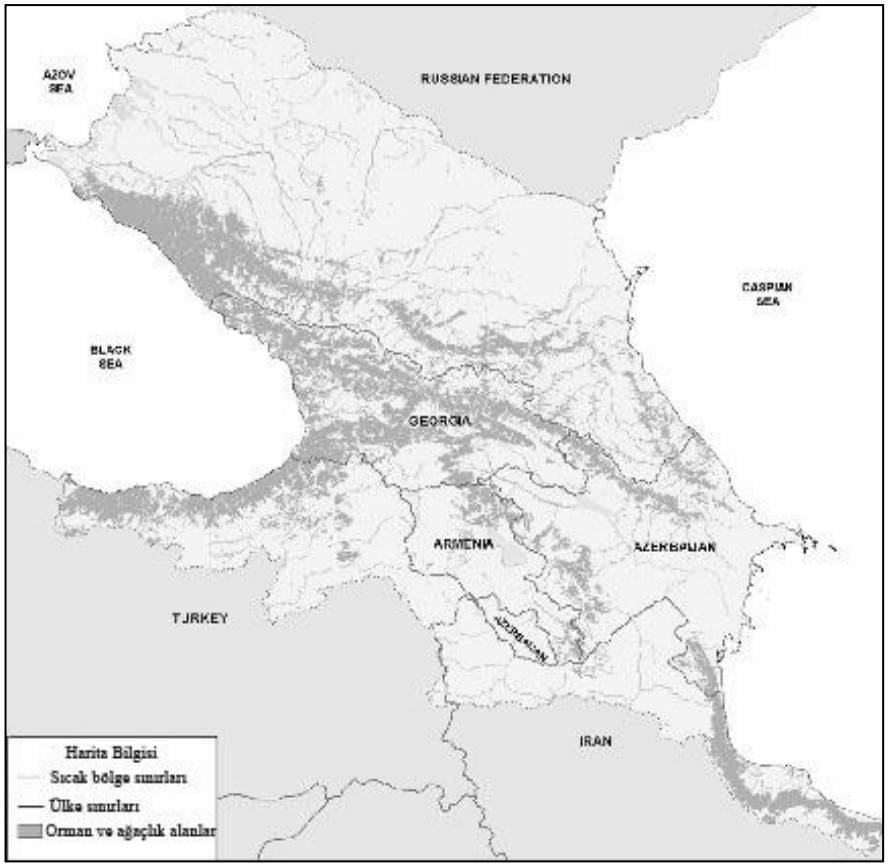
✓ Solüsyon içerisindeki DNA'nın kırılmamasına özen gösterilmelidir. İyi şekilde izole edilmiş DNA'nın uzunluğu 50-150 kb arasında olmalıdır.

✓ Dondurulmuş dokunun öğütülmesi ve ekstraksiyon solüsyonu ile muamelesi arasındaki süre DNA'nın nükleotik parçalanmasını engellemek amacıyla en aza indirilmelidir.

1.9. Kafkasya Bölgesinin Genel Özellikleri

Çalışma alanı olarak belirlenen Kafkasya, Karadeniz ve Hazar Denizi arasındaki bölgeyi kapsayan 580,000 km^2'lik geniş bir alandır. Kafkas Dağları, Kuzey ve Güney Kafkaslar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kuzeyde kalan sıra dağlara Büyük Kafkas Dağları, Güney Kafkas Dağlarına ise Küçük Kafkas Dağları denir (URL-1). Büyük Kafkasya, kuzeyinde Terek ve Manye nehirleri, güneyinde Rioni ve Kura nehirleri arasındaki bölgedir (Shetekauri ve Jacoby, 2009). Bu bölge Azerbaycan'ın tamamı ile İran

ve Rusya'nın belli bir kısmını içine alır. Küçük Kafkasya ise Gürcistan ve Ermenistan'ın tamamı ile Türkiye'nin belli bir kısmını içine alır (Şekil 3). Kafkasya yükseltisi yer yer 5000 m üzerine çıkan yüksek dağ habitatlarını, ormanları, stepleri ve yarı çölleri barındıran zengin flora ve çeşitli vejetasyonlarıyla bitki sistematikçilerinin ve bitki ekologlarının dikkatini çeken bir bölgedir (Williams, 2004; Onipchenko, 2004). Bölgede yaklaşık 6500 vasküler bitki türü bulunmaktadır ve bunların dörtte biri endemiktir (Williams, 2004).



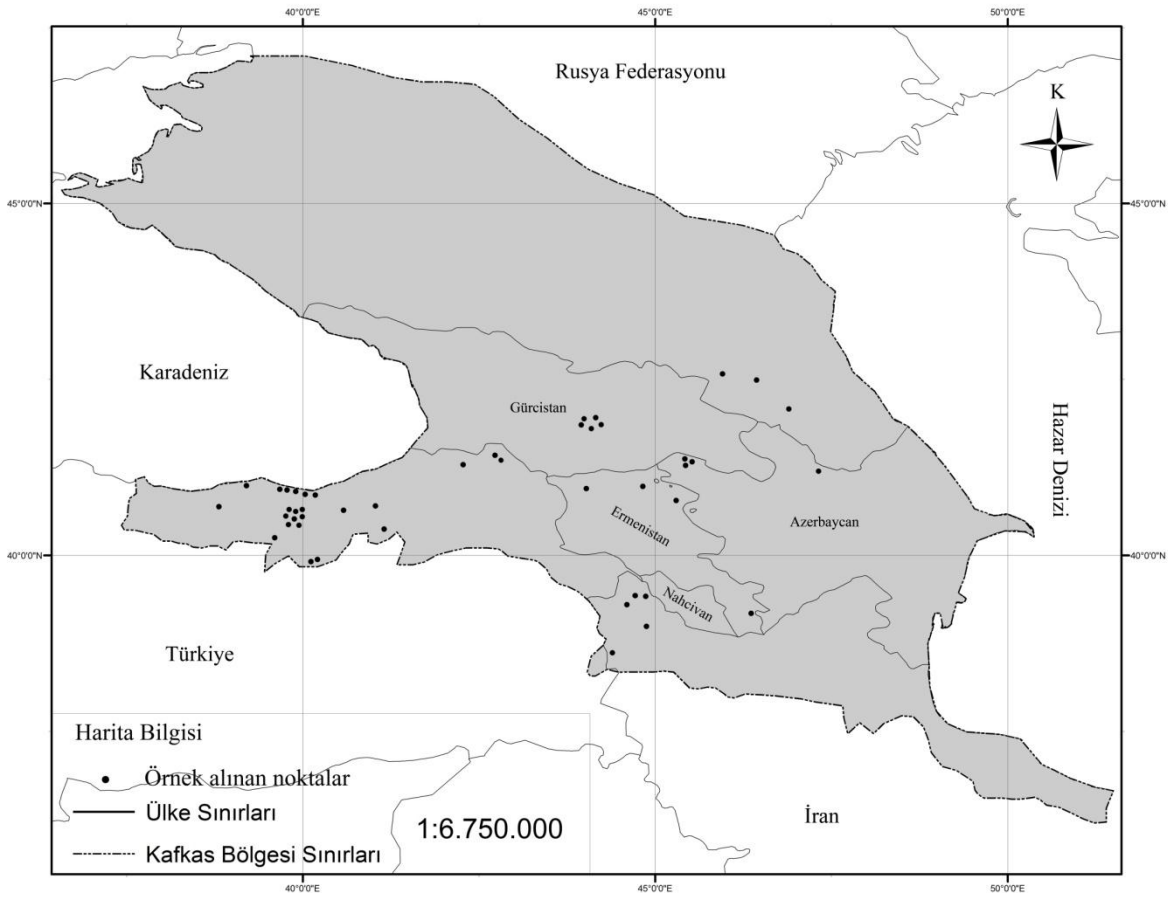
Şekil 3. Kafkasya Bölgesi (Schatz, 2006).

Kafkasya bölgesi aynı zamanda önemli bitki göç yollarının üzerinde bulunmaktadır. Bölge nehirler ve göllerle ayrılan ve üç dağ zincirinden oluşan eşsiz bir yüzey şekline sahiptir. İklim şartları yer yer büyük farklılık gösterir. Güneybatı Kafkasya'da yıllık yağış miktarı 4,000 mm'den fazlayken Kuzeybatı Kafkasya'da 200 mm'den azdır (Williams, 2004). Bölgede görülen biyolojik çeşitliliğin yüksek olması farklı ekosistemleri barındırması, farklı iklim şartlarının hakim olması ve biyolojik geçiş bölgeleri üzerinde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle bu bölge biyolojik çeşitlilik açısından dünyanın sayılı sıcak noktalarından biri olarak kabul edilmektedir (Schatz, 2006).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal Temini ve Saklanması

Çalışmada kullanılan bitki materyallerinin bir kısmı değişik projeler kapsamında Gürcistan ve Türkiye'de yapılan arazi çalışmalarında bir kısmı ise ilgili bölgelerde çalışan farklı bilim adamlarının özel koleksiyonlarından veya herbaryumlarından temin edilmiştir. Toplanan veya temin edilen materyaller öncelikle kayıt altına alınarak numaralandırılmıştır. Araştırmada kullanılan tüm bitki materyallerinin toplama bilgileri Tablo 2'de ve araştırma bölgesindeki dağılışları Şekil 4'de verilmiştir. Tablo 2'de listelenen bu örneklerden DNA izolasyonunda kullanılmak üzere sağlıklı yapraklar seçilerek silikajel içerisine alınmış ve derin dondurucuda (-20 ^{o}C) saklanmıştır.



Şekil 4. Çalışılan taksonların Kafkasya Bölgesindeki dağılışı.

Tablo 2. Çalışılan taksonların toplama bilgileri ve taksonomik düzeyleri.

	Takson (Örnek No)	**Altcins/ Seksiyon/ Seri (Federov, 1965)**	**Altcins/ Seksiyon/ Altseksiyon (Richards, 2003)**	**Genel Dağılışı ve Fitocoğrafi k Durumu**	**Ülke**	**Toplama Bilgileri**
1.	*P. acaulis* (L.) L. subsp. *acaulis* (P96, P94)	*Primulastrum/* *Euprimula/* *Acaules*	*Primula/* *Primula*	Avrupa-Sibirya Elementi	Türkiye	A8 Trabzon: Dolaylı köyü, fındık bahçesi altı, 700 m, 04 iv 2010, P96, KTUB
2.						A8 Trabzon: Değirmendere vadisi, fındık bahçesi altı, 650 m, 30 iv 2010, P94, KTUB
3.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (Sm.) Greuter & Burdet (P13, P86, P87)			Kuzey Yunanistan, Bulgaristan, Transkafkasya Öksin Elementi		A7 Trabzon: Beşikdüzü, Yeni Camii Köyü, 01 v 2005, 970 m, Uzuner P13, KTUB
4.						A7 Trabzon: Çaykara, Uzungöl, 1300 m, 18 iv 2010, P86, KTUB
5.						A7 Trabzon: Çaykara, Uzungöl, 1200 m, 18 iv 2010, P87, KTUB
6.	*P. algida* Adams (P23, P90, P63, P41)	*Primulastrum/* *Aleuritia/* *Algidae*	*Aleuritia/* *Aleuritia* (Duby) Wendelbo/ *Algida* A.J.Richards	Kuzey İran, Kafkasya, Kuzey Irak, Afganistan, Orta Asya		A9 Ardahan: Posof, Gönülaçan, 2130 m, 09 vi 2005, Uzuner P23, KTUB
7.						A7 Trabzon: Çaykara, Şekersu Yaylası, 2100 m, 08 vii 2010, P90, KTUB
8.					Azerbaycan	Gusar: Leze köyü, Suvaz tepesi, Kafkasya, kuzeybatı alpin, 14 vi 2009, V.N. Kerimov
9.					Gürcistan	Tiflis: Bakuriani, Tskhratskaro, 2450 m, 06 vi 2006, P41, KTUB
10.	*P. auriculata* Lam. (P20, P30, P88, P56)	*Primulastrum/* *Oreophlomis/* *Auriculiferae*	*Aleuritia/* *Oreophlomis* (Ruprecht) Federov	İran, Kafkasya, Kuzey Irak, Afganistan, Türkistan İran-Turan Elementi	Türkiye	A7 Gümüşhane: Kadırga Yaylası, 2150 m, 13 vi 2005, Uzuner P20, KTUB
11.						A8 Erzurum: İspir, Moryayla, 2450 m, 21 x 2005, Uzuner P30, KTUB
12.						B7 Erzincan: Ahmediye, Ahmediye bakım istasyonu yanı, yol kenarı, 2102 m, 14 v 2010, Coşkunçelebi 748, KTUB
13.					İran	Hashtrod (Karaağaç): Khadem Kandy, 2550 m

Tablo 2'nin devamı

	Takson (Örnek No)	**Altcins/ Seksiyon/ Seri (Federov, 1965)**	**Altcins/ Seksiyon/ Altseksiyon (Richards, 2003)**	**Genel Dağılışı ve Fitocoğrafik Durumu**	**Ülke**	**Toplama Bilgileri**
14.	*P. capitellata* Boiss. (P53, P54)		*Aleuritia /* *Aleuritia/* *Aleuritia*	İran Edemiği	İran	Urmia: Sereshi vadisi, Nary köyü, nehir kenarı, 2000 m 1973, Siami 5897
15.						Urmia: Suluk vadisi, 2500 m, 1973, Siami 7373
16.	*P. elatior* (L.) Hill subsp. *elatior* (P48)	*Primulastrum/* *Euprimula/* *Amoena*	*Primula/* *Primula*	Avrupa-Sibirya Elementi		Garavan: Meshkinshar-Ahar arası, 1700m,1973, Siami & Ashkriz 5899
17.	*P. elatior* (L.) Hill subsp. *amoena* (M. Bieb.) Greuter & Burdet (P71, P29, P26, P100)			Kafkasya Öksin Elementi	Ermenistan	Lori: Tumanyan bölgesi, Lalvar dağları, doğu yamaçlar, 2200-2500 m, 08 vi 1984, V. Manakyan. ERE 129444
18.					Türkiye	A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 2850 m,24 vii 2005, Uzuner P26, KTUB
19.						A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 2920 m, 28 v 2005, Uzuner P29, KTUB
20.						A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 2920 m, 28 v 2008, Coşkunçelebi 745, KTUB
21.	*P. elatior* (L.) Hill subsp. *pallasii* (Lehm.) W. W. Sm. Et Forrest (P99)	*Primulastrum/* *Euprimula/* *Elatiores*		Orta Rusya'dan Orta Asya'ya, Transkafkasya Avrupa-Sibirya Elementi		7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 2920 m, 28 v 2008, Coşkunçelebi 746, KTUB
22.	*P. elatior* (L.) Hill subsp. *pseudoelatior* (Kusn.) W.W.Sm. & Forrest (P92, P40)			Kafkasya, Gürcistan Öksin Elementi		A7 Giresun: Dereli, Çayırlık alan, 1650 m, 20 v 2008, P92, KTUB
23.					Gürcistan	Tiflis: Bakuriani , Tskhratskaro, 2376 m, 07 vi 2006, P40, KTUB

Tablo 2'nin devamı

	Takson (Örnek No)	**Altcins/ Seksiyon/ Seri (Federov, 1965)**	**Altcins/ Seksiyon/ Altseksiyon (Richards, 2003)**	**Genel Dağılışı ve Fitocoğrafik Durumu**	**Ülke**	**Toplama Bilgileri**
24.	*P. farinifolia* Rupr. (P98)	*Primulastrum/ Aleuritia/ Frondosae*	*Aleuritia/ Aleuritia/ Algida*	Kafkas Endemiği (Gürcistan, Rusya)	Dağıstan	Tsumada Bölgesi: Agvali köyü yakınları, ıslak kayalar üzeri, 1100 m, 17 viii 2010, R. Murtazaliev.
25.	*P. juliae* (P65)	*Primulastrum/ Julia*	*Primula/ Primula*	Kafkas Endemiği (Rusya)	Dağıstan	Rutul Bölgesi, Kina köyü yakınları, batı kayaları üzeri, 1700 m, 24 vii 2008, Z. Guseinova.
26.	*P. komarovii* Losink. (P69)	*Primulastrum/ Euprimula/ Acaules*		Kafkas Endemiği	Ermenistan	Syunik: Kapan Bölgesi, Kapan şehri ile Chakaten köyü arasında, yol boyunca ormanlık alanlar, 1300 m, 30 iii 2006, Maier, ERE 171452
27.	*P. longipes* Freyn & Sint. (P25, P27)	*Primulastrum/ Crystallophlomis/ Nivales*	*Aleuritia/ Crystallophlomis* (Rupr.) Federov/ *Crystallophlomis*	Türkiye Endemiği	Türkiye	A8 Rize: İkizdere, Ovit Dağı, 2850 m,24 vii 2005, Uzuner P25, KTUB
28.						A7 Trabzon: Çaykara, Demirkapı Köyü, 3067 m, 28 v 2005, Uzuner P27, KTUB
29.	*P. megaseifolia* Boiss. & Bal. (P7, P6)	*Primulastrum/ Cortusiformes/ Carolinella*	*Primula/ Primula*	Kafkas Endemiği (Gürcitan, Türkiye)		A8 Trabzon: Araklı, Sularbaşı köyü, 1120 m, 14 iv 2005, Uzuner P7, KTUB
30.						A8 Trabzon: Beşikdüzü, Şahmelik köyü, Kızılağaç orman altı, 450 m, 10 iv 2005, Uzuner P6, KTUB
31.	*P. ruprechtii* Kusn. (P61, P97, P42)	*Primulastrum/ Euprimula/ Elatiores*		Kafkasya.	Azerbaycan	Gusar: Leze köyü, Suvaz tepesi yanı, Kafkasya, alpin, 15 v 2004, V.N. Kerimov
32.					Dağıstan	Tsumada Bölgesi: Bogos dağı, alpin, 2800 m, 19 viii2010, R. Murtazaliev.
33.					Gürcistan	Tiflis: Bakuriani , Tskhratskaro, 2450 m, 05 vi 2006, P42, KTUB

Tablo 2'nin devamı

	Takson (Örnek No)	Altcins/ Seksiyon/ Seri (Federov, 1965)	Altcins/ Seksiyon/ Altseksiyon (Richards, 2003)	Genel Dağılışı ve Fitocoğrafik Durumu	Ülke	Toplama Bilgileri
34.	*P. veris* subsp. *columnae* (Ten.) Lüdi (P38, P18, P34, P36, P43	*Primulastrum/ Euprimula/ Veres*	*Primula/ Primula*	Güney Avrupa Avrupa-Sibirya Elementi	Türkiye	A8 Trabzon: Maçka, Sümela Manastırı, 1900 m, 20 v 2006, P38, KTUB
35.						A7 Trabzon: Çaykara, Ablaryas Platosu, 2052 m, 01 vi 2005, Uzuner P18, KTUB
36.						A9 Ardahan: Bağdeşen-Bülbül Hanları arası, step, 2440 m, 19 v 2006
37.						A9 Artvin: Şavşat, Yavuzköy, Yapraklı orman, 2180 m, 13 v 2006, P36, KTUB
38.					Gürcistan	Tiflis: Bacürani, Tskhratskaro, 2200 m, 06 vi 2006, P43, KTUB
39.	*P. veris* L. subsp. *macrocalyx* (Bunge) Lüdi (P89, P62, P57)			Güney Rusya, Crimea, Kafkasya, Kuzey İran, Orta Asya Avrupa-Sibirya Elementi	Türkiye	B7 Erzincan: Ahmediye, Ahmediye bakım istasyonu yanı, yol kenarı, 2102 m, 14 v 2010, Coşkunçelebi 747, KTUB
40.					Azerbaycan	Gusar: Leze köyüne giderken, yol kenarı, Kafkasya, alpin, 15 v 2004, V.N. Kerimov
41.					İran	Tebriz: Mianeh, Bozgosh,
42.	*P. woronowii* Losink. (P70, P60)	*Primulastrum/ Euprimula/ Acaules*		Kafkas Endemiği	Ermenistan	Syunik: Kapan Bölgesi, Kapan şehri ile Chakaten köyü arasında, yol boyunca ormanlık alanlar, 1300 m, 30 iii 2006, Maier, ERE 171450
43.					Azerbaycan	Şeki: Kiş köyü, Karaağaç ormanlarının altı, 24 iii 2007, V.N. Kerimov

2.2. Çalışılılan Örneklerden DNA İzolasyonu

PCR uygulamalarında kullanılan örneklerin DNA'sı, silikal jel içerisine alınan herbaryum örneklerinden ve/veya silika jelde kurutulmuş taze yaprak örneklerden izole edilmiştir. DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1987)'nin CTAB yöntemi modifiye edilerek Gültepe vd. (2010)'e göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

✓ Her bir örnek için daha önceden seçilen yapraklardan 0,025 gr tartılarak tek kullanımlık jilet yardımıyla alüminyum folyo üzerinde toz haline getirildi.

✓ Toz haline getirilmiş yaprak örnekleri bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine önceden hazırlanmış CTAB tamponundan 500 µl [20 µl EDTA, 50 µl Tris, 140 µl NaCl, 100 µl CTAB, 190 µl H_2O] eklendi.

✓ Bu haldeki ekstrakta her bir örnek için 0,02 gr PVPP (Poly Vinyl Polypyrrolidone) ve 2,5 µl β-Merkapto Etanol ilave edildi.

✓ Karışım bir pipet yardımıyla homojen hale getirildikten sonra 65°C'de 4 saat bekletildi. Bu süre içerisinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karışımın homojen halde kalması sağlandı.

✓ İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alınarak 1 dk soğumaya bırakıldı.

✓ Bütün örnekler oda sıcaklığında 10.000 - 14.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.

✓ Santrifüj edilmiş örnekler üzerine 500 µl kloroform eklendikten sonra tüpler homojen olana kadar alt üst edildi. Ardından aynı hızda 1 dk santrifüj edildi.

✓ 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 dk daha santrifüj edildi.

✓ Santrifüj ardından süpernatant kısım alınarak bir önceki aşama aynen tekrarlandı, daha sonra üst faz alınarak yeni bir ependorfa 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'lık Amonyum Asetat ilave edildi.

✓ Tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra oluşan hacmin % 54'ü kadar izopropanol ilave edildi ve süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra +4°C'de en az 4 saat bekletildi (Yapılan çalışmalarda en iyi sonuç 18-24 saat arası beklendiğinde elde edilmiştir).

✓ Yaklaşık 24 saatlik sürenin sonunda örnekler 3 dk önceki hızda (10.000 - 14.000 rpm) santrifüj edildi, süpernatant kısım atıldıktan sonra, şeffaf pellet üzerine 1 ml % 70'lik etanol ilave edildi, şeffaf pellet hareket edene kadar tüpler alt üst edildi.

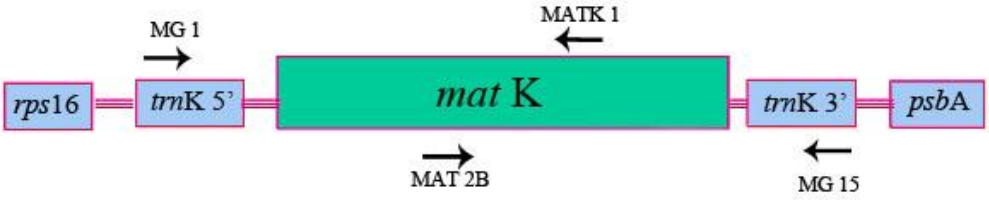
✓ Alkol ilave edilmiş tüpler 3 dk önceki hızda santrifüj edildi, süpernatant döküldükten sonra tüm alkolün uzaklaştırılması için tüpler kapakları açık şekilde 15 dk 37°C'de kurumaya bırakıldı.

✓ Daha sonra tüplerde bulunan pellet, 50-100 µl TE [10 mM Tris HCL, pH: 8,3, EDTA 1 mM, pH:8,0] çözüldü. Pelletin tamamen çözülmesi için örnekler, 15 dk 65°C'de su banyosunda tutuldu.

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

2.3. *mat*K Genin Çoğaltılması

İzole edilen DNA'lardan cpDNA'sı üzerine yerleşmiş olan *mat*K geni evrensel primerler kullanılarak Biorad Personel Thermal Cycler cihazında çoğaltılmıştır. Çoğaltmada öncelikle Liang ve Hilu (1996) tarafından dizayn edilen evrensel MG1 (5′-CTACTGCAGAACTAGTCGGATGGAGTAGAT-3′) ve MG15 (5′-ATCTGGGTTGCTAACTCAATG-3′) primerleri kullanılmıştır. Ancak özellikle çok eski herbaryum örneklerinden izole edilen DNA'lar agaroz jelde net gözlenememiştir. Bu tür örneklerde evrensel MG1 ve MG15 primerleri hiçbir şekilde çalıştırılamamıştır. Böyle durumlarda *mat*K geni için evrensel MG1 ve MG15 primerlerinden farklı olarak daha önceden elde edilen *Primula* cinsine ait baz sıraları göz önünde bulundurularak *mat*K geninin içerisinden farklı MATK1 (5′-CTTTCTCCGCAATCAATCTTC-3′) ve MAT2B (5′-TGAACGAACATAAAATGGCTTG-3′) olmak üzere iki primer daha dizayn edilmiştir. Dizayn edilen bu primerler MG1 ve MG15 primerleriyle kombine edilerek kullanılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada MG1-MG15, MG1-MATK1 ve MAT2B-MG15 olmak üzere üç ayrı primer çifti kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin *trn*K ve *mat*K geni üzerindeki şematik yerleri Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. Bu çalışmada kullanılan primerlerin şematik yerleşimi (Liang and Hilu, 1996).

PCR şartları her bir primer çiftine göre ayrı ayrı optimize edilerek *mat*K geni çoğaltılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Bu çalışmada kullanılan primerler ve en uygun PCR şartları.

Uygulanan İşlemler	**Primer**		
	MG1-MG15	**MG1-Matk1**	**Mat2b-MG15**
DNA çift zincirinin ayrılması (ön denatürasyon)	95 °C(1 dk)	95 °C (1 dk)	95 °C' (1 dk)
DNA çift zincirinin ayrılması (DNA denatürasyonu)	94 °C(1 dk)	94 °C(1 dk)	94 °C(1 dk)
Primerlerin bağlanması (annealing)	57°C	53 °C	51 °C
DNA sentezi (extension)	72 °C (1,5 dk)	72 °C (0,45 s)	72 °C (0,45s)
Döngü sayısı	35	35	35
Son uzatma (final extension)	72 °C (7 dk)	72 °C (5 dk)	72 °C (5 dk)

*mat*K geninin çoğaltılma işlemi Tablo 4'de verilen kimyasal bileşikler kullanılarak 200 µl'lik PCR tüpleri içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. *mat*K geninin PCR ile çoğaltılması için kullanılan kimyasallar.

İçerik	**Miktar (µl)**
10x Buffer	10
$MgCl_2$ (2,5 mM)	5
dNTP (0,25 mM)	20
Primer (50 ng/µl)	1+1
Taq DNA polimeraz	0,3
DNA	1
dH_2O (distile su)	11,7
Son hacim	50

2.4. Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları

DNA izolasyonu tamamlandıktan ve PCR çalışmaları sonlandıktan sonra DNA'nın ve PCR ürünün varlığı agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir. İzole edilen DNA'nın kontrolü, 7 µl izole edildiği farz edilen DNA'ya 5 µl yükleme tamponu (% 50 gliserol, % 0,05 bromofenolblue, 0,2 M EDTA) eklenerek agaroz jel ortamında yapılmıştır. PCR ürünlerinin kontrolü ise doğrudan agaroz jel ortamında gerçekleştirilmiştir.

2.5. Baz Dizin Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

PCR ürünleri Macrogen firmasına (Kore) hizmet alımı yöntemiyle okutturulmuştur. Bu okumaların ilk aşamasını PCR ürünlerin saflaştırılması oluşturmaktadır. Saflaştırmadan sonra PCR ürünleri *mat*K geninin içinden dizayn edilen MATK1 ve MAT2B primerleriyle okutulmuştur. MATK1 *trn*K 5' yönünde ve MAT2B *trn*K 3' yönünde okuma yapmıştır. Elde edilen ham baz sırası verileri, MAT2B primeriyle okutulan kısmın ters tekrarı (reverse antisensi) alınarak ve MATK1 aynen alınarak çakıştırılmış ve orta kısımda bulunan aynı bölgelerden biri silinmiştir. Sonra *mat*K genini saf bir şekilde elde etmek amacıyla elde edilen baz sıraları GenBank'tan alınan *Primula* cinsine bağlı taksonların *mat*K geniyle hizalanarak başta ve sonda bulunan fazlalık bazlar silinmiştir.

2.6. Veri Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

Direkt dizin analizi sonucu elde edilen *mat*K geni baz sıraları, moleküler analizlerde ham veri olarak kullanılmıştır. Herbir örneğin *mat*K genine ait nükleotit baz dizileri, Clustal X ve Clustal W (Thompson vd., 1997) programları kullanılarak alt alta hizalanmıştır. Daha sonra bu sıralar analiz edilmek üzere sırasıyla Fasta, Nexus ve PHYLIP formatlarına dönüştürülmüştür. Dönüştürülmüş bu temel veriler, çalışılan tüm örnekler arasındaki ilişkileri ortaya koymak için *mat*K genine ait baz dizinleri MEGA 5 paket programı (Tamura vd., 2011) kullanılarak analiz edilmiştir.

Gerçekleştirilen filogenetik analizde *Primula* cinsi ile yakın filogenetik ilişkisi olduğu bilinen *Androsace albana* L. (Primulaceae) türü dış grup olarak kullanılmıştır. Bu

örnek Trabzon'dan toplanmıştır (A8 Trabzon: Çaykara, Ablangas Yaylası, 01 vi 2005, 2052 m, Coşkunçelebi 541, KTUB).

Çalışılan örneklerde *mat*K genin % GC içeriği ve pürün/primidin oranı açısındaki farklılıkların (tür içi ve türler arası) anlamlı olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile tespit edilmiştir (Akgül ve Çevik, 2005). Tür içi ve türler arası % 95 güven düzeyi ile anlamlı farklılıklarının bulunması durumunda homojen alt grupların ortaya konulmasında, Post-Hoc TUKEY testinden yararlanılmıştır. Analizlerin gerçekleştirilmesinde SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Science) (2007) istatistik paket programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında, Kafkasya bölgesinde yayılış gösteren 18 *Primula* taksonuna ait 43 farklı populasyonun *mat*K geni polimorfizmi tespit edilmeye çalışılmıştır. İncelenen tüm örneklerin ait olduğu taksonlar ve *mat*K geni uzunlukları (bp) Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışılan taksonların *mat*K geni uzunlukları (bp).

	Takson	**Eşad (Sinonim)**	***mat*K (bp)**	**Populasyon Sayısı**
1.	*P. acaulis* subsp. *acaulis*	*P. vulgaris* Huds. subsp. v*ulgaris*	1532-1536	2
2.	*P. acaulis* subsp. *rubra*	*P. sibthorpii* Hoffmanns.	1535-1537	3
		P. vulgaris subsp. *rubra* (Sm.) Arcangeli		
		P. vulgaris subsp. *sibthorpii* (Hoffmanns.) W. W. Sm. & Forrest		
		P.acaulis var. *rubra* Sm.		
3.	*P. algida*	-	1530-1531	4
4.	*P. auriculata*	-	1530-1531	4
5.	*P. capitellata*	-	1530-1533	2
6.	*P. elatior* subsp. *amoena*	*P. amoena* MB.	1536	4
		P. elatior subsp. *meyeri* (Rupr.) Valentine & Lamond		
7.	*P. elatior* subsp. *elatior*	-	1536	1
8.	*P. elatior* subsp. *pallasii*	*P. pallasii* Lehm.	1538	1
9.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior*	*P. pseudoelatior* Kusn.	1532-1541	2
10.	*P. farinifolia*	-	1530	1
11.	*P. juliae*	-	1530	1
12.	*P. komarovii*	*P. acaulis* subsp. *rubra*	1533	1
13.	*P. longipes*	-	1533-1534	2
14.	*P. megaseifolia*	-	1536	2
15.	*P. ruprechtii*	*P. elatior* subsp. *leucophylla* (Pax) Heslop-Harrison	1536-1537	3
16.	*P. veris* subsp. *columnae*	*P. columnae* Ten.	1529-1537	5
		P. suaveolens Bertol.		
		P. officinalis subsp. *columnae* (Ten.) Widmer		
		P. suaveolens subsp. *thomasinii* (Gren. & Godron) Nyman		
		P. veris subsp. *suaveolens* (Bertol.) Guterm. & Ehrend.		
17.	*P. veris* subsp. *macrocalyx*	*P. macrocalyx* Bunge	1530-1536	3
18.	*P. woronowii*	*P. acaulis* subsp. *rubra*	1530	2

Çalışılan taksonlardan *P. megaseifolia*, *P. juliae*, *P. farinifolia*, *P. elatior* subsp. *pseudoelatior*, *P. elatior* subsp. *amoena*, *P. komarovii*, *P. woronowii* Kafkas endemiği, *P. longipes* Türkiye endemiği ve *P. capitellata* İran endemiğidir (Tablo 2). Çalışılan tüm taksonlarda *mat*K geni uzunluğu 1529 bp ile 1541 bp, % GC içeriği 31,6 ile 32,8 ve pürün/pirimidin oranı 0,873 ile 0,908 arasında değişmektedir. Her taksona ait *mat*K geni, % GC içeriği ve pürün/pirimidin oranı Tablo 6'da verilmiştir. Ayrıca karşılaştırma yapmak amacıyla çalışılan taksonlara ait GenBank (2011)'ta var olan ITS baz dizilerinden % GC içeriği ve pürün/pirimidin oranları hesaplanarak Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. *mat*K geninin bazı özellikleri.

	Takson (Populasyon No)	***mat*K (Bu Çalışmada)**			**ITS (URL-2)**		
		% GC	**Pürin/ Pirimidin**	**Baz çifti (bp)**	**% GC**	**Pürin/ Pürimidin**	**GenBank No.**
1.	*P. acaulis* subsp. *acaulis* (P96, Y15)	31,8	717/815 (0,880)	1532	52,7	0,972	EU643645.1
2.		31,7	719/817 (0,880)	1536	53,1	0,978	EU643643.1
3.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P13, P86, P87)	31,8	719/817 (0,880)	1536	52,7	0,972	EU643647.1
4.		31,7	718/817 (0,879)	1535	-	-	-
5.		31,7	718/819 (0,877)	1537	-	-	-
6.	*P. algida* (P23, P90, P63, P41)	32,7	727/803 (0,905)	1530	53,2	0,975	EU643661.1
7.		32,8	726/805 (0,902)	1531	53,4	0,989	EU643660.1
8.		32,8	726/804 (0,903)	1530	55,4	0,929	EU643659.1
9.		32,6	727/803 (0,905)	1530	-	-	-
10.	*P. auriculata* (P20, P88, P30, P56)	31,8	728/802 (0,908)	1530	52,9	0,942	EU643658.1
11.		31,9	728/802 (0,908)	1530	54,0	0,972	EU643657.1
12.		31,7	727/804 (0,904)	1531	53,7	0,961	EU643656.1
13.		31,9	728/802 (0,908)	1530	-	-	-
14.	*P. capitellata* (P53, P54)	32,1	726/807 (0,900)	1533	-	-	-
15.		31,8	729/801 (0,910)	1530	-	-	-
16.	*P. elatior* subsp. *elatior* (P48)	31,8	721/815 (0,885)	1536	-	-	-

Tablo 6'nın devamı

	Takson (Populasyon No)	*mat*K (Bu Çalışmada)			ITS (URL-2)		
		% GC	Pürin/ Pirimidin	Baz Çifti (bp)	% GC	Pürin/ Pürimidin	GenBank No.
17.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P26,P29, P71, P100)	31,6	720/816 (0,882)	1536	52,6	0,964	EU643654.1
18.		31,6	720/816 (0,882)	1536	52,9	0,975	EU643653.1
19.		31,8	719/817 (0,880)	1536	-	-	-
20.		31,6	720/816 (0,882)	1536	-	-	-
21.	*P. elatior* subsp. *pallasi* (P99)	31,7	725/813 (0,892)	1538	-	-	-
22.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P92, P40)	31,8	720/821 (0,877)	1541	-	-	-
23.		31,8	714/818 (0,873)	1532	-	-	-
24.	*P.farinifolia* (P98)	32,7	726/804 (0,903)	1530	-	-	-
25.	*P. juliae* (P65)	31,8	716/814 (0,880)	1530	-	-	-
26.	*P. komarovii*(P69)	31,8	718/815 (0,881)	1533	-	-	-
27.	*P. longipes* (P25, P27)	31,8	720/813 (0,886)	1533	53,8	0,958	EU643663.1
28.		31,9	720/814 (0,885)	1534	54,0	0,952	EU643662.1
29.	*P. megaseifolia* (P6, P7)	31,8	718/818 (0,878)	1536	52,7	0,983	EU643652.1
30.		31,8	717/819 (0,875)	1536	51,3	0,986	EU643651.1
31.	*P. ruprechtii* (P42, P61, P97)	31,7	718/818 (0,878)	1536	-	-	-
32.		31,7	717/819 (0,875)	1536	-	-	-
33.		31,8	719/818 (0,879)	1537	-	-	-
34.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P58, P62, P89)	31,8	719/817 (0,880)	1536	51,0	1,00	EU643650.1
35.		31,9	715/816 (0,876)	1531	51,8	0,966	AM920481.1
36.		31,7	717/813 (0,882)	1530	-	-	-
37.	*P. veris* subsp. *columnae* (P18, P34, P36, P38, P43)	31,8	719/817 (0,880)	1536	51,8	0,978	EU643649.1
38.		31,8	719/816 (0,881)	1536	51,8	0,978	EU643648.1
39.		31,8	719/817 (0,880)	1536	-	-	-
40.		31,9	715/814 (0,878)	1529	-	-	-
41.		31,8	719/817 (0,880)	1536	-	-	-
42.	*P. woronowii* (P60, P70)	32,0	718/812 (0,884)	1530	-	-	-
43.		31,9	718/812 (0884)	1530	-	-	-

Dış grup olarak kullanılan takson dışında çalışılan tüm taksonların *mat*K geni baz sıraları MEGA5 programında analiz edilmiştir. Toplam 1574 karakter üzerinden yapılan bu analiz sonucu *mat*K genine ait elde edilen bazı yapısal veriler Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Çalışılan *Primula* taksonlarında *mat*K geninin yapısal durumu.

Yapısal Birimler	
Korunmuş karakter sayısı (bp)	1335
Değişken karakter sayısı (bp)	222
Singleton karakter sayısı (bp)	58
Parsimonik bilgilendirici bölge sayısı	164
İdentical (Benzer) çift sayısı	1490
Transisyonel çift(si) sayısı	22
Tranversiyonel çift (sv) sayısı	15
si/sv (oran)	1,5
Uyumluluk indeksi (CI)	0,94
Alıkonma indeksi (RI)	0,98

Bu çalışmada ayrıca çalışılan tüm taksonların farklı populasyonlarına ait gen verileri aynı isim altında birleştirilerek MEGA 5 programında "Pairwise Distance" analizine tabi tutulmuştur. Yapılan bu analiz sonucu elde edilen "Benzemezlik Matriksi" Tablo 8'de verilmiştir. Bu matrikse göre dış grup hariç tüm taksonların % 91–99,8 arasında bir benzerliğe sahip oldukları görülmektedir.

Tablo 8. Çalışılan tüm taksonlara ait “Benzemezlik Matriksi”.

	Takson	**1.**	**2.**	**3.**	**4.**	**5.**	**6.**	**7.**	**8.**	**9.**	**10.**	**11.**	**12.**	**13.**	**14.**	**15.**	**16.**	**17.**	**18.**	**19.**
1.	*P. acaulis* subsp. *acaulis*	0,000																		
2.	*P. acaulis* subsp. *rubra*	0,003																		
3.	*P. algida*	0,038	0,036																	
4.	*P. auriculata*	0,042	0,040	0,020																
5.	*P. capitellata*	0,048	0,046	0,026	0,009															
6.	*P. elatior* subsp. *amoena*	0,006	0,004	0,038	0,041	0,046														
7.	*P. elatior* subsp. *elatior*	0,009	0,007	0,040	0,042	0,048	0,007													
8.	*P. elatior* subsp. *pallasi*	0,014	0,012	0,043	0,046	0,052	0,014	0,016												
9.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior*	0,005	0,003	0,037	0,040	0,045	0,004	0,005	0,012											
10.	*P. farinifolia*	0,037	0,035	0,002	0,019	0,025	0,037	0,039	0,042	0,035										
11.	*P. juliae*	0,007	0,005	0,037	0,040	0,046	0,006	0,007	0,015	0,005	0,037									
12.	*P. komorovii*	0,007	0,005	0,036	0,038	0,044	0,005	0,007	0,013	0,005	0,034	0,003								
13.	*P. longipes*	0,085	0,083	0,072	0,075	0,080	0,085	0,087	0,090	0,084	0,071	0,084	0,083							
14.	*P. megaseifolia*	0,005	0,003	0,037	0,041	0,047	0,005	0,007	0,012	0,003	0,036	0,006	0,005	0,084						
15.	*P. ruprechtii*	0,005	0,002	0,036	0,039	0,045	0,003	0,006	0,012	0,003	0,035	0,004	0,004	0,084	0,004					
16.	*P. veris* subsp. *columnae*	0,006	0,004	0,037	0,039	0,045	0,004	0,004	0,013	0,002	0,036	0,005	0,004	0,084	0,004	0,003				
17.	*P. veris* subsp. *macrocalyx*	0,006	0,004	0,037	0,040	0,046	0,005	0,007	0,013	0,004	0,036	0,005	0,004	0,084	0,005	0,004	0,004			
18.	*P. woronowii*	0,006	0,004	0,036	0,039	0,044	0,004	0,006	0,013	0,004	0,035	0,002	0,002	0,083	0,004	0,003	0,003	0,003		
19.	*A. albana*	0,150	0,146	0,135	0,138	0,145	0,149	0,150	0,149	0,147	0,135	0,148	0,146	0,131	0,147	0,147	0,147	0,148	0,147	0,000

Bu çalışmaya konu olan 43 *Primula* taksonunun *mat*K genine göre aralarındaki ilişkiyi tam olarak görebilmek için MEGA 5 programıyla elde edilen baz farklılıkları, insersiyonlar ve delesyonlar Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Çalışılan örneklerin *mat*K geni baz profili (Yalnızca baz farklılıkları olan bazı pozisyonlar verilmiştir).

	Takson (Populasyon No)	**Baz Pozisyonu**																			
		35	36	37	38	39	40	41	44	51	54	69	73	84	96	104	105	106	114	129
		A	A	T	C	T	A	A	C	G	T	G	C	G	A	A	T	C	G	T
1.	*P. acaulis* subsp. *acaulis* (P96)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2.	*P. acaulis* subsp. *acaulis* (P94)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P13)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P86)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P87)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6.	*P. algida* (P23)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.
7.	*P. algida* (P90)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.
8.	*P. algida* (P63)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.
9.	*P. algida* (P41)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.
10.	*P. auriculata* (P20)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
11.	*P. auriculata* (P88)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
12.	*P. auriculata* (P30)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
13.	*P. auriculata* (P56)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
14.	*P. capitellata* (P53)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
15.	*P. capitellata* (P54)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
16.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P26)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P29)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
18.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P71)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P100)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20.	*P. elatior* subsp. *elatior* (P48)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21.	*P. elatior* subsp. *pallasi* (P99)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P92)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P40)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24.	*P. farinifolia* (P98)	G	-	-	-	-	-	-	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.
25.	*P. juliae* (P65)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26.	*P. komarovii* (P69)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27.	*P. longipes* (P25)	G	-	-	-	-	-	-	T	A	C	A	A	A	.	.	.	.	T	C
28.	*P. longipes* (P27)	G	-	-	-	-	-	-	T	A	C	A	A	A	.	.	.	.	T	C
29.	*P. megaseifolia* (P6)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.
30.	*P. megaseifolia* (P7)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	.	.
31.	*P. ruprechtii* (P42)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32.	*P. ruprechtii (*P61)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
33.	*P. ruprechtii (*P97)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34.	*P. veris* subsp. *columnae* (P18)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
35.	*P. veris* subsp. *columnae* (P34)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
36.	*P. veris* subsp. *columnae* (P36)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37.	*P. veris* subsp. *columnae* (P38)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
38	*P. veris* subsp. *columnae* (P43)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
39.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P58)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
40.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P62)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
41.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P89)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
42.	*P. woronowii* (P60)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
43.	*P. woronowii* (P70)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Tablo 9'un devamı

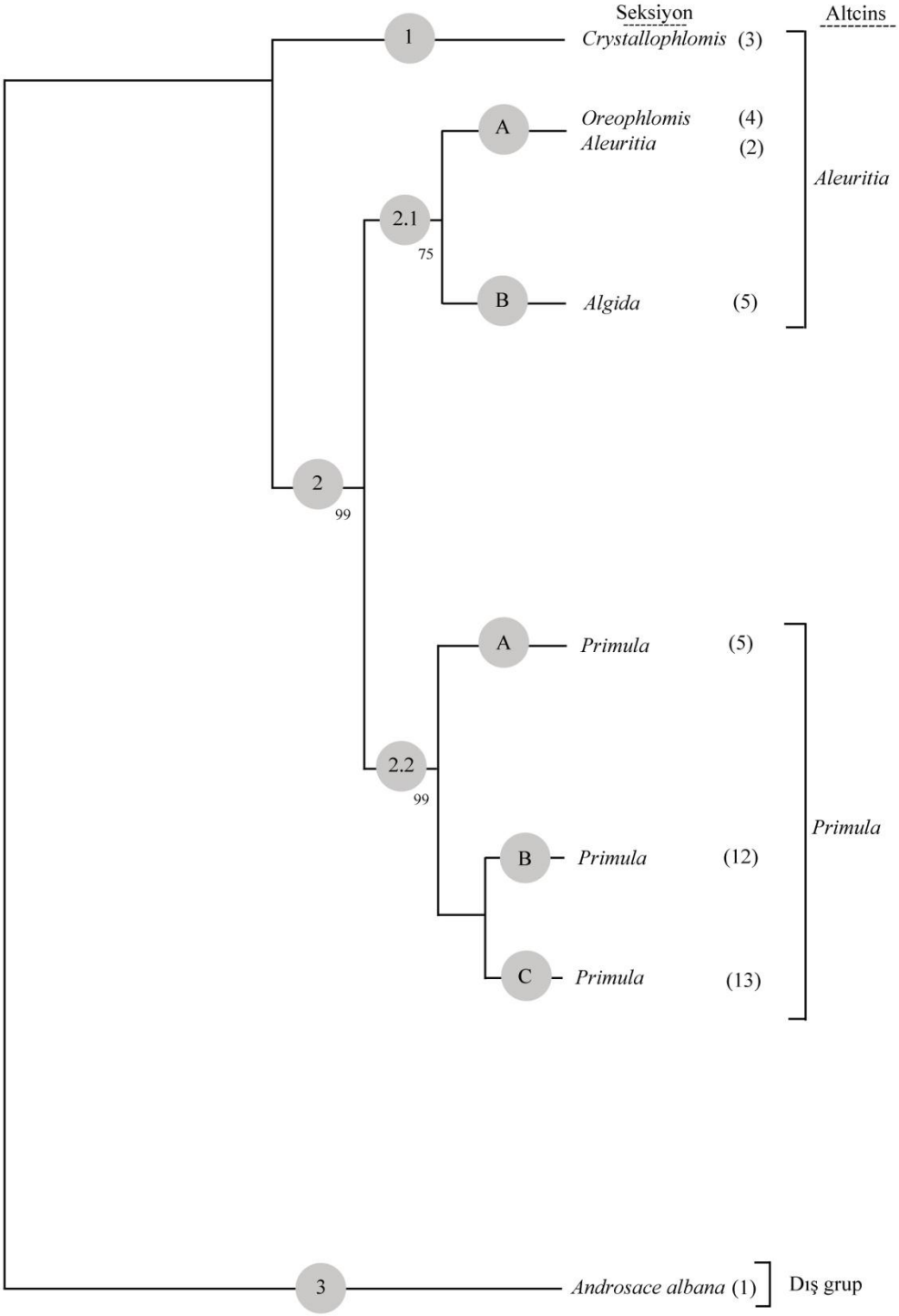
	Takson (Populasyon No)	Baz Pozisyonu																			
		151	158	162	186	200	204	205	206	207	331	438	445	480	626	896	897	1018	1256	1260	1417
		A	C	C	A	C	-	-	-	-	C	C	A	T	T	T	G	C	G	T	-
1.	*P. acaulis* subsp. *acaulis* (P96)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
2.	*P. acaulis* subsp. *acaulis* (P94)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
3.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P13)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
4.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P86)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
5.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P87)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-
6.	*P. algida* (P23)	G	A	.	G	.	-	-	-	-	A	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T
7.	*P. algida* (P90)	G	A	.	G	.	-	-	-	-	A	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T
8.	*P. algida* (P63)	G	A	.	G	.	-	-	-	-	A	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T
9.	*P. algida* (P41)	G	A	.	G	.	-	-	-	-	A	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T
10.	*P. auriculata* (P20)	G	A	.	G	A	-	-	-	-	A	T	G	.	C	C	C	T	.	.	T
11.	*P. auriculata* (P88)	G	A	.	G	A	-	-	-	-	A	T	G	.	C	C	C	T	.	.	T
12.	*P. auriculata* (P30)	G	A	.	G	A	-	-	-	-	A	T	G	.	C	C	C	T	.	.	T
13.	*P. auriculata* (P56)	G	A	.	G	A	-	-	-	-	A	T	G	.	C	C	C	T	.	.	T
14.	*P. capitellata* (P53)	G	A	.	G	A	-	-	-	-	A	T	G	.	C	C	C	T	.	.	T
15.	*P. capitellata* (P54)	G	A	.	G	A	-	-	-	-	A	T	G	.	C	C	C	T	.	.	T
16.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P26)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	A	G	-
17.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P29)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	A	G	-
18.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P71)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
19.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P100)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	A	G	-
20.	*P. elatior* subsp. *elatior* (P48)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
21.	*P. elatior* subsp. *pallasi* (P99)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	G	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-
22.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P92)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
23.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P40)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-
24.	*P. farinifolia* (P98)	G	A	.	G	.	-	-	-	-	A	.	.	.	C	C	C	.	.	.	T
25.	*P. juliae* (P65)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
26.	*P. komarovii* (P69)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	T
27.	*P. longipes* (P25)	G	A	T	G	.	T	T	T	A	G	.	T	C	C	C	.	.	.	.	T
28.	*P. longipes* (P27)	G	A	T	G	.	T	T	T	A	G	.	T	C	C	C	.	.	.	.	T
29.	*P. megaseifolia* (P6)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-
30.	*P. megaseifolia* (P7)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-
31.	*P. ruprechtii* (P42)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
32.	*P. ruprechtii (*P61)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
33.	*P. ruprechtii (*P97)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
34.	*P. veris* subsp. *columnae* (P18)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
35.	*P. veris* subsp. *columnae* (P34)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
36.	*P. veris* subsp. *columnae* (P36)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
37.	*P. veris* subsp. *columnae* (P38)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
38.	*P. veris* subsp. *columnae* (P43)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
39.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P58)	.	T	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
40.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P62)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
41.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P89)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	-
42.	*P. woronowii* (P60)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-
43.	*P. woronowii* (P70)	.	.	.	.	.	-	-	-	-	.	.	.	.	C	.	.	T	.	.	-

Tablo 9'un devamı

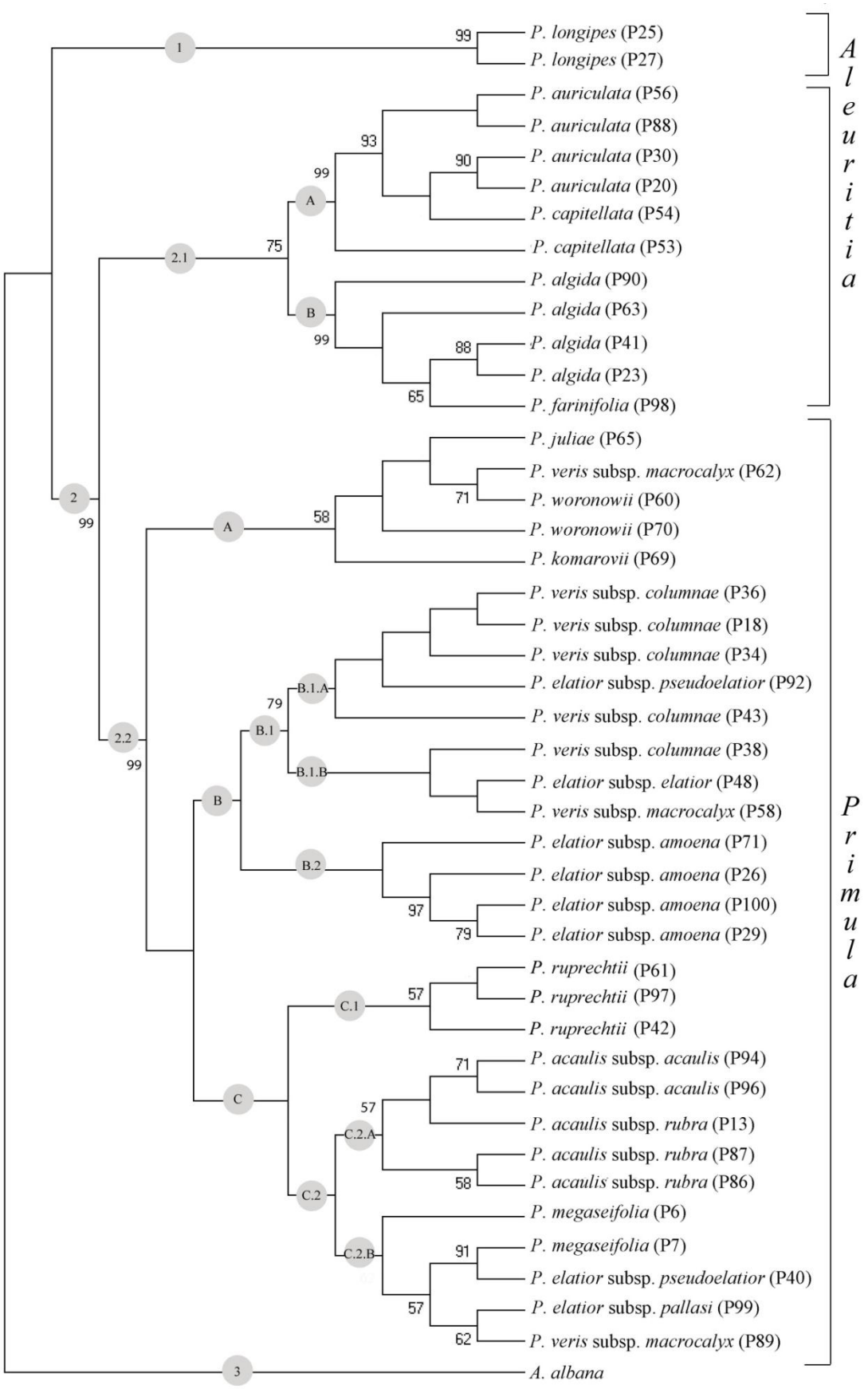
	Takson (Populasyon No)	Baz Pozisyonu																			
		1418	1419	1424	1425	1426	1427	1442	1451	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1517
		T	T	-	-	-	-	A	-	T	A	C	T	T	C	-	-	-	-	-	C
1.	*P. acaulis* subsp. *acaulis* (P96)	.	.	-	-	-	-	.	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
2.	*P. acaulis* subsp. *acaulis* (P94)	.	-	-	-	-	-	.	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
3.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P13)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
4.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P86)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
5.	*P. acaulis* subsp. *rubra* (P87)	.	-	-	-	-	-	G	T	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
6.	*P. algida* (P23)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
7.	*P. algida* (P90)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
8.	*P. algida* (P63)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
9.	*P. algida* (P41)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
10.	*P. auriculata* (P20)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
11.	*P. auriculata* (P88)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
12.	*P. auriculata* (P30)	C	.	G	G	A	A	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
13.	*P. auriculata* (P56)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
14.	*P. capitellata* (P53)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
15.	*P. capitellata* (P54)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
16.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P26)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
17.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P29)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
18.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P71)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
19.	*P. elatior* subsp. *amoena* (P100)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
20.	*P. elatior* subsp. *elatior* (P48)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
21.	*P. elatior* subsp. *pallasi* (P99)	C	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
22.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P92)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	T	A	C	T	T	.
23.	*P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P40)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
24.	*P. farinifolia* (P98)	C	.	G	G	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
25.	*P. juliae* (P65)	.	.	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.
26.	*P. komarovii* (P69)	.	C	-	-	-	-	G	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.
27.	*P. longipes* (P25)	C	.	-	-	-	-	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
28.	*P. longipes* (P27)	C	.	-	-	-	-	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
29.	*P. megaseifolia* (P6)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
30.	*P. megaseifolia* (P7)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
31.	*P. ruprechtii* (P42)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
32.	*P. ruprechtii (*P61)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
33.	*P. ruprechtii (*P97)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
34.	*P. veris* subsp. *columnae* (P18)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
35.	*P. veris* subsp. *columnae* (P34)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
36.	*P. veris* subsp. *columnae* (P36)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
37.	*P. veris* subsp. *columnae* (P38)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
38.	*P. veris* subsp. *columnae* (P43)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
39.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P58)	.	-	-	-	-	-	G	-	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	.
40.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P62)	.	.	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.
41.	*P. veris* subsp. *macrocalyx* (P89)	.	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.
42.	*P. woronowii* (P60)	.	.	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.
43.	*P. woronowii* (P70)	.	.	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.

Çalışılan örnekler arasındaki *mat*K genine dayalı filogenetik ilişkiyi göstermek için MEGA 5 programı aracılığıyla Maksimum Likelihood (ML) ağacı çizilmiştir. Oluşturulan

filogenetik ağacın daha kolay anlaşılması için önce tür üstü seviyedeki ilişkiler genel olarak şematize edilerek Şekil 6'da verilmiştir. Ayrıca ML analiz sonucu elde edilen filogenetik ağaç bir bütün olarak Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 6. Çalışılan taksonların tür üstü (seksiyon/altcins) seviyede aralarındaki filogenetik ilişkiler (Örnek sayısı parantez içinde verilmiştir).



Şekil 7. Çalışılan taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiler (Bootstrap >50 olan değerler dendogramda gösterilmiştir).

4. TARTIŞMA

Kafkasya bölgesinde yayılış gösteren çok sayıda *Primula* taksonu birçok moleküler çalışmaya konu olmuştur (Conti vd., 2000; Mast vd., 2001). Bu çalışmalarda Conti vd. (2000) 21 *Primula* taksonunu nrDNA ITS bölgesine göre ve Mast vd. (2001) 95 *Primula* taksonunu cpDNA *trnL* ve *rpl16* bölgelerine göre fakat türüstü seviyede filogenetik ilişkilerini incelemişlerdir. Mevcut bu çalışmada 18 *Primula* taksonu *mat*K geni bakımından tür düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca daha önceki moleküler çalışmalar her türü tek populasyondan temsil ederek gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan taksonların hemen hemen hepsi birden çok populasyon ile temsil edilmiştir. Böylece çalışılan taksonlar arasındaki ilişki daha iyi şekilde ortaya konmaya çalışılmıştır. *mat*K geni açısından çalışılan tür altı taksonlardan bazıları Federov (1965) tarafından morfolojik özelliklerine göre farklı türler olarak kabul edilmiştir. Özellikle bu taksonlar *mat*K polimorfizmi açısından ele alınarak yeniden değerlendirilmiştir.

Primula cinsi taksonomistler tarafından *Sphondylia* (Duby) Rupr., *Primula* Schott, *Auriculastrum* Schott, *Auganthus* (Link) Wendelbo, *Carolinella* (Helmsley) Wendelbo, *Pinnatae* Richards, *Aleuritia* (Duby) Wendelbo olmak üzere 7 altcins altında ele alınmaktadır (Richards, 2003). Bu çalışmaya konu olan taksonlardan 13 tanesi *Primula* ve 5 tanesi *Aleuritia* altcinsi içerisinde yer almaktadır (Tablo 2).

Şekil 6'da yer alan ML ağacı incelendiğinde çalışılan tüm taksonların *Primula* ve *Aleuritia* altcinslerine karşılık gelen iki ana dalda kümelendiği görülmektedir. Bu kümelenmenin her iki altcinse ait taksonlar arasında görülen ortak insersiyonlar ve delesyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 9). *Primula* altcinsine ait bu çalışmaya konu olan bütün taksonların 35-41. baz pozisyonları "AATCTAA" şeklinde bir sıraya sahiptir. Ancak *Aleuritia* altcinsi üyelerinde 35. baz "G" ve 36-41. pozisyonlarında bulunan bazlar ise delesyona uğramıştır. Bu iki altcins arasında mevcut olan bu ve benzeri baz farklılıkları Tablo 9'da verilmiştir. GC içeriği *Aleuritia* altcinsinde % 31,8-32,8 arasında değişirken, *Primula* altcinsinde % 31,6-32,0 arasında değişmektedir (Tablo 6). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde % 95 ($p<0.005$) güven düzeyinde anlamlı oldukları bulunmuştur. TUKEY testi aracılığı ile çalışılan türler içinde % GC içeriği değişim oranı en yüksek *P. algida* ve *P. farinifolia*, en düşük *P. elatior* subsp. *amoena* taksonlarında olduğu tespit edilmiştir. % GC içeriğinde gözlenen bu farklılıklar, çalışılan taksonlara ait GenBank'ta var olan ITS baz dizilerinde de görülmektedir (Tablo 6).

Pürin/Primidin oranı *Aleuritia* altcinsinde 0,885-0,908 arasında değişirken, *Primula* altcinsinin 0,873-0892 arasında değişimektedir (Tablo 6). Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde % 95 ($p<0.005$) güven düzeyinde anlamlı oldukları bulunmuştur. Benzer bir ilişki türler içinde de tespit edilmiştir. TUKEY testi aracılığı ile çalışılan türler içinde Pürin/Pirimidin oranı en yüksek *P. elatior* subsp. *pseudoelatior, P. megaseifolia* ve *P. ruprechtii* en düşük *P. algida, P. capitellata* ve *P. farinifolia* taksonlarında olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 8'de yer alan veriler incelendiğinde, *Aleuritia* altcinsi üyelerinin %92-%98 arasında, *Primula* altcinsi üyelerinin ise %98,4-%99,8 arasında bir benzerlik oranına sahip oldukları görülmektedir. *Aleuritia* altcinsinde görülen bu yüksek değişim aralığı Türkiye endemiği olan *P. longipes*'ten kaynaklanmaktadır. Bu durum ML ağacında da kolaylıkla görülebilmektedir. Bütün bu değerler *mat*K geni bakımından *Primula* altcinsinin *Aleuritia* altcinsine göre daha kararlı olduğu şeklinde yorumlanabilir. *Aleuritia* altcinsinde görülen yüksek değişimin diğer sebepleri arasında coğrafik farklılıklar, türleşmenin devam etmesi ve *mat*K geninin kararlı olmayıp mutasyona açık olması gösterilebilir.

Türkiye endemiği *P. longipes*, ait olduğu altcinsin diğer üyelerinden ayrı bir grup oluşturmuştur. Bu durum Kuzey Doğu Anadolu bölgesinde yayılış gösteren bu türün coğrafik olarak izole olmasına ve diğer taksonlardan farklı insersiyonlara/delesyonlara sahip olmasına bağlanabilir. Benzer şekilde Uzuner (2006) yapmış olduğu çalışmada, *P. longipes*'in *Aleuritia* altcinsinin diğer türlerine göre çok farklı ITS polimorfizmine sahip olduğunu tespit etmiştir. Uzuner (2006)'in sonuçları, bu çalışmada *P. longipes* ile ilgili elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Mast vd. (2001) yapmış oldukları çalışmalarında *P. longipes*'i kullanmamışlardır. Fakat bu taksonun da yer aldığı *Aleuritia* altcinsinin polifiletik olduğunu belirtmişleridir. Bu durum *P. longipes*'in farklı bir kolda yer almasını desteklemektedir.

Çalışılan taksonlardan 5 tanesi *Aleuritia* altcinsi altında incelenmektedir (Richards, 2003). ML analizi sonucu elde edilen filogenetik ağaçta bu taksonlardan *P. longipes* hariç hepsinin 2.1 nolu kolda (Şekil 7) bir araya toplandığı görülmektedir. Mast vd., (2001), *Aleuritia* altcinsini değişik coğrafyalardan çok sayıda örnekle temsil ederek cpDNA *trnL* ve *rpl16* bölgelerine dayalı olarak çalışmışlardır. Bu çalışmalarında, *Aleuritia* altcinsinin polifiletik olduğunu ifade etmişlerdir. Mast vd., (2001), bizim çalışmamıza konu olan ve farklı ülkelerden (Türkiye, İran ve Dağıstan) toplanan dört *Aleuritia* altcinsi üyesinin aynı kolda yer aldığını rapor etmişlerdir. Bu durum bu taksonların hem *mat*K geni bakımından

hem de *trnL* ve *rpl16* bölgeleri bakımından iyi bir şekilde korunmuş ve kararlı olduklarını göstermektedir.

Aleuritia altcinsi altında yer alıp bu çalışmaya konu olan tüm taksonlar kendi aralarında % 75 bootstrap değeriyle iki farklı alt dala ayrılmıştır (Şekil 6 ve 7). Bu dallardan 2.1A'da yer alan *P. auriculata* % 93 bootstrap değeriyle tek bir kol oluşturmuştur. İran endemiği olan *P. capitellata'*nın çalışılan iki farklı populasyonundan biri (P53) ayrı bir alt dal oluştururken diğeri (P54) düşük bootstrap değeriyle (% 31) *P. auriculata'*ya daha yakın olarak ML ağacındaki yerini almıştır. *P. capitellata, Oreophlomis* seksiyonunda ve *P. auriculata, Aleuritia* seksiyonunda incelenmiştir (Wendelbo, 1965; Richards 2003). Bu durum *P. capitelleta'*nın *mat*K geni bakımından değişken olduğunu ve/veya polifiletik bir takson olabileceğini göstermektedir. Yine aynı altcins içerisinde incelenen ve dört farklı örnek üzerinden çalışılan *P. algida*'nın Azerbaycan, Gürcistan ve Türkiye populasyonları tek bir alt dal (2.1B) içerisinde kümelenmiştir. *P. algida* ile aynı seksiyon ve alt seksiyonu paylaşan Kafkas endemiği *P. farinifolia* da yine aynı dal içerisinde klasik taksonomiyle uyumlu bir şekilde yer almıştır. Bu durum *Algida* altseksiyonunda yer alan bu iki taksonun *mat*K geninin iyi bir şekilde korunduğu ve coğrafik farklılıkların bu taksonlar üzerinde çok fazla etkili olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Çalışılan taksonlardan 10 tanesi *Primula* altcinsinin *Primula* seksiyonunda yer almaktadır (Richards, 2003). Fakat Federov (1965) bu taksonları daha alt taksomik gruplara ayırarak değerlendirmiştir (Tablo 2). Ancak bu taksonlar kendi aralarında düşük bootstrap değeriyle üç alt dala (2.2A, 2.2B, 2.2C) ayrılmışlardır (Şekil 7). Bu durum Richards (2003)'ın bütün bu taksonları tek bir seksiyon altında toplayarak yaptığı sınıflandırmayla uyum göstermektedir.

Primula altcinsinin yer aldığı her bir alt kol ayrı ayrı ele alındığında; 2.2A nolu dalda (Şekil 7) ikisi Ermenistan'dan (P69, P70), birisi Azerbaycan'dan (P60) toplanan taksonların bir araya geldikleri görülmektedir. Bu örnekleri Federov (1965) *P. woronowii* ve *P. komarovii* olarak tanımlanmıştır. Ancak Greuter ve Burdet (1989) bu taksonları *P. acaulis* subsp. *rubra'*nın sinonimleri olarak değerlendirmiştir. Ayrıca Richards (2003)'a göre *P. woronowii* ve *P. komarovii* türleri, *P. acaulis* subsp. *rubra* ve *P. acaulis* subsp. *acaulis'*in hibritleridir. Oysaki bu çalışmada yer alan diğer *P. acaulis* subsp. *rubra* örnekleri *P. acaulis* subsp. *acaulis* örnekleriyle beraber ML ağacının C.2.A nolu başka bir alt dalında kümelenmişdir. Tablo 8'de yer alan "Benzemezlik Matriksi" de *P. woronowii* ve *P. komarovii* taksonlarının *P.acaulis'*den ziyade *P. veris*'e benzediğini göstermektedir.

Ayrıca *P. woronowii* ve *P. komarovii* taksonları arasında var olan baz farklılıkları da bu ayrımı desteklemektedir.

Çalışmaya konu olan beş *P. veris* subsp. *columnae* populasyonundan dördü ML ağacının B.1.A nolu dalında bir araya gelmiştir (Şekil 7). Bunlardan P43 nolu populasyon Gürcistan'dan diğerleri Türkiye'den toplanmıştır. Bu durum *P. veris* subsp. *columnae* taksonunun *mat*K geni açısından kararlı olduğunu göstermektedir.

Şekil 7'de görüleceği gibi biri Ermenistan'dan (P71), üçü Türkiye'den (P26, P29, P100) olmak üzere dört farklı populasyon yüksek bootstrap değeriyle (97) ML ağacının B.2 nolu dalında bir araya gelmiştir. P71 nolu örnek Federov (1965) tarafından *P. amoena* adı altında değerlendirilmiştir. P26, P29 ve P100 nolu örnekler ise Valentine & Lamond (1978) tarafından *P. elatior* subsp. *meyeri* olarak adlandırılmıştır. Greuter & Burdet (1989) ise bu dört populasyonu *P. elatior* subsp. *amoena* adı altında toplamıştır. Ancak yapılan filogenetik analizler sonucu elde edilen ML ağacı P71 populasyonunun diğer populasyonlarla aynı isim altında toplanmasını desteklememektedir. Çünkü P71 populasyonu düşük bir bootstrap (37) değeriyle diğer incelenen örneklere bağlanmıştır. Ayrıca P71 nolu populasyonu 1256. ve 1260. pozisyonlarda G ve T bazları ihtiva ederken diğer populasyonların hepsinde aynı pozisyonlarda A ve G bazları bulunmaktadır (Tablo 9). Bunların dışında da incelenen populasyonlarda benzer baz değişimleri tespit edilmiştir. Bu durumlar incelenen Türkiye ve Ermenistan populasyonlarının ayrı taksonlar olarak ele alınması gerektiğini göstermektedir. Ancak tür seviyesinde veya alttür seviyesinde bir ayrım yapabilmek için her iki populasyonun ayrıntılı olarak örneklenmesi ve farklı moleküler markırlar aracılığı ile ele alınması gerekmektedir.

Bu çalışmada üç farklı ülkeden (Azerbaycan, Gürcistan ve Rusya) temsil edilen *P. ruprechtii* taksonunun populasyonları ML ağacının C.1 nolu dalında bir araya gelmiştir (Şekil 7). Bu takson Federov (1965) tarafından *P. ruprechtii* adı altında değerlendirilirken, Richards (2003) *P. elatior* subsp. *leucophylla* olarak değerlendirmiştir. Ancak ML ağacında bu taksona ait üç farklı populasyonun diğer bütün *P. elatior* taksonlarından ayrı ve kendi aralarında kümelenmiş olmaları Federov (1965)'un tespitini doğrulamaktadır.

Çalışılan tüm *P. acaulis* populasyonlarının, tür düzeyinde ML ağacının C.2.A nolu dalında kümelendiği görülmektedir (Şekil 7). Aynı zamanda *P.acaulis* subsp. *acaulis* ve *P.acaulis* subsp. *rubra* populasyonlarının da kendi aralarında daha alt dallar halinde bir birlerinden ayrıldıkları görülmektedir. Benzer bir durum Uzuner (2006)'in ITS'e dayalı olarak yapmış olduğu çalışmasında da tespit edilmiştir. Bu durum *P. acaulis*'in *mat*K geni bakımından oldukça kararlı olduğunu göstermektedir. Çalışmaya konu olan *P.*

megaseifolia populasyonları ve *P. elatior'*un iki alt türü ile C.2.B nolu dalda kümelendiği görülmektedir. Tablo 8'de yer alan "Benzemezlik Matriksi" ne göre *P. megaseifolia* %99,7 benzerlik oranıyla *P. acaulis* subsp. *rubra*'ya ve *P. elatior* subsp. *pseudoelatior'*a benzemektedir. Bu durum *P. megaseifolia* ile *P. acaulis'*in morfolojik açıdan benzerliğini desteklemektedir (Federov, 1965; Wendelbo, 1965; Lamond, 1978; Richards, 2003). Ancak *P. elatior* üyeleri arasında alttür seviyesinde bazı çelişkiler görülmektedir. Bu yüzden bu taksonların daha fazla populasyon üzerinden ele alınarak çalışılması gerekmektedir.

Türkiye, İran ve Azerbaycan'dan olmak üzere üç farklı populasyon üzerinden çalışılan *P. veris* subsp. *macrocalyx* taksonu tür üstü seviyede klasik taksonomiyle uyumlu şekilde filogenetik ağaçta yerini almıştır. Ancak tür seviyesinde klasik taksonomiden farklı gruplaşmalar mevcuttur (Şekil 7). Bu durum *P. veris* subsp. *macrocalyx* taksonunda *mat*K geninin sabit olmayıp değişime devam etmesinden ve hibridizasyondan kaynaklanabilir. Sadece *P. veris* subsp. *macrocalyx'*in P58 nolu İran populasyonu tür düzeyinde uyum göstererek *P. veris* subsp. *columnae* populasyonlarına yakın olacak şekilde filogenetik ağaçtaki yerini almıştır.

Dağıstan'dan toplanan ve tek bir populasyonla çalışmada temsil edilen *P. juliae* türü (P65), klasik taksonomiyle uyumlu şekilde *Primula* altcinsi içerisinde yerini almıştır. Federov (1965) *P. juliae* ve *P. megaseifolia* taksonlarını aynı seri içerisinde değerlendirmiştir. Tablo 8'deki "Benzemezlik Matriksi" incelendiğinde iki takson arasındaki yüksek benzerlik oranı (% 99,4) bu durumu desteklemektedir. Fakat ML ağacında bu iki takson farklı dallarda yer almaktadır. Bunun sebebi ML ve PD analizlerinin farklı bazlara göre türlerarası ilişkiyi tespit etmesinden kaynaklanmaktadır. ML analizi sadece parsimonik (bilgilendirici) bazlara göre değerlendirme yaparken, PD analizi gendeki/bölgedeki bütün bazlara göre değerlendirme yapmaktadır.

P. elatior türü, mevcut çalışmada *P. elatior* subsp. *amoena*, *P. elatior* subsp. *elatior*, *P. elatior* subsp. *pallasii*, *P. elatior* subsp. *pseudoelatior* olmak üzere dört farklı takson ile temsil edilmiştir. Çalışılan populasyonlardan üçü 2.2B dalında bir araya gelirken *P. elatior* subsp. *pallasi* (P99) ve *P. elatior* subsp. *pseudoelatior* (P40) populasyonları C.2.B dalında kümelenmiştir. Bu durum *Primula* cinsinde sıkça görülen hibritleşmeden (Terzioğlu vd., 2012) ve *Primula* altcinsinin polifiletik olduğundan (Mast vd., 2001) kaynaklanabilir.

5. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışma ile Kafkasya bölgesinde yayılış gösteren ve *Primula* cinsinde yer alan 18 taksonun *mat*K geni polimorfizmi ortaya konulmuştur. Bunun için toplam 43 populasyon üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür taramalarında Kafkasya'da doğal olarak yayılış gösteren *Primula* cinsi üyeleri üzerinde benzer bir çalışma yapılmadığı anlaşılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucu *mat*K geninin özellikle altcins düzeyinde olmak üzere türden türe hatta aynı türün farklı populasyonlarında bile polimorfizm gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle *mat*K geninin altcins düzeyinde klasik taksonomiyi destekleyen sonuçlar verdiği düşünülmektedir. Fakat *Primula* cinsinde sıkça görülen hibridizasyonlardan dolayı çok sayıda populasyon üzerinden çalışılması ve elde edilen sonuçların dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre *mat*K geni, *P. acaulis* subsp. *acaulis*, *P. acaulis* subsp. *rubra*, *P. elatior* subsp. *amoena*, *P. megaseifolia*, *P. veris* subsp. *columnae*, *P. algida*, *P. auriculata* taksonları arasında kesin bir ayrım vermiştir. % GC içeriği *Aleuritia* altcinsinde *Primula* altcinsine göre daha yüksek çıkmıştır. Bu farklılık, iki altcinsi bir birinden ayırmak için % GC içeriğinin destekleyici bir veri olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışılan tüm taksonlarda *mat*K geni ATG baz dizisiyle başlayıp TGA baz dizisiyle ile sonlanmaktadır. *mat*K geni uzunluğu 1529 bp ile 1541 bp, % GC içeriği 31,6 ile 32,8 ve pürün/pirimidin oranı 0,873 ile 0,908 arasında değiştiği bulunmuştur. Çalışılan taksonlar kendi aralarında % 91–99,8 arasında bir benzerliğe sahiptirler. Çalışılan taksonlar içerisinde *mat*K geni 1335 korunmuş bölge, 222 değişken bölge ve 164 parsimonik bilgilendirici bölge içermektedir. Tüm taksonlar içerisinde en uzak benzerlik *P. longipes* ile *P. elatior* subsp. *pallasi* arasında görülmüştür.

6. ÖNERİLER

Primula cinsi Kafkasya'da 25 takson ile temsil edilmektedir. Bu çalışmada bunlardan 18 tanesi 43 populasyon üzerinden değerlendirilmiştir. Geri kalan taksonların elde edilelerek benzer moleküler çalışmaların gerçekleştirilmesiyle Kafkasya'da yayılış gösteren *Primula* cinsi üyelerinin filogenetik ilişkileri net bir şekilde ortaya çıkarılabilir. Yapılacak moleküler çalışmaların sadece kloroplast genomunu değil nüklear genomu da içerecek tarzda ve çoklu populasyon kullanarak gerçekleştirilmesi cinsin filogenetik geçmişi hakkında daha sağlam hipotezler öne sürmeyi sağlayacaktır.

*mat*K geni baz dizisine göre çizilen ML filogenetik ağacına göre; *Primula* altcinsi çok sayıda örnek populasyon üzerinden farklı serilere ayrılarak yeniden değerlendirilebilir.

P. acaulis, Türkiye'de ve Kafkasya bölgesinde hatta dünyada alt tür ayrımı açısından sorun teşkil eden bir taksondur. *P. acaulis'*in alttürleri oldukları iddia edilen tüm taksonlar çoklu populasyonlar üzerinden hem morfolojik hem de ayrıntılı moleküler çalışmalarla ele alınması gerekir.

*mat*K geni polimorfizmi *P. woronowii* ve *P. komarovii* taksonlarının, *P.acaulis* subsp. *rubra'*nın sinonimleri olarak değerlendirilmesini desteklememiştir. Ancak bu durumun çok sayıda populasyon ve moleküler markırla (ITS, *rbcl,* vb.) çalışılarak değerlendirilmesi gerekir.

P. elatior subsp. *leucophylla'*nin sinonimi olarak değerlendirilen *P. ruprechtii'*nin *mat*K geni baz dizisine göre çizilen ML filogenetik ağacından farklı bir takson olduğu açıkça görülmekle birlikte nüklear DNA üzerindeki ITS bölgelesi gibi farklı moleküler markırlarla ve morfolojik karakterlerle de *P. elatior*'a bağlı taksonlardan farklı olduğu gösterilmelidir.

*P. elatior'*a bağlı taksonlar ML filogenetik ağacında çok farklı alt dallarda yer almaktadır. *mat*K genine göre tespit edilen bu farklılıklar çok sayıda poupalyon ve farklı moleküler markırlar üzerinden gerçekleştirilecek çalışmalarla desteklenmesi gerekir.

*mat*K geni baz dizisine göre çizilen ML filogenetik ağacı, *P. amoena'*nın, *P. elatior* subsp. *amoena'*nın sinonimi olarak değerlendirilmesinin doğru olduğunu desteklemektedir. Ancak *P. amoena'*nın farklı populasyonları üzerinde yapılacak morfolojik ve moleküler çalışmalar daha net bir karara varılmasını sağlayacaktır.

P. farinifolia, Richards (2003) tarafından *P. darialica'*nın sinonimi olarak değerlendirilmiştir. Her iki örnek de çoklu populasyon üzerinden daha ayrıntılı bir şekilde hem moleküler hem de morfolojik yönden incelenerek net bir sonuca varılabilir.

Ülkemizin endemik türü olan *P. longipes* için DNA barkodu bulunabilir. Bu sayede hem *P. longipes*' in yasal olmayan yollardan ülke sınırları dışına çıkarılması engellenerek gen kaynaklarımıza sahip çıkılabilir.

7. KAYNAKLAR

Abou-El-Enain, M., M., 2006. Chromosomal variability in the genus *Primula* (*Primulaceae*), Botanical Journal of the Linnean Society,150, 211–219.

Anderberg, A., A. ve El-Ghazaly, G., 2000. Pollen morphology in *Primula* sect. *Carolinella* (Primulaceae) and its taxonomic implications, Nord. J. Bot. 20, 5-14.

Akgül, A. ve Çevik, O., 2005. İstatistiksel Analiz Teknikleri, Emek Yayınevi, Ankara, 456.

Ayaz, S. ve İnceer, H., 2003. Chromosome Counts of Some *Primula* L. Species (Primulaceae), Biologia, 58, 1, 45 – 48.

Baldwin, B. ve G., Markos, S., 1998. Phylogenetic utility of the Externaal transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of Calycadenia (Compositae). Mol. Phyl. Evol., 10, 449-463,

Barrett, S. ve C., H., 1992. Evolution and Function of Heterostyly, Monographs on Theoretical and Applied Genetics, Springer- Verlag, Berlin, 15.

Barrett, S., C., H., Jesson L., K. ve Baker, A., M., 2000. The Evolution and Function of *L* Stylar Polymorphisms in Fowering Plants, Annals of Botany, 85, 253 – 265.

Bayazit, S., 2007. Türkiye'nin Farklı Ekolojilerindeki Yabani Badem Genotiplerinde Fenolojik, Morfolojik ve Pomolojik Özellikler ile Moleküler Yapıların Tanımlanması, Adana. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,

Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi Geçmişte ve Bugün, Nobel Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 191.

Beyazoğlu, A., 1989. Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yayılış Gösteren Bazı Primulaceae Taksonları Üzerinde Anatomik Çalışmalar, TrJBot, 3, 3 – 16.

Conti, E., Suring, E., Boyd D., Jorgensen, J., Grant J. ve Kelso, S., 2000. Phylogenetic Relationships and Character Evolution in *Primula* L.:the Usefulness of ITS Sequence data, Plant Biosystems, 134, 385 – 392.

Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, NY, USA.

Doyle, J., J. ve Doyle, J., L., 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue, Phytochemical Bull., 19, 11 – 15.

Doyle, J., A., 1998. Phylogeny of Vascular Plants, Annual Review of Ecology and Systematics, 29: 567-599.

Erickson, L., R., Strauss, W., A. ve Bevensdorf, W., D., 1983. Restriction patterns reveal origins of chloroplast genomes in Brassica amphidiploids, Theor Appl Genet, 65, 201–206.

Fayvush, G., ve Tamanyan, K., 2011. Investigation of invasive plants species in the Caucasus: current situation, Aliens: The Invasive Species Bulletin, 31: 42-46.

Federov, A., 1965. Prepared by an A. Federov of Primula Genus Taxonomy, in edit by Flora of USRR, 86 – 151.

Gauthier, P., 1998. Lumaret, R. ve Bédécarrats, A., Genetic variation and gene flow in Alpine diploid and tetraploid populations of Lotus (L. alpinus (D.C.) Schleider/ L. corniculatus L.) II. Insights from RFLP of chloroplast DNA, Heredity, 80, 694–701.

Greuter, W. ve Burdet, H., M., 1989. Med-Checklist Notulae, 4. Willdenowia 29, 51-67.

Gültepe, M., Uzuner, U., Coşkunçelebi, K., Beldüz, A., O. ve Terzioğlu, S., 2010. ITS (Internal Transcribed Spacer) polymorphism in the wild Primula L. (Primulaceae) taxa of Turkey, TrJBot, 34, 147-157.

Hilu, K., W. ve Liang, H., 1997. The *mat*K gene: Sequence Variation And Application in Plant Systematics, American Journal of Botany, 84, 830–839.

Hilu, K., W., T., Borsch, K., Muller, D., E., Soltis, P., S., Soltis, V., Savolaınen, M., W., Chase, M., P., Powell, L., A., Alice, R., Evans, H., Sauquet, C., Neinhuis, T., A., B., Slotta, G., R., Jens, C., S., Campbell ve L. W. Chatrou., 2003. Angiosperm Phylogeny Based On *mat*K Sequence Information, American Journal of Botany, 90, 1758–1776.

Jianhua, L., A., Bogle, L. ve Klein, A., S., 1999. Phylogenetic relationships in the Hamamelidaceae: evidence from the nucleotide sequences of the plastid gene *mat*K. Plant Syst. Evol., 218, 205-219.

Johnson, L., A. ve Soltis, D., E., 1994. *mat*K DNA Sequences and Phylogenetic Reconstruction in Saxifragaceae s. str. Sysematic Botany, 19, 143–156.

Judd, W., S., Campbell, C., S., Kellogg, E., A. ve Stevens, P., F., 2008. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, Sinauer Associates, USA, XI, 84, 95.

Katı, H., 1998. *Primula longipes* (Primulaceae) bitkisinden elde edilen özütlerin bacilovirusun replikasyonuna etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Kelso, S., 1991. Taxonomy and Phytogeography of *Primula* sect. Cunelifolia in North America, Madrano, 38, 37 – 44.

Lamond, J., 1978. Flora of Turkey and The East Aegean Islands, ed: Davis P. H., 6, 112 - 120.

Levan, A., Fredga, K. ve Stanberg, A., A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52, 201-220.

Liang, H. ve Hilu, K., W., 1996. Application of the matK gene sequences to grass systematics. Canadian Journal of Botany 74, 125–134.

Martins, L., Oberprieler, C. ve Hellwig, F., H., 2003. A phylogenetic analysis of Primulaceae s.l. based on internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence data. Plant Syst. Evol., 237, 75–85

Meredith, C., P., 1992. DNA Fingerprinting: What is the True Identity of Your Grapes?. Grapes Growing. Nowember- December, 27-31.

Mast, A., R., Kelso, S., Richards, J., Lang, D., J., Feller, D., M., S. ve 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.

Mather, K., 1950. The Genetical Architecture of Heterostyly in *Primula sinensis*, Evolution, 4, 340 – 352.

Mizuhiro, M., Ito, K. ve Mii, M., 2001. Production and Characterization of Interspesific Somatic Hybrids between *Primula malacoides* and *P. obconica*, Plant Science, 161, 489 – 496.

Muller, K., F., Borsch, T. ve Hilu, K., W., 2006. Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: contrasting *matK*, *trnT-F* and *rbcL* in basal angiosperms. Molecular Phylogenetics and Evolution, 41, 99–117.

Olmstead, R., G. ve Palmer, J., D., 1994. Chloroplast DNA Systematics: A Review of Methods and Data analysis. American Journal of Botany, 81, 1205-1224.

Onipchenko, V., G., 2004. Alpine Ecosystems in the Northwest Caucasus, ed: Werger, M. J. A., 29, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Pınar, N., M., Dogan, D., Akgül, G. ve Geven, F., 2005. The Pollen Morphology of the Wild *Primula* L. (Primulaceae) Species in Turkey, XVII International Botanical Congress Vienna, Austria, Europe, 327.

Prajapati, D., N., Knox, J., F., Emmons, J., Saeian, K., Csuka, M., E. ve Binion, D., G., 2003. Leflunomide Treatment of Crohn's Disease Patients Intolerant to Standard Immunomodulator Therapy, J Clin Gastroenterol, 37, 125 – 133.

Randall, J., E., 1998. Zoogeography of Shore Fishes of the Indo-Pacific Region, Zoological Studies, 37, 227-268.

Richards, J., 2003. *Primula* L. Second ed., Timber Press, Portland, Oregon , 3, 7, 17.

Rogers, S., O. ve Bendich, A., J., 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. Molec. Biol. Manual, D1, 1-8,

Schatz, G., 2006. Coordination and Development of Plant red List Assesment for the Caucasus Biodivesity Hotspot.

Schou, O., 1983.The distyly in *Primula elatior* (L.) Hill (Primulaceae), with a study of flowering phenology and pollen flow. Botanical Journal of the Linnean Society, 86, 261–274.

Segraves, K., A., Thompson, J., N., Soltis, P., S. ve Soltis, D., E., 1999. Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of Heuchera grossulariifolia, Mol. Ecol., 8, 253–262.

Shetekauri, S. ve Jacoby, M., 2009. Mountain Flowers & Trees of Caucasia, Mega Basım, İstanbul, 6.

Song, K. ve Osborn, T., C., 1992. Polyphyletic origins of Brassica napus: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses, Genome, 35, 992–100,.

SPSS Institute Inc., 2007. SPSS Base 15.0 User's Guide, 356.

Sugita, M., Shinozaki, K. ve Sugiura. M., 1985. *Tobacco* chloroplast $tRNA^{Lys}$ (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: an open reading frame and a conserved boundary sequence in the introni, Proceedings of the National Academy of Sciences, 82, 3557–3561.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. ve Bouvet, J., 1991. Universal Primers for Amplification Three Non-coding Regions of Chloroplast DNA, Plant Molecular Biology, 17, 1105 – 1109.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher G., Nei, M. ve Kumar, S., 2011. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution (Revised).

Terzioğlu, S., Coşkunçelebi, K. ve Gültepe, M., 2012. *Primula* × *uzungolensis* (Primulaceae): A new natural hybrid from NE Anatolia, TJBot., 36, 9-19.

Trift, I., Källersjö, M. ve Anderberg, A., A., 2002. The Monophyly of Primula (Primulaceae) Evaluated by Analysis of Sequences from the Chloroplast Gene *rbcL*, Systematic Botany, 27, 2, 396-407.

Thompson, J., D., Gibson, T., J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., D. ve Higgins, G., 1997. The ClustalX Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools, Nucleic Acids Res., 24, 4876 – 4882.

Thomas, M., R., Matsumuto, S., Cain, P. ve Scott, N., S., 1993. Repetitive DNA of Grapevine: Classes Present and Sequences Sutable for Cultivar Identification. Theor. Apll. Genet., 86, 173-180.

URL-1, http://tr.wikipedia.org/wiki/K%C3%BC%C3%A7%C3%BCk_Kafkas_S%C4%B1rada%C4%9Flar%C4%B1. 7 Aralık 2011.

URL-2, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?term=Primula%20 GenBank. 9 Mart 2011.

Uzuner, U., 2006. Kuzey Anadolu Doğal *Primula* L. (Primulaceae) Taksonlarının nrDNA ITS Bölgeleri Bakımından Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Valentine, D., H. ve Lamond, J., 1978.The taxonomy and nomenclature of *P. amoena,* Notes Roy. Bot. Gdn. Edinb. 36, 39-42.

Vijayan, K. ve Tsoa, C., H., 2011. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. Current Science, 99, 1530-1541.

Wendelbo, P., 1965. Flora İranica, ed: Rechinger, K.H., 1-12, Akademische Druck, Graz.

Widmer, A. ve Baltisberg, M., 1999. Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine Draba aizoides L. (Brassicaceae): haplotype relationships and population structure, Molecular Ecology, 8, 1405-1415.

Williams, L. 2004. Caucaus Biodiversity Hotspot.

Wolfe, K., H., Morden, C., W. ve Palmer, J., D., 1992. Function and evolution of a minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. Proceedings of the National Academy of Sciences, 89, 10648-10652.

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

Zhang, L. ve Kadereit, J., W., 2004.Classification of *Primula* sect. *Auricula* (Primulaceae) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution. Botanical Journal of the Linnean Society, 146, 1–26.

ÖZGEÇMİŞ

Bayburt'ta 1986 yılında dünyaya geldi. İlkokulu Şair Zihni İlköğretim Okulun'da, ortaokulu Yüzbaşı Şehit Agâh İlköğretim Okulunda ve liseyi Bayburt Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'de 2004-2009 yılları arasında tamamladı. Yüksek lisans öğrenimine 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladı. Florida State University, Biological Science bölümde 2011 yılında Yüksek Öğretim Kurumu bursuyla üç ay yüksek lisnas teziyle alakalı araştırmalarda bulundu. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda 2011 yılından beri Araştırma Görevlisi unvanıyla görev yapmaktadır.