

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**TÜRKİYE DE YAYILIŞ GÖSTEREN *CYCLAMEN* L.
(PRİMULACEAE) CİNSİNE AİT TAKSONLARIN ITS nrDNA
DİZİLERİNE DAYALI FİLOGENETİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE PALA

BALIKESİR, EYLÜL - 2019

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**TÜRKİYE'DE YAYILIŞ GÖSTEREN *CYCLAMEN L.*
(PRİMULACEAE) CİNSİNE AİT TAKSONLARIN ITS nrDNA
DİZİLERİNE DAYALI FİLOGENETİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE PALA

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Gülendam TÜMEN (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Hulusi MALYER

Dr. Öğretim Üyesi Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU

BALIKESİR, EYLÜL - 2019

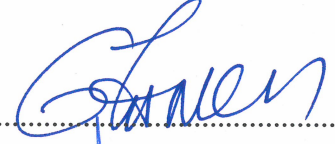
KABUL VE ONAY SAYFASI

Özge PALA tarafından hazırlanan “**TÜRKİYE’DE YAYILIŞ GÖSTEREN CYCLAMEN L. (PRİMULACEAE) CİNSİNE AİT TAKSONLARIN ITS nrDNA DİZİLERİNE DAYALI FİLOGENETİK ANALİZİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 16.09.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

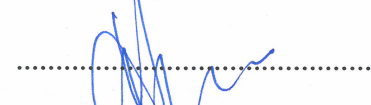
Jüri Üyeleri

İmza

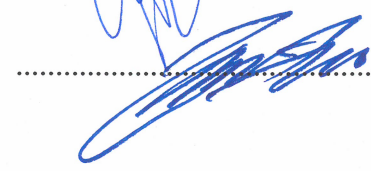
Danışman
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN



Üye
Prof. Dr. Hulusi MALYER



Üye
Dr. Öğretim Üyesi Sümeyye AYDOĞAN
TÜRKOĞLU



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

**TÜRKİYE DE YAYILIŞ GÖSTEREN *CYCLAMEN L.*
(PRİMULACEAE) CİNSİNE AİT TAKSONLARIN ITS nrDNA
DİZİLERİNE DAYALI FİLOGENETİK ANALİZİ**
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÖZGE PALA
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF DR. GÜLENDAM TÜMEN)
BALIKESİR, EYLÜL - 2019

Cyclamen Primulaceae familyasına ait bir cinstir. Türkiye’de yetişen 10 türü (13 takson) vardır. Ülkemizin birçok yerinde yayılış göstermektedir bunun yanında birçok taksonu endemiktir.

Türleri üzerinde birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, moleküler sistematik açıdan ülkemizde herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Türkiye’nin farklı yerlerinde yetişen bu bitkinin taksonları için farklı zamanlı arazi çalışmaları yapılmıştır. DNA izolasyonları, fenol-kloroform-izoamilalkol metodu ya da hazır kitler kullanılarak yapılmıştır. Sonrasında PCR reaksiyonları ITS primerleri kullanarak tamamlanmış ve sekanslama reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham dizilerin filogenetik analize hazırlanmadan önce işlenmiştir. Bu dizilerin daha sonra CLUSTAL W programıyla hizalamaları yapılarak PAUP* programıyla da filogenetik analizi tamamlanmıştır.

Yapılan filogenetik analiz sonucunda *Cyclamen* taksonlarına ait parsimoni ölçütü ve genetik uzaklık kıstası altında soyağaçları elde edilmiştir. Elde edilen bu soyağaçlarına göre Türkiye’de yayılış gösteren *Cyclamen* taksonlarının arasındaki ilişkiler belirlenmiştir. Oluşturulan ağaçların hepsinde dış grup olarak kullanılan *Primula Cyclamen* taksonlarından bariz şekilde ayrılmıştır. Bazılarının çok yakın akrabalık ilişkisi gösterirken, bazı taksonların genetik olarak diğerlerinden çok daha fazla farklılaşma gösterdiği görülmüştür. Dış grup olarak kullanılan *Primula* taksonları %100 lük bir değerle diğerlerinden ayrılmıştır. Consensus ağacında politomi oluşmuştur. Bootstrap ile 4 klad elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Cyclamen*, ITS, nrDNA, filogenetik analiz

ABSTRACT

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TAXA BELONGING TO THE GENUS *CYCLAMEN* L. (PRIMULACEAE) GROWING IN TURKEY USING ITS nrDNA SEQUENCES

MSC THESIS

OZGE PALA

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. GULENDAM TUMEN)

BALIKESİR, SEPTEMBER 2019

Cyclamen species belong to the Primulaceae family consisting of 10 species (13 taxa) distributed in Turkey. They are found in many places in the country. Besides that, their many taxa are endemic.

Even though species have been investigated many times, there has not been any molecular systematic research conducted in Turkey. First, field research was performed for the plant material collection. DNA isolations were conducted via phenol-chloroform-isoamyl alcohol method or prepackaged kits. Afterwards, PCR reactions were completed with using ITS primers and sequencing reactions were performed. The processing part before preparing the obtained raw sequences for phylogenetic analysis was conducted visually. Thereafter, alignments of these sequences were made via CLUSTAL X and the phylogenetic analysis was performed using the PAUP* program.

As a result of the phylogenetic analysis for the *Cyclamen* taxa under the parsimony and genetic distance criteria, the phylogenies were obtained. *Primula* taxa, which is used as an outer group in all of the trees formed, is clearly separated from *Cyclamen* taxa. While some have very close kinship relationships, some taxa are genetically differentiated from others. *Primula* taxa used as an external group are separated from the others with a value of 100%. Polytomy was formed in Consensus tree. 4 clads were obtained with bootstrap.

KEYWORDS: *Cyclamen*, ITS, nrDNA, phylogenetic analysis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 <i>Primulaceae</i> Familyasının Morfolojik Özellikleri	2
1.2 <i>Cyclamen</i> L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri	2
1.2.1 <i>Cyclamen</i> L. Cinsin Sistematikteki Yeri.....	3
1.2.2 <i>Cyclamen</i> L. Cinsi Üzerine Yapılan Çalışmalar	3
1.2.3 <i>Cyclamen</i> L. Cinsin Ekonomik ve Tıbbi Önemi.....	5
1.3 Moleküler Sistematik	5
1.3.1 Markır Tipleri	6
1.3.1.1 Morfolojik Markırlar	6
1.3.1.2 Biyokimyasal Markırlar	7
1.3.1.3 Moleküler Markırlar.....	7
1.3.1.3.1 Hibridizasyon Temelli Moleküler Markırlar	8
1.3.1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi	8
1.3.1.3.2 PCR’ ye Dayalı Moleküler Markırlar	9
1.3.1.3.2.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA(s)) – Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA.....	9
1.3.1.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi	9
1.3.1.3.2.3 Minisatellitler (VNTR – Variable Number of Tandom Repeats / Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar) Mikrosatellitler (SSR – Simple Sequence Repeats / Basit Dizi Tekrarları)	10
1.3.1.3.2.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – Basit İç Dizi Tekrar	10
1.3.1.3.2.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) – Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler	11
1.3.1.3.2.6 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) – Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler	11
1.3.1.3.2.7 ESTs (Expressed Sequence Tags) – İfade Edilen Dizi İşaretleri.....	11
1.3.1.3.2.8 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – Tek Nükleotid Polimorfizmi.....	12
1.3.1.3.2.9 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) – Tek Zincir	12
1.3.1.3.2.10 SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) – Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm	12
1.3.2 ITS (Internal Transcribed Spacers) ve nrDNA Bölgeleri	13
1.3.2.1 ITS Bölgesi ve Genel Özellikleri	13

1.3.2.2	rDNA Bölgeleri.....	14
1.3.2.1.1	Küçük Alt Birim rDNA (18S)	14
1.3.2.1.2	5.8S rDNA.....	14
1.3.2.1.3	Büyük Alt Birim rDNA (28S)	15
1.3.3	DNA Dizileme	15
1.3.3.1	Maxam ve Gilbert' in DNA Kimyasal Kırılma Yöntemi (DNA Sequencing)	16
1.3.3.2	Sanger Dizileme Yöntemi (Cycle Sequencing)	17
1.3.3.3	Otomatik DNA Dizileme Yöntemi (Automated Sequencing)	18
1.3.3.4	Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı	19
1.3.4	Filogenetik Analiz.....	20
1.3.4.1	Filogenetik Ağaç	20
1.3.4.1.1	Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler	21
1.3.4.1.1.1	Karakter Temelli Yöntemler.....	22
	Maximum Parsimoni (MP), Farklılıkları En Aza İndirme (Tutumluluk) Yöntemi.....	22
	Maximum Olasılık (Maximum Likelihood-ML) En Yüksek İhtimal Yöntemi.....	22
	Bayes Yöntemi.....	23
1.3.4.1.1.2	Mesafe Temelli Yöntemler	24
	Kümelenme Temelli Logaritmalar.....	24
	UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) Metodu	24
	NJ (Neighbour Joining) Metodu	25
	En İyi Durum Temelli Logaritmalar	25
1.3.4.1.2	Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Programlar	25
1.3.4.1.2.1.	PAUP* (*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods / Parsimoni ve Diğer Metotlar Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz)	26
1.3.4.1.2.2.	Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny).....	27
1.3.4.1.2.3.	PHYLIP (The Phylogeny Inference Package).....	27
2.	MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1	Materyal.....	28
2.1.1	Kullanılan Bitki Örneklerinin Toplanması	28
2.1.2	Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması.....	29
2.1.3	Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.1	Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.1.1	Fenol- Kloroform- İzoamilalkol Metoduyla Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	29
2.1.3.1.2	Kit ile Yapılan İzolasyonda Kullanılan Kimyasallar	30
2.1.3.1.3	PCR' da Kullanılan Kimyasallar	30
2.1.3.1.4	Agaroz Jel – Elektroforez Tamponları.....	32
2.2	Yöntem	32
2.2.1	Bitkilerden Genomik DNA İzolasyonu	32
2.2.1.1	Fenol- Kloroform- İzoamil Alkol Protokolü.....	33
2.2.1.2	Kit ile Yapılan DNA İzolasyonunun Protokolü.....	34
2.2.2	DNA Saflık Tayini.....	36
2.2.3	PCR Yapılışı	36
2.2.4	Agaroz Jel Elektroforezi	37
2.2.5	Dizileme ve Dizi Analizi	38

2.2.6	Filogenetik Analiz.....	38
3.	BULGULAR	39
3.1	Bitki Materyallerinin Toplanması	39
3.2	DNA İzolasyonu.....	40
3.3	PCR	42
3.4	DNA Dizileme ve Dizi Analizi	44
3.4.1	DNA Dizileme Reaksiyonları.....	45
3.5	Verilerin Filogenetik Analize Hazırlanması.....	45
3.6	Filogenetik Analiz	52
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA	57
5.	KAYNAKLAR.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: ITS primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri [33].....	14
Şekil 1.2: Dizi analizi sonucu oluşan piklerin görüntüsü.	19
Şekil 3.1: İzole edilen bazı <i>Cyclamen</i> türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü	40
Şekil 3.2: İzole edilen bazı <i>Cyclamen</i> türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü	41
Şekil 3.3: İzole edilen bazı <i>Cyclamen</i> türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü.	41
Şekil 3.4: İzole edilen bazı <i>Cyclamen</i> türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü.	42
Şekil 3.5: PCR sonucunda bazı <i>Cylamen</i> türlerinin bantları.	42
Şekil 3.6: PCR sonucunda bazı <i>Cylamen</i> türlerinin bantları.	43
Şekil 3.7: PCR sonucunda bazı <i>Cylamen</i> türlerinin bantları.	43
Şekil 3.8: PCR sonucunda bazı <i>Cylamen</i> türlerinin bantları.	44
Şekil 3.9: PCR sonucunda bazı <i>Cylamen</i> türlerinin bantları.	44
Şekil 3.10: ITS bölgesine ait diziler kullanılarak oluşturulan 1 numaralı ağaç.	52
Şekil 3.11: Parsimoni ile oluşturulan strict consensus ağacı.	53
Şekil 3.12: Parsimoni ile oluşturulan majority rule ağacı.....	54
Şekil 3.13: UPGMA analizi sonucunda oluşan ağaç.	55
Şekil 3.14: NJ (Neighbour Joining) analizi sonucunda oluşan ağaç.	56

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Türkiye’ deki endemik <i>Cyclamen</i> türleri	1
Tablo 1.2: Kimyasal kırılma yönteminde kullanılan kimyasallar	17
Tablo 2.1: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri.	30
Tablo 2.2: PCR’ de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanılan kimyasallar. ..	31
Tablo 2.3: Master Mix ile PCR’da kullanılan kimyasal.....	31
Tablo 2.4: PCR’de kullanılan primerler	32
Tablo 2.5: 5X TBE tamponu hazırlama.	32
Tablo 2.6: Kullanılan PCR programı	37
Tablo 3.1: Kullanılan bitki materyalleri ve lokaliteleri.....	39

KISALTMALAR LİSTESİ

AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
ASAP	: Allele Özgü Birleşen Primerler
Bp	: Baz Çifti
CAPS	: Kesilip Çoğaltılmış polimorfik Diziler
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)
cpDNA	: Kloroplast DNA
ddNTP	: Dideoksiribonükleosid Trifosfat
dH₂O	: Distile Su
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid Trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
ESTs	: İşaretle İfade Edilen Diziler
ETOH	: Etil Alkol / Etanol
ETS	: External Transcribed Spacer
gDNA	: Genomik DNA
IGS	: Intergenic Spacer
ISSR	: Basit İç Dizi Tekrarları
ITS	: Internal Transcribed Spacer
L.	: Linne
Mat K	: Maturase K geni
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
ML	: Maximum Likelihood
MP	: Maximum Parsimony
mtDNA	: Mitokondri DNA'sı
NaAc	: Sodyum Asetat
NaCl	: Sodyum Klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NJ	: Neighbour Joining
NOR	: Nüklear Organizer Region
nrDNA	: Nüklear Ribozomal DNA
NTS	: Non Transcribed Spacer
PAUP	: Phylogenetic Analysis Using Parsimony
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHYLIP	: The Phylogeny Inference Package
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	: Dakikadaki Döngü Sayısı
SCAR	: Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SPAR	: Tek Primerle Çoğaltılmış Reaksiyon
SRAP	: Diziye İlişkin Çoğaltılmış Polimorfizm
SSCP	: Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm
SSR	: Basit Dizi Tekrarları
SSU	: Small Subunit
STS	: Dizisi Etiketlenmiş Alanlar
Taq	: Thermus aquaticus

TBE	: Tris – Borik asit – EDTA
TE	: Tris – EDTA
Tm	: Erime Sıcaklıkları
UPGMA	: Unweighted Pair-Group Metod of Aritmetic Avarage
VNTRs	: Çeşitli Sayıda Ardışık Tekrarlar

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, hocam Sayın Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a ve savunma jürimde yer alan Prof. Dr. Gülendam TÜMEN, Prof. Dr. Hulusi MALYER ve Dr. Öğretim Üyesi Sümeyye AYDOGAN TÜRKOĞLU' na teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca birlikte eğlenceli vakit geçirdiğim, aynı laboratuvarı paylaştığım, hayatımın en güzel anlarında her daim yanımda olan dostum Tuğba AKYÜZ'e, yüksek lisansın hayatıma kattığı güzel insan Zeynep AKINCI'ya, laboratuvar arkadaşlarım Gamze GÜNGÖR'e, Özgün ALPTEKİN'e, Kadriye GÜVEN'e, Eda CANSIZ'a, Ayfer ALKAÇ'a, Ali Can KAYA'ya, Büşra BAŞ'a ve Sümeyye ALTUNOK'a teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince, laboratuvarda yaptığım deneyler sırasında bilgisini, yardımlarını ve arkadaşlığını esirgemeyen Dr. Görkem DENİZ SÖNMEZ'e, Dr. Taner ÖZCAN'a, Dr. Emre SEVİNDİK' e, Dr. Özal GÜNER'e teşekkürlerimi sunarım.

Öğrencilik hayatım boyunca bana ilgi ve fedakârlık göstererek, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen ailem; Emine TOK, Namık Kemal TOK ve Yasin TOK'a teşekkürü borç bilirim.

Desteğini üzerimden eksik etmeyen, bana benden çok inanan, hayatımı her anlamda kolaylaştıran hayat arkadaşım canım eşim Haldun PALA'ya ve bana anneliği yaşatan biricik kızım Nisa Elif PALA'ya teşekkür ederim.

Eylül, 2019

Özge PALA

1. GİRİŞ

Yaşadığımız ülke oldukça zengin bitki çeşitliliğine sahip olmasıyla dikkat çeker. Bunda etkili olan en önemli etkenler coğrafi konumu ve jeolojik yapısıdır. Aynı zamanda topoğrafik yapısı ve çeşitli iklimsel faktörlerinde etkisi vardır. Türkiye konum olarak doğuda İran- Turan, kuzeyde Avrupa-Sibirya ve güneyde Akdeniz fitocoğrafik bölgesinin birleştiği bir yerde bulunmaktadır. Bu bölgelerin özelliklerine sahip elementlerin Anadolu'ya girerek farklı popülasyonlar oluşturmaları floradaki zenginliğin başlıca nedeni olmuştur [1].

Ülkemiz endemik bitkiler bakımından da diğer ülkeler arasında yapılan sıralamada ön sıralarda yer almaktadır. Sadece ülkemize özgü olan bitkilerin sayısı oldukça fazladır. Floramızdaki zenginlik burada da kendini göstermektedir. Avrupa' da yetişen toplam 12000 bitkinin 2750' si endemikken Türkiye'de yer alan 12000 bitkinin 3000'den fazlası endemiktir [2].

Türkiye'de yetişen *Cyclamen* cinsi 10 tür 13 taksona sahiptir. Ülkemizin birçok yerinde yayılış göstermiş olmakla beraber bulunduğu alanların çoğunda endemiktir [1].

Tablo 1.1: Türkiye' deki endemik *Cyclamen* türleri.

<i>Cyclamen cilicium</i> varyete <i>intaminatum</i>	Endemik	O. ve G. Anadolu
<i>Cyclamen cilicium</i> varyete <i>cilicium</i>	Endemik	G. Anadolu
<i>Cyclamen mirabile</i>	Endemik	GB. Anadolu
<i>Cyclamen pseud-ibericum</i>	Endemik	G. Anadolu
<i>Cyclamen trochopteranthum</i>	Endemik	GB. Anadolu
<i>Cyclamen parviflorum</i>	Endemik	KD. Anadolu
<i>Cyclamen parviflorum</i> varyete <i>subalpinum</i>	Endemik	KD. Anadolu

1.1 *Primulaceae* Familyasının Morfolojik Özellikleri

Primulaceae, genellikle çok yıllık otsu bitkilerdir ancak bazıları tek yıllıktır. Basit veya bileşik salgı tüyleri, yaygındır. Çiçekleri farklı şekilde kümeler halinde büyür. Üstün bir yumurtalık ile bir tek hücreli bir pistil bulunmaktadır.

1.2 *Cyclamen* L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri

Cyclamen cinsi Primulaceae familyasına aittir. Türkiye’de yetişen *Cyclamen* cinsi 10 tür 13 taksona sahiptir. Ülkemizin birçok yerinde yayılış göstermiş olmakla beraber bulunduğu alanların çoğunda endemiktir. Yaşam alanları orman açıklıkları ve kayalık alanlardır. Çok yıllık yumrulu bitki türleridir. Tavşankulağı, buhurumeryem, mormilik ve domuzlar yediği için domuz turpu şeklinde de adlandırılır. En belirgin özelliği, kalp veya böbrek şeklindeki yapraklarıdır. Beş parçalı olan çiçekleri beyaz, pembe ya da koyu pembe renkte olabilir [3].

1.2.1 *Cyclamen* L. Cinsin Sistematikteki Yeri ve Türleri

Kingdom	<i>Plantae</i>
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classis	<i>Magnoliopsida</i>
Subclass	<i>Dilleniidae</i>
Ordo	<i>Primulales</i>
Familia	<i>Primulaceae</i>
Genus	<i>Cyclamen</i>
Species	<i>Cyclamen hederifolium</i> <i>Cyclamen graecum</i> <i>Cyclamen cilicium</i> var. <i>cilicium</i> <i>Cyclamen cilicium</i> var. <i>intaminatum</i> <i>Cyclamen mirabile</i> <i>Cyclamen repandum</i> var. <i>repandum</i> <i>Cyclamen persicum</i> <i>Cyclamen pseud-ibericum</i> <i>Cyclamen coum</i> var. <i>coum</i> <i>Cyclamen coum</i> var. <i>caucasicum</i> <i>Cyclamen trochopteranthum</i> <i>Cyclamen creticum</i> <i>Cyclamen parviflorum</i> var. <i>subalpinum</i>

1.2.2 *Cyclamen* L. Cinsi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Cyclamen L. (Primulaceae) cinsinin 21 türü vardır [3] [4] [1], parlak renkli çiçekleri olan çok yıllık yumrulu bir bitkidir. Yaygın olarak bahçelerde ve evlerde süs

bitkisi olarak yetiştirilir. Tohumlarının taşınımında karınca bağımlı olduğu için yayılışı kısıtlıdır [5]. Bu nedenle *Cyclamen* cinsi biyocoğrafik çalışma için ideal bir bitkidir.

Türler arası melezlemede, kontrollü şartlar altında, *Cyclamen* cinsi ile iyi çalışılmaktadır. Birçok türün çiftleri için melezleşmede detaylı hesaplamalar vardır [4]. Yabani hibridizasyonun nadir bir olay olduğu düşünülmektedir [6], ama kısmen simpatrik dağılımlarının birkaç örneği bildirilmiştir [5].

Cyclamen cinsine köklü bir moleküler filogeni vardır [3], şimdiye kadar hiçbir türleşme olayının zamanlamasında yaş tayin teknikleri kullanılmamıştır. Bunun için fosiller kullanılır [7]. Ne yazık ki *Cyclamen* için hiçbir fosil delili, ne makro fosiller [8] ne de eski polen bulunmamıştır [7].

Dünyanın en zengin sıklamen türüne sahip ülkelerden biri olan Türkiye, *Cyclamen hederifolium* bitkisinin gen merkezlerinden birisidir. Ülkemizde aralarında altı tanesi oldukça sınırlı yayılış gösteren toplam 10 sıklamen türü bulunmaktadır [9].

Türkiye sıklamen yumruları ihraç eden ülkeler arasında da önemli bir yere sahiptir [10], ihraç edilen yumruların tamamına yakın olan büyük bir kısmı da doğal ortamlardan bilinçsizce toplanmaktadır [11] ve bu bitkilerin nesli ülkemizde çok hızlı bir şekilde tüketilmektedir [12].

Cyclamen cinsine giren bütün türler CITES (Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora) adı verilen "Nesilleri tehlike altındaki doğal bitki ve hayvan türlerinin uluslararası ticaretini düzenleme sözleşmesi" Ek II listesinde yer almaktadır. Halen yürürlükte olan 11 Ağustos 1995 tarih ve 22371 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan "Doğal çiçek soğanlarının sökülmesi, üretimi ve ihracatına ait yönetmelik" te bu bitki ihracatı kontenjanla veya herhangi bir kayıtla sınırlandırılan doğal çiçek soğanları grubunda yer almaktadır [10].

1.2.3 *Cyclamen L.* Cinsin Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Türkiye’ de yetişen *Cyclamen* cinsleri üzerinde birçok kimyasal araştırmalar yapılmış olup yumrularında kristalin saponin, cyclamin, nerol, farnesol, antosiyanin, nişasta, zambak, kokulu maddeler ve organik asitler bulunmuştur.

Saponin: bitkilerde yaygın olarak bulunan glikozit. su ile muamele edildiklerinde köpürürler. Koruyucu koloit olarak görev görürler tatları acıdır. Cyclamin: Sıklamen bitki soğanından çıkarılan bir glikoz olarak kabul beyaz bir amorf madde. Nerol: Portakal çiçeği esansıdır. Farnesol: Bitkilerden elde edilen ve kozmetikte öncelikli olarak kokularda kullanılan bir öz. Antosiyanin: Kırmızı-mor renkli sebze ve meyvelerde ayrıca tüm mor çiçeklerde sonbaharda görülen morumsu yapraklı ağaçlarda bulunan renk verici bir maddedir. Bitki yumrularının ilginç bir kullanım alanı da tütün tarlalarında solucanlarla mücadeledir. Yumruların kaynatılmasıyla elde edilen sıvı tütün fidelerinin dibine dökülerek, toprak altındaki solucanların yüzeye çıkmasını sağlar.

1.3 Moleküler Sistemik

Bitkiler aleminde yapılan sistemik çalışmalarda taksonomik açıdan mevcut olan sorunların ortadan kaldırılmasında moleküler çalışmalara başvurulur. Türlerin morfolojik karakterlere dayanılarak yapılan taksonomik sınıflandırılması yetersiz kalarak bitkinin yaşına, fizyolojik durumuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu olumsuzlukları gidermek amacıyla bitki türlerinin tanımlanmasında moleküler verilerin kullanımı yaygınlaşmıştır [11]. Moleküler Sistemik; moleküler bilgileri içeren verilerin filogenetik ilişkileri yeniden oluşturulabilmesi için kullanılması, olarak tanımlanan çalışmalardır [12].

Yüksek yapılı bitkilerde kalıttan sorumlu genetik materyal çekirdek, mitokondri ve kloroplastta mevcuttur. Moleküler bitki sistematiği çalışmalarında hem nükleer hem de organelar genom moleküler veri kaynağı olarak kullanılabilir. Mitokondri DNA’sı oldukça değişken olduğu için yapılan çalışmalarda çok tercih edilmemektedir. Bu nedenle bitki tür düzeyindeki çalışmaların büyük çoğunluğunda nrDNA ve cpDNA kullanılarak bunların üzerinde bulunan birçok özel bölgeden

yararlanılmaktadır [13]. Bu bölgeler sayesinde elde edilen moleküler verilerle önceden bilinen ve klasik taksonomik yöntemlerle çözüme kavuşturulamayan sistematik problemler kolaylıkla ortadan kaldırılmış olur. Bu amaçla nrDNA üzerinde bulunan ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesine dayalı olarak yapılan çalışmalardır [14].

nrDNA (nükleer Ribozomal DNA)'nın ITS bölgeleri kolay çoğaltılıp dizilenebilir. Aynı şekilde polimorfizmleride kolaylıkla ortaya koyarak taksonlar arasındaki akrabalık derecelerini belirleyebilmektedir [15]. cpDNA (kloroplast DNA)'sını ise karakterize eden özellikleri yapısal olarak kararlı olması, haploit(n) olması, rekombinant olmaması ve uniparental olarak kalıtım göstermesidir. Bu özellikleri moleküler sistematik çalışmalarda cpDNA sınıfının tercih sebepleridir ve kullanımını kolaylaştırmaktadır. Kloroplast genomunun kodlama bölgeleri, kodlama yapmayan bölgelere göre daha yavaş evrimleşir. Bu yüzden cpDNA gen dizileri (rbcL, atpB, mat K ve ndhF) daha çok familya ve üzeri düzeydeki çalışmalarda kullanılmaktadır [13].

1.3.1 Markır Tipleri

1.3.1.1 Morfolojik Markırlar

Tek lokus ile idare edilen morfolojik özellikler değişik çevre koşullarında ifade edilebildiği sürece genetik markır olarak kullanılabilirler. Popülasyonların genetik yapısının belirlenmesi açısından yapılan ilk çalışmalar canlıların dış görünüşlerine bakılarak yapılmaktadır. Morfolojik özellikler sayesinde elde edilen bulgular popülasyonların ayırt edilmesinde kullanılmışsa da genotip-çevre etkileşimleri ve bir genin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi gibi durumlardan dolayı morfoloji tek başına yeterli olmamaktadır. Ayrıca genetik çeşitliliğin tamamının morfolojiye yansımaması da nedenler arasına eklenebilir. Bu yüzden morfolojik karakterlere dayalı çalışmalar, günümüzde geliştirilmiş tekniklere dayalı olarak yapılan çalışmalardan oldukça az sayıdadır [16].

1.3.1.2 Biyokimyasal Markırlar

Genlerin ürettikleri proteinlerdir. İzoenzimler farklı olarak yüklenmiş proteinlerdir. Elektroforez tekniği sayesinde oldukça basit bir biçimde ayrılabilirler. Enzimler kendilerine has biyokimyasal reaksiyonları katalizlemektedir.. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görülmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonlar ürünletini oluşturur. Ürünler renkli bir şekilde jel üzerinde bantlar oluştururlar. Bu bantlar genetik temellere sahip olarak ve kodominant markır olarak genetik bilgi sağlamaktadırlar. Bu sebeple morfolojik karakterlere göre kullanımları daha yaygındır. Ancak kullanımlarını sınırlandıran bazı durumlar vardır. Bunlar izoenzim lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması.

1.3.1.3 Moleküler Markırlar

Çevresel koşulların denk olmadığı ortamlarda yaşayan aynı organizma üzerinde oldukça sık olarak farklılıklar kaydedilmektedir. Bu farklılıklar aynı türe ait organizmaların ortam şartları sebebiyle morfoloji ve anatomilerinde meydana gelen değişimler olarak gözlemlenebilir. Morfoloji de meydana gelen çeşitlilik genetik çeşitliliğin küçük bir yüzdesini oluşturduğu gibi, genetik çeşitlilik de büyük kısmını morfolojiye yansıtılmamaktadır. Morfolojiye dayalı olarak elde edilen veriler genetik farklılıkların saptamakta kullanılsa da genetik- çevre etkileşimi, bir karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi ve bir genin birden çok karakteri etki altında tutması gibi sıkıntılı durumlardan dolayı her zaman yeterli olamamaktadır. Bu gibi sorunları çözümlenmek amaçlı aynı zamanda DNA bazındaki polimorfizmleri ortaya çıkarmak için DNA'ya bağlı olarak moleküler çalışmalar ve moleküler markırlar geliştirilmiştir [17].

Moleküler markır; spesifik bir genle birlikte kalıtılabilen bir DNA segmentidir. Tanımlanabilen bir gendir ancak genomun belli bir parçasını ifade ettiğinden markır-belirteç adı verilmiştir. Moleküler markırlar DNA zinciri üzerinde yer aldıklarından bir popülasyonda meydana gelen çeşitlilikleri saptamada %100 'e yakın güvenilirlerdir

[18]. Bu markırlara dayalı olarak yeniden düzenlenebilen filogeniler için en büyük avantaj ise DNA dizi verilerinin sınırsız sayıda karakterden oluşturulabilmesidir [19].

İdeal bir DNA Markırında Olması İstenen Özellikler

- 1) Polimorfik olmalı
- 2) Genom boyunca dağılım gösterebilmeli
- 3) Kodominant olmalı
- 4) Kolay uygulanabilir olmalı
- 5) Hızlı, basit ve ucuz bir şekilde analizlenebilmeli
- 6) Güvenilir olabilmeli
- 7) Üzerinde çalışacak materyalin küçük bir miktarı yeterli olmalı
- 8) Tekrar edilebilir olmalı
- 9) Diğer lokuslardan etkilenmemeli
- 10) Çalışacak organizmanın genomuyla ilgili ön bilgiye ihtiyaç duymamalı [20]

1.3.1.3.1 Hibridizasyon Temelli Moleküler Markırlar

1.3.1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

DNA markırları arasında ilk keşfedilen moleküler markırlardır [21]. Türler, cinsler hatta familyalar arasında transferi yapmak mümkün olduğundan oldukça avantajlıdır. Bu sayede üzerinde çalışılan türün pek çok akraba türü için haritalama bölgesinde potansiyel bir belirteç görevi görür. Güvenilir olması da ayrı bir avantaj sağlar. Farklı laboratuvarlarda çalışan araştırmacılar aynı sonuçları elde edebilirler. AFLP markırları heterozigot bireylerin karakterize edilmesine olanak sağlayan eş baskın (kodominant) özellik taşırlar.

Çalışmalarda çok miktarda saf DNA gereksinimi, sonuçlara uzun sürede ulaşılmasından kaynaklı aşırı zaman kaybı radyoaktif madde kullanımı gibi dezavantajlara sahip olmasından dolayı RFLP kullanımı çok tercih edilmemektedir [22].

1.3.1.3.2 PCR' ye Dayalı Moleküler Markırlar

PCR tekniği K. Mullis ve arkadaşları tarafından 1985 yılında keşfedilerek moleküler biyoloji de büyük bir çığır açılmıştır. DNA Polimerazında bulunmasıyla birlikte PCR dayalı pek çok moleküler markır geliştirilmiştir.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), yüksek sıcaklıkta enzimatik aktivite gösteren termostabil DNA polimerazın özel DNA bölgesine uygun olan oligonükleotid primerler kullanılarak in vitro şartlarda çoğaltması tekniğidir [23].

DNA üretimi oldukça düşük miktarlarda kalıp DNA kullanılarak bir veya birden çok DNA fragmentinin milyonlara kopyası üretilerek, otoradyografi veya boyama işlemi yapılarak gözlemlenmesidir [24].

1.3.1.3.2.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA(s)) – Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

DNA'nın iki iplikçiği üzerinde, 9-10 baz çifti uzunluğundaki rastgele primerlerin, birbirine karşıt olan iki farklı noktada tamamlayıcılarını bularak, bu aradaki bölgeyi çoğaltması esasına dayanan tekniktir [25]. Primerlerin bağlanma noktalarında bulunan mutasyon ya da dizi değişikliklerinin sonucunda amplifikasyon bantlarının varlığı ya da yokluğuna bağlı olarak polimorfizmin tespit edilmesi şeklinde işler [26] ve genom boyunca polimorfizmin ortaya çıkmasında oldukça duyarlı bir tekniktir [27].

1.3.1.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) – Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi

Zabeau ve Vos tarafından 1993'te, RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere, RFLP tekniğinin güvenilirliğine PCR tekniğinin katılmasıyla oluşturulmuş oldukça etkili ve güvenilirliği yüksek bir tekniktir. Primerleri hem diziye özgü aynı zamanda da rastgele olabilir [28]. Bu teknik yakın ilişkili genotipler arasındaki polimorfizmi bulmada oldukça kullanışlı bulunmuştur. Bir je üzerindeki çok sayıdaki

bant AFLP ile aynı anda analiz edilebilir. PCR dayalı diğer teknikler ile karşılaştırıldıklarında çok sayıda lokusu polimorfizm açısından tarayabilme özelliğine sahiptir. Tekrarlanabilirliği markırların güvenilirliği ve bir reaksiyonda çoğaltılabilen dizi sayısı açısından oldukça üstündür [29].

1.3.1.3.2.3 Minisatellitler (VNTR – Variable Number of Tandem Repeats / Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar) Mikrosatellitler (SSR – Simple Sequence Repeats / Basit Dizi Tekrarları)

Yüksek organizmalarda görevi daha tam olarak bilinemeyen fakat düzenleyici role sahip olduğu düşünülen, rastgele ardışık tekrarlanan, 2-6 nükleotit gruplarından oluşan bölgeler yer almaktadır. Bu bölgeler sahip oldukları nükleotid sayılarına göre minisatellitler ya da mikrosatellitler ismini alırlar.

(AT), (GT), (ATT), (CTT) veya (GATA) gibi nükleotitlerin n sayıdaki tekrarından meydana gelen gruplardır [18].

Mikrosatellitler; 1-6 baz çifti uzunluğa sahip, korunmuş, ko-dominant yapılı kısa tekrarlı dizilerdir. Minisatellitler; 11-60 baz çifti uzunluğu sahip kromozomların uç kısımlarında yer alan değişken sayıdaki ardışık tekrarlardan oluşan dizilerdir [30].

1.3.1.3.2.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) – Basit İç Dizi Tekrarı

ISSR işlemi RAPD' in düşük kopya sayısı ve AFLP' nin yüksek maliyeti ile ilgili sıkıntılara çözüm üretmek amacıyla geliştirilmiştir. Çoklu lokusa ait yaklaşık olarak 10-60 tane fragment aynı anda oluşturulur, jel elektroforezi ile ayırma işlemi yapılır büyüklükteki parçaların var-yok durumuna bakılır.

RAPD yöntemine göre daha güvenilir uygunlukta bir yöntemdir. Tekrarlanabilirlik durumu oldukça yüksektir. PCR kaynaklı olumsuzluklardan çok etkilenmeyen bir tekniktir [17].

1.3.1.3.2.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) – Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler

Bu yöntemin RAPD ve ISSR belirteçlerine göre özellikleri fazladır ve tekrarlanabilirlikleri yüksektir. Genellikle dominant belirteçler oluşturmasına rağmen, tek tek bantlar restriksiyon enzimleriyle kesilir ve kodominant markır haline getirebilirler [18].

Bu teknik kısa zamanda ilgili gen ile bağlantılı belirteçler elde etmek için, harita tabanlı klonlamalar da kullanılabilir uygun bir yöntemdir. Ayrıca rutin taramalar için de uygulanabilirliği yüksektir [20].

1.3.1.3.2.6 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) – Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektroforezle büyüklüklerine göre ayırt edilebilen kesilmiş DNA fragmentlerinin tespitini içeren bir moleküler markırdır.

CAPS yeni kesilip çoğaltılmış polimorfik dizileri bulma yönteminde PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilir. Kesilen parçalar elektroforez de büyüklüklerine göre ayırt edilebilir. Yöntemde kullanılan primerler cDNA veya genomik DNA klonlarından RAPD ve ISSR bantlarından elde edilebilir. Aynı zamanda RFLP markırının DNA dizilerini kullanmak için bir seçenek oluşturur. Bu yüzden PCR – RFLP olarak da adlandırılabilir [20].

1.3.1.3.2.7 ESTs (Expressed Sequence Tags) – İfade Edilen Dizi İşaretleri

EST (Expressed Sequence Tags); 150 – 400 bp uzunluğunda olan mRNA fragmentlerinin tamamı ya da belirli bir kısmına karşılık gelen cDNA klonlarının dizi analizi sonucunda meydana gelen markır tipidir. Gen bankasında sıkça başvurulur, etkinliği oldukça yüksek bir tekniktir. Aynı zamanda haritalama çalışmalarında da bu tekniğe başvurulmaktadır.

1.3.1.3.2.8 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – Tek Nükleotid Polimorfizmi

SNP 'ler DNA dizisi içerisinde oluşabilecek küçük genetik varyasyonlardır. Açıklayacak olursak bir pürin bazının A ya da G' nin diğer bir pürin bazına A ya da G' ye; bir pirimidin bazının C ya da T' nin diğer bir pirimidin bazına C ya da T' ye veya bir pürin bazının A ya da G' nin bir pirimidin bazına C ya da T' ye; bir pirimidin bazının C ya da T' nin bir pürin bazına A ya da G' ye olan baz değişimleridir. Kısaca transisyonlar ve transversiyonları içerir [17].

1.3.1.3.2.9 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) – Tek Zincir

Tek baz çiftinde farklılık meydana gelir. Bu farklılıktan dolayı, tek zincirli DNA farklı şekilde katlanır. Bu nedenle oluşan polimorfizmleri tanımlamak için kullanılır.

Bu yöntemin işleyişi basittir, hızlı sonuç verir aynı zamanda çeşitli mutasyonları taramak için yeterli hassasiyete sahiptir. RFLP ile benzer yönleri vardır. Ancak DNA polimorfizmlerini ve DNA fragmentlerinde bulunan çoklu yerlerdeki mutasyonları tarayabilme özelliğiyle RFLP yönteminden ayrılır [20].

1.3.1.3.2.10 SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) – Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm

Kullanım amacı ORF' leri çoğaltmak olan basit, güvenilir, dizileme kolaylığı sağlayan, genomda kodlama yapan bölgeleri hedefleyen oldukça kullanışlı özelliklere sahip bir tekniktir.

Harita oluşturmada, genetik çeşitlilik ve gen etiketleme çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanmıştır [20].

1.3.2 ITS (Internal Transcribed Spacers) ve nrDNA Bölgeleri

1.3.2.1 ITS Bölgesi ve Genel Özellikleri

Bitkilerde moleküler filogenetik çalışmaların büyük çoğunluğu plastid verilerinden faydalanılarak yapılmaktaydı. Bununla ilgili yapılan eleştirilerden sonra ITS dizi temelli filogenetik analizlerin popülerliği artmıştır [31].

Bitki gruplarını arazide, yaşam alanlarında tanımlarken ve taksonları sadece morfolojiye bakarak ayırt etmeye çalışmada oldukça zorlanılmaktadır. Tanımlamada kullanılan anahtarlarda kullanılan fenetik karakterler genellikle tam ayırt edici olamamaktadır. Özellikle kültüre alınan türlerle, doğada yetişen yabani tiplerin akrabalıklarının ortaya çıkmasında, türlerin teşhisinde, örnek toplarken ve bu türleri korumaya alırken tanımlama büyük ölçüde önem taşımaktadır [32].

Moleküler biyolojide meydana gelen gelişmeler sayesinde, sadece türe özgü gen bölgelerini tanımlayarak bitkinin türlerinin belirlenmesinde olanak sağlanmaktadır. rDNA 'nın sahip olduğu ITS bölgeleri, bitkilerde yapılan moleküler sistematik çalışmalarda çok kullanılan yöntemlerden biri haline gelmiştir [14].

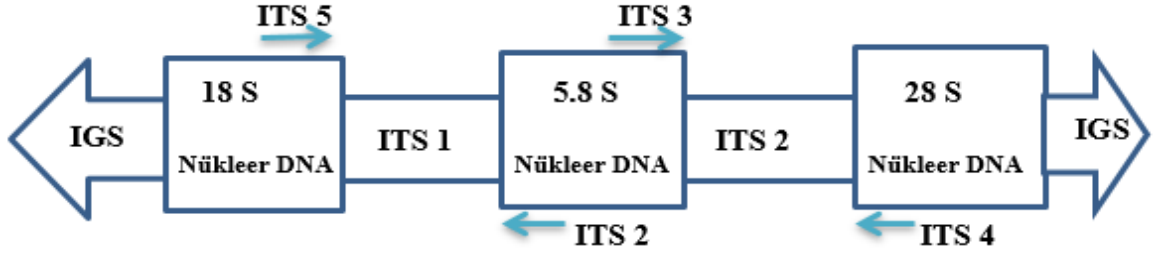
ITS (internal transcribed spacers) bölümleri cins ve tür kategorilerinde yapılacak filogenetik çalışmalarda kullanılan en güvenli yöntemdir. Seçilmesindeki en önemli faktör ribozomal DNA internal transcribed spacers (rDNA ITS) bitki sistematigi ve bitki tanımlamada sahip olduğu genomik kısımların işlerliği bakımından sıklıkla kullanılmasıdır. Avantajı ise rDNA 'nın sahip olduğu yüksek düzeydeki korumalı genler ve bu genlerin ITS bölümleri arasında bulunmasıdır.

Çoklu gen yapılarından oluşan rDNA bölgeleri, genomik DNA üzerinde yerleşik olarak bulunur ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklindedir. Ardışık sıralı olan rDNA tekrarları; genomik DNA'nın NOR (Nükleolar Organizer Region) bölgelerinde bulunurlar. 18S küçük alt birim, 5.8S ve 28S büyük alt birim olarak adlandırılan bu bölgeler rDNA 'ları kodlayan genlerden oluşurlar.

ITS bölgeleri, rDNA tekrarları içinde konumlanmıştır. Bu bölgeler, ITS1 ve ITS2 olmak üzere iki kısımdan oluşur, aynı zamanda da rDNA 'nın alt birimleriyle

transkribe edilerek 18S, 5.8S ve 28S i birbirinden ayırırlar [14]. Bu bölgeler, rDNA'ya bağlanabilmesi için dizayn edilmiş primerlerle PCR' da oldukça kolay bir şekilde elde edilebilirler.

Bu kullanım için dizayn edilmiş evrensel primerler ve bu primerlerin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1.1: ITS primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri [33].

1.3.2.2 rDNA Bölgeleri

1.3.2.1.1 Küçük Alt Birim rDNA (18S)

Küçük alt birim rDNA 'sı olan 18S bölgesi yüksek korunmaya sahiptir. Alem, şube ve sınıf kategorilerinde yapılan filogenetik çalışmalarda bu seviyelerde bulunan sıkıntıların giderilmesinde, sıralamanın yenilenmesinde kullanılmaktadır. Bugüne kadar 4000'den daha fazla takson için, bu bölgeye ait DNA baz dizisi belirlenmiştir.

Küçük alt birim rDNA baz dizilerinin kullanımı farklı taksonomik kategorilerin filogenisinde olan sıkıntıları giderip en baştan belirlemede oldukça önem taşır [34].

1.3.2.1.2 5.8S rDNA

rDNA bölgeleri arasında tekrarlı diziler içinde uzunluk açısından en kısa olanı 5.8S nükleer DNA'sıdır. Aslında rRNA büyük alt biriminin bir parçası olarak bulunur. Aynı zamanda lokus uzunluğu ile de nükleotit içeriği oldukça korunmuştur. Bu bölgeye ait baz uzunluğu, kullanılmak istenen kadar geniş bir bölgeye sahip değildir.

Yaklaşık olarak 163-164 baz çifti uzunluğundadır. Bu sebeple filogeniye yeterli miktarda veri sağlamamaktadır. Bu yüzden bu şekilde yapılan filogeni çalışmalarında tek başına kullanılmaları uygun görülmez. Bu nedenle ITS bölgeleriyle birlikte değerlendirilerek çalışmalara katkı sağlayabilirler.

1.3.2.1.3 Büyük Alt Birim rDNA (28S)

Büyük alt birim rDNA' sı küçük alt birim rDNA' sına göre daha uzundur. Uzun olan baz içeriğinde daha fazla varyasyon barındırmaktadır. Büyük alt birim rDNA' sı 28S'in oldukça farklı alt birimleri mevcuttur. Bu da önemli gen varyasyonlarının asıl sebeplerindendir. Küçük ve büyük alt birim rDNA' sı üzerinde değişebilir bölgeler veya yayılan segmentler olarak bilinen domainler bulunur. Ancak bu bölgelerde meydana gelen genişlemeler, akraba türler arasındaki farklılıkların ortaya çıkmasında kullanılacak verileri oluşturmada yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden rDNA genlerinde oluşan varyasyonlar sadece familya ve üst seviyedeki sıkıntıların çözülmesinde fayda sağlamaktadır [34].

1.3.3 DNA Dizileme

DNA dizi analizi ya da sekanslama, DNA'nın primer yapılarının belirlenmesinde ve nükleotid baz diziliminin tayininde kullanılan yöntemdir. Yapılan analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine olan hibridizasyonu ile oluşur. Bu hibridizasyon esnasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretlemeler yapılmaktadır. Genellikle gen mutasyonu olarak tanımlanan delesyon, insersiyon gibi durumların tespitinde kullanılır. Aynı zamanda rekombinant DNA oluşum yapılarının belirlenmesinde kullanılır. Kullanım alanları oldukça yaygındır. Gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri belirlemede, konsensus dizileri, epistatik genler ve etkilerini belirlemede kullanılabilirler. Preimplantasyon tanısında ve kalıtsal hastalıkların tayininde kullanımı da mevcuttur.

Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik kullanılır.

1. Maxam ve Gilbert' in kimyasal kırılma yöntemi [35]

2. Sanger-Coulson' un zincir sonlanma yöntemi [36]

Her iki teknik de üç temel basamaktan oluşmaktadır.

- DNA' nın hazırlanması
- Reaksiyonlar
- Jel elektroforezi

1.3.3.1 Maxam ve Gilbert' in DNA Kimyasal Kırılma Yöntemi (DNA Sequencing)

DNA Sequencing yöntemi çok taraflı sekanslama olarak adlandırılabilir. Yöntemin işleyişinde kimyasallar kullanılarak DNA özgül baz dizilerinden kesilerek farklı uzunluktaki fragmentlere ayrılır. Bu şekilde bir dizileme jelinden yaklaşık olarak kırk klon analizi yapılabilir. Buna rağmen çok tercih edilen bir metot değildir. Yöntemdeki çalışma şekli DNA' da bulunan bazıları tahrip etmekle başlar. Tahrip edilen bölgelerde hasar görmüş olan alanlardaki piperidin ile fosfodiester bağlarının kırılmasıyla sonlanır.

İlk olarak DNA parçası bir ucundan işaretlenir. İşaretlenen DNA dört parçaya ayrılır. Her bir örneğe bazlardan birini tahrip edecek kimyasaldan eklenir. Maxam ve Gilbert yönteminde özgül bazlar ile zincirlerin kırılmasını sağlayan kimyasallar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir [37].

Tablo 1.2: Kimyasal kırılma yönteminde kullanılan kimyasallar.

Özgül Baz	Baza Özgül Kimyasal	Bazı Ayırmada Kullanılan Kimyasal	Zincir Kırmada Kullanılan Kimyasal
G	Dimetil Sülfat	Piperidin	Piperidin
A + G	Asit	Asit	Piperidin
C + T	Hidrazin	Piperidin	Piperidin
C	Hidrazin + Baz	Piperidin	Piperidin
A > C	Baz	Piperidin	Piperidin

Pürinlerin birbirinden ayrılmasında dimetil sülfat kullanılır. Dimetil sülfat ile N7 no' lu konumdan metillenen DNA' ya bazik ortamda piperidin eklendiğinde DNA guanin bazından kırılır. Bazik ortam yerine asidik ortam tercih edilirse DNA guanin yerine adenin bazından kırılır. Pirimidin bazlarının kırılması için ise hidrazin ilaves yapılır. Hidrazin DNA' yı hem sitozin hem de timin bazından kırar. Bu iki reaksiyonu ayırmak için ise yüksek tuz derişimi (2M NaCl) ve bazik ortama ihtiyaç vardır. Yüksek tuz derişimi ile bazik ortamda, DNA sitozin bazından kırılır. Dört farklı bazı ayırmada kullanılan reaksiyonlardan elde edilen parçacıklar, yüksek voltajlı elektroforez sonunda X-ray duyarlı film ile kaplanarak otoradyograma alınır. Otoradyografik bantlar 5' – 3' yönünde en alttan en üste doğru okunarak 5' – 3' yönündeki baz dizilimi elde edilmiş olur [38].

1.3.3.2 Sanger Dizileme Yöntemi (Cycle Sequencing)

Bakteri, faj, virüs ve plasmidlerin DNA'larındaki nükleotidlerin dizilerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biri de Sanger tarafından geliştirilen ve dideoksinukleotid olarak adlandırılan tekniktir, enzimatik metot olarak da bilinir.

Sanger yöntemi, daha işlevsel ve kolay uygulanabilir bir yöntem olduğundan daha çok tercih edilmektedir. Bunun beraberinde günümüzde otomatik dizi analizi cihazları da bu yöntemi esas alarak çalışmaktadır. Çalışma prensibi için tek iplikçik kalıp DNA, dNTP, ddNTP, DNA polimeraz ve serbest OH grubu içeren bir primere ihtiyaç duyulur.

Bu yöntem 3' hidroksil gruplarının olmaması sebebiyle normal dideoksinükleotitlerin yardımıyla DNA dizisini bulmayı esas alır. Spesifik zincir terminatörleri olarak adlandırılan, polimerizasyon için gerekli olan 2,3-dideoksinükleotidler; ddATP, ddGTP, ddCTP ve ddTTP kontrollü olarak kullanılırlar. Dideoksinükleotid fosfatlar (ddNTPs) büyüyen DNA zincirine bağlandıklarında sentezi durdururlar. Çünkü bir sonraki nükleotide bağlanmak için ihtiyaç duyulan 3' hidroksil grubuna sahip değildirler bu yüzden yanda bulunan moleküllerle etkileşime girecek fosfodiester bağı kuramamaktadırlar [39].

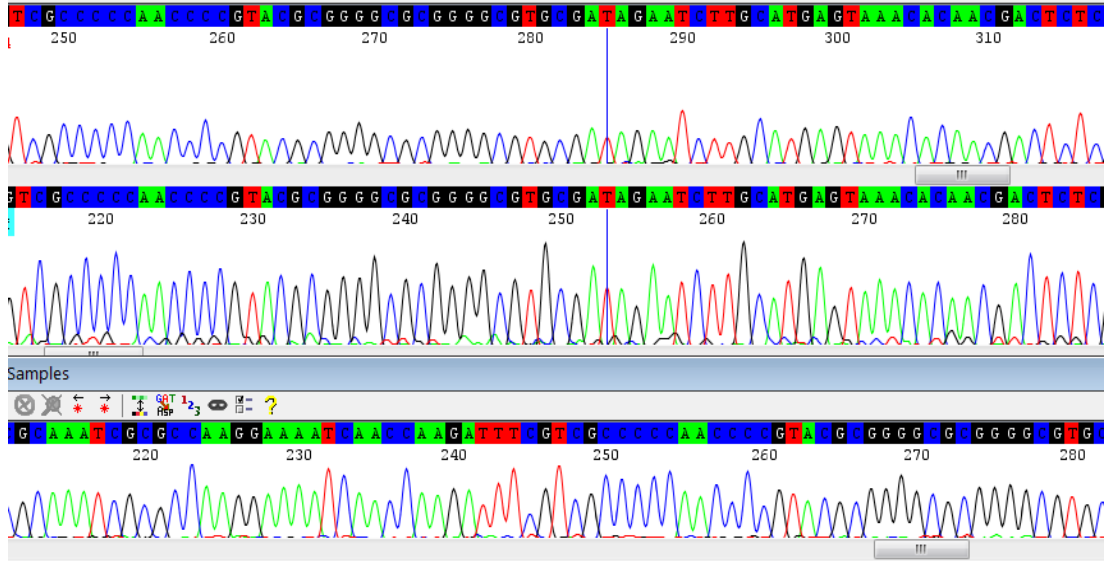
Meydana gelen ürünleri ayırıştırıp elde etmek için denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Yapılan elektroforez sonrasında poliakrilamid jel kurutularak otoradyografi yöntemi ile fotoğrafı çekilmektedir. Otoradyogramdan elde edilen görüntüde bantların en kısıdan uzuna doğru olmak üzere basamak şeklinde sıralandığı gözlemlenir. Bunlar radyoaktif izotop taşıyan tek zincirli DNA molekülleridir. İşaretleme yöntemiyle jel üzerinde belirlenen parçacıklar edilen reaksiyon karışımına eklenmiş olan ddNTP' nin tipine göre okunur.

1.3.3.3 Otomatik DNA Dizileme Yöntemi (Automated Sequencing)

İnsan Genom Projesi gibi oldukça büyük projeler çok fazla sayıda DNA dizi analizi yapmayı gerektirmektedir. Yapılacak analiz sayısı arttığında hem analiz için harcanan vakit artar hem de daha fazla iş gücü gerekir. Bu olumsuzlukların ortaya çıkması sebebiyle otomasyona geçmek mecburi bir durum haline dönüşmüştür. Otomatik DNA dizi analizleri zamandan kazancın yanı sıra, standart çalışma koşullarını üst düzeye taşımış aynı zamanda da elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde büyük fayda sağlamıştır.

Otomatik DNA dizi analizi yönteminde Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemine başvurulmuştur. Bundan tek farkı radyoaktif izotoplar yerine floresan boyaların geçmesidir. Bu yöntemde dört ayrı renkte boya kullanılır. Guanin bazı siyah, Timin bazı kırmızı, Adenin bazı yeşil ve Sitozin bazı mavi renkle gösterilmektedir. Sonuçta dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model oluşur.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarlarda yüklü olan programlar ve bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı monokromatik bir ışık oluşturur. DNA' nın bulunduğu jelmatriksi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanmış olan floresan boya, ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılmış olur. Uyarılan boya kendisi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir ve veriler bilgisayar ortamında uygun programlarla değerlendirilip sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına yansıtılır. DNA dizi analizi cihazlarıyla 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir [40].



Şekil 1.2: Dizi analizi sonucu oluşan piklerin görüntüsü.

1.3.3.4 Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı

Çoklu dizi hizalama, biyoinformatiğin gerekliliklerinden biridir. Çoklu dizi hizalama, dizi oluşturma, moleküler modelleme, veritabanı aramaları, filogenetik ağaç oluşturulması konularında temel bir araçtır. İkili dizi hizalamadan daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlar. Çoklu dizi hizalamada dinamik programlama tekniğiyle az zamanda ulaşılabilecek optimum sonuca erişmek mümkündür. Ancak mevcut olan çoklu dizi hizalama yöntemleri optimum hizalamayı bulabilmek için ancak dizi sayısı ile üssel ilişkili olacak bir zaman dilimine ihtiyaç duyarlar. Bu durumda pratikte

ihtiyaç duyulan çoklu verilerde problem çözümünü, günümüzde kullanılan hesaplama yöntemleriyle oldukça zorlaştırır hatta imkansızlaştırır.

Çoklu dizi hizalamada en çok tercih edilen yöntem aşamalı hizalama yöntemidir. Bu yöntemi kullanan araçların en yaygını CLUSTALW' dir [41]. Bu yöntemle ilk olarak elimizde bulunan dizilerin ikili benzerliklerinden faydalanılarak tahmini bir ağaç meydana getirilir. Sonrasında, bu ağacın yön gösterdiği bilgilerden faydalanılarak kademeli bir şekilde diziler hizalanır. Bulunan en büyük dezavantajları, yerel minimuma takılması, aynı zamanda da problemi uygun bir biçimde modelleyecek parametrelerin belirlenmesinin oldukça sıkıntılı olmasıdır. Çoklu dizi hizalama problemlerini çözmek için kullanılan yaklaşımlardan biride son dönemlerde oldukça yaygın bir şekilde kullanılan genetik algoritmalarıdır. Bunlardan en çok bilineni SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm)' dir [42]. SAGA ClustalW' ye yakın hizalamalar oluşturmuştur ama daha başarılı değildir.

1.3.4 Filogenetik Analiz

Organizmaların evrimsel tarihine filogeni adı verilir. Filogenetik ise türler ya da organizma grupları arasındaki genetik bağlarla evrimsel akrabalığı araştıran bilim olarak adlandırılmaktadır. Belirli morfolojik veya genetik karakterleri inceleyerek benzer olan karakterlere sahip organizmaları birbirlerine olan genetik yakınlıkların saptanmasıyla oluşan verileri ele alır. Moleküler filogenetik ise günümüzde DNA ve protein dizilerini de içeren moleküler verileri türler arası ilişkileri analiz ederek netleştirmek için kullanılır.

1.3.4.1 Filogenetik Ağaç

Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir [43]. Evrimsel ilişkileri görsel olarak ortaya çıkarmak için en uygun araç filogenetik ağaçların oluşmasıdır. Filogenetik ağaçlar, yapılan tüm dizileme çalışmalarının sonuçlarının daha net bir şekilde anlaşılması için görsel kolaylık sağlamaktadır.

Ayrıca; genler arası etkileşimi anlamada, ilaç tasarlamada, aşı çalışmaları yaparken patojen çeşitliliğini saptamada, genetik hastalıklar ve bulaşıcı hastalıkların epidemiyolojisinde, yeni bulunan gen görevlerinin tespitinde ve mikrobiyal ekoloji çalışmalarında filogenetik ağalardan faydalanılmaktadır.

Bir filogenetik ağaçtaki dallanmalar dallanma olaylarının modelini ve bazen de bu dallanmanın zamanını tanımlamaktadır. Meydana gelen türleşmelerin sırasını ve taksonların akrabalık derecelerini kaydeder.

Ağaçlar, teknik olarak bir düğüm (node) ve dallardan (branch) oluşur. Türlerin atalarının zaman içerisinde değişen durumları bu dallarla gösterilir. Düğümün karşılığı ise bir türe ait olan iki veya daha fazla popülasyona ayrıldığı noktalardır [43]. Ağaçtaki önu olmayan tek düğüm köktür. Kök ortak bir atayı temsil eder, ağacın herhangi bir yerinde bulunabilir. Köksüz ağaçlarda mevcuttur. Bunlarda ise durum ortak bir ata gösterilmeden sadece türler arası ilişkinin ön plana çıkarılması şeklindedir [43]. Filogenetik ağaçlarda düğümlerin her biri evrimsel süreçte ayrılan bir gruba karşılık gelmektedir. Ağaçtaki dış dallar taksonları ifade ederken, iç dallar ve düğümler taksonlar arasındaki ilişkiyi belirtmede kullanılır. Birbiri ile yakın ilişkili olan türler ağaç üzerinde birbirine komşu dallarda yer almaktadırlar. Ağaç dallarının ortaya çıkardığı desen topoloji olarak adlandırılır ve dalların uzunlukları da dalda meydana gelmiş değişikliklerin sayısını belirtmektedir [44].

1.3.4.1.1 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Günümüzde ağaç oluşturmada kullanılan yöntemler iki başlık altında toplanır.

A. Karakter Temelli Yöntemler

1. Maximum parsimony (MP)
2. Maximum likelihood (ML)
3. Mr. Bayes

B. Mesafe Temelli Yöntemler

1. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)
2. Neighbour Joining (NJ)

1.3.4.1.1 Karakter Temelli Yöntemler

Dizilerde birikmiş olan mutasyonların sayarak oluşturulurlar. Farklı karakterlere dayanmaktadırlar. Buradaki herbir karakter bir taksondaki canlıya ait olan moleküler diziyi belirtmektedir.

Maximum Parsimoni (MP), Farklılıkları En Aza İndirme (Tutumluluk) Yöntemi

İncelenen diziler ve genetik uzaklıklar ile uyumlu olacak bir ağaç elde etmek için saptanması gerekli olan mutasyonların en az olması gereken bir yöntemdir. Maksimum Parsimoni (MP), minimum evrimsel metod yani parsimoni=tutumluluk olarak adlandırılabilir. Evrimsel biyolojide tutumluluk, evrimsel süreçte neler olup bittiğine ilişkin sonuca ulaşırken, araştırmacının basit açıklamaları, başka bir söylemle meydana gelen evrimsel değişimin miktarını azaltan veri yorumlarını tercih etmesi demektir. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, meydana gelen evrimsel değişikliğin toplam miktarını en aza indirgemiş olan ağaçtır [45].

MP ile ağaçların oluşturulmasında “kesin” ve “olası” yaklaşımlar söz konusudur. Kesin yaklaşımda olabilecek tüm ağaçlar gözden geçirilir ve kullanılan optimalite ölçütüne en uygun ağaç belirlenir. Çok zaman alıcıdır ve yirmiden fazla örneğin varlığında kullanım için uygun değildir. Çok sayıda dizinin bulunduğu durumlarda “olası” yaklaşım uygulanmaktadır. En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak değerlendirilir. Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri **bootstrap** (seç-bağla testi) olarak tanımlanır. Bootstrap ile elde ettiğimiz ağaç dalları parsimoni kriteriyle istatistiksel açıdan en güvenilir olabilecek dalları belirlemek için kullanılır [41].

Maximum Olasılık (Maximum Likelihood-ML) En Yüksek İhtimal Yöntemi

Gözlenen veriyi oluşturmada en yüksek olasılığa sahip en iyi ağacı seçmede olasılık modellerini kullanan zor ve bir o kadar da karmaşık bir yöntemdir. Bu

yöntemin teknik açıdan nasıl işlediğini anlamak için yeteri kadar istatistik bilgisine sahip olmak gerekir. Bu yöntemde her olası ağacın topolojisi araştırılır ve dizi hizalamasında yer alan sadece bilgi verici bölgeler değil her pozisyon değerlendirilerek bir sonuca ulaşılır. İyi bir şekilde temellendirilmiş istatistiğe dayandırıldığından matematiksel olarak oldukça zahmetli bir yöntemdir. Bundan dolayı taksonların sayısı belirli bir sınırı geçtiğinde yöntemin kullanılması oldukça güçleşir, neredeyse imkânsızlaşmış olur. Bunu ortadan kaldırmak için bazı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Genetik algoritmalar ve Bayes yöntemi bunlardan birkaçıdır.

Joseph Felsenstein tarafından bulunan, 1981 yılında MP'ye karşı farklı bir alternatif oluşturan bir yöntemdir [46]. Bilgisayar program yardımıyla oluşan her ağacın topolojisi değerlendirir. Eğer ağaç doğrudur her dalın oluşturulma olasılığı toplamı, gözlenen verinin oluşturması olasılığını temsil eder. Bu olasılık ağaçların olasılığı olarak bilinir. Yarışan ağaç topolojilerinin onayı ya da reddi için kriter olasılığı en yüksek olan ağacı seçmektir, bu sonuca göre en olası ağaç en iyi ağaçtır. Ancak olasılık metotları hesaplamayı yavaştırlar. Bu yüzden çok büyük veri setleri, parsimoni yöntemleriyle olduğu kadar bu yöntemle birlikte aynı kapsamda analiz edilemezler.

Bayes Yöntemi

Filogenetikte kullanılan en öne çıkmış yöntemdir. Temelde Maximum Likelihood la oldukça benzer özellik göstermektedir. Prior olasılık kullanılarak bu metottan farklılık gösterir. Mevcut olan gözlemlere dayanılarak gözlenmeyen bir şey hakkında sonuç çıkarma temeline dayanır. Bu yöntemle ağaç seçilirken, “önceki (prior) olasılık”, analiz öncesinde ortaya çıkabilecek bütün olası ağaç topolojilerinde geçerli kılınacak olasılıktır. Ağaç oluşturulmadan ilk başta her topolojinin olasılığı eşittir. “Şarta bağlı olasılık”, dizi hizalanmasında gözlemlenen karakterlerin değişime uğrama frekansı olarak adlandırılabilir. Bu hesaplanan olasılıkların değeri, Bayes tarafından, gözleme en uygun gösterilen en olası ağacın bulunmasında kullanılır. Bu yöntem ML’ den daha hızlıdır aynı zamanda daha geniş aralıkta veri kümelerinde kullanabilmektedir.

1.3.4.1.1.2 Mesafe Temelli Yöntemler

Dizi hizalanması temeline dayanarak hesaplanır ve dizi çiftleri arasındaki farklılıkların miktarına göre adlandırılmaktadır. Dizi hizalanması sonucu hesaplanan evrimsel mesafeler, her bir takson çifti için aralarındaki mesafelerin matrisinin oluşturulmasında kullanılırlar. Matristeki bu çiftli mesafe skorları baz alınarak tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturulabilmektedir.

Bu yöntemde kullanılan algoritmalar;

- A. Kümelenme Temelli
- B. En İyi Durum (Optimum Durum) Temelli

olarak iki kola ayrılırlar.

Kümelenme Temelli Logaritmalar

Kümelenme temelli algoritmalar, birbirine en çok benzeyen dizilerin çiftlerinden başlayan mesafe matrisine dayanan bir filogenetik ağaç hesap eder. Bu algoritmalar, aritmetik ortalamayı kullanarak ağırlıklı olmayan çift grup yöntemini ve komşu birleştirme yöntemini içerirler.

Genetik uzaklık metotları ile hizalanan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dallarında ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir. Bu yöntemlerde tercih edilen ağaç, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçtır. Bu yöntemler diğerlerinden daha kolay ve hızlıdır, çok sayıda dizi için kullanılabilirler.

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) Metodu

UPGMA yönteminde tahmin edilen mesafeler, gerçek evrimsel mesafelerle tam olarak uyuşmamaktadır. Bu bilgi yöntemin yeterince başarılı olmadığını göstermektedir. Yöntem ağacın dalları boyunca değişimin sabit olduğunu söyler. Bu nedenle hesaplamaları yaparken ağacın kökünde ortak ata olarak hesaba katar. Avantajları immünolojik hibridizasyon gibi indirekt ölçümü olan uzaklıklarda kullanılabilir. En hızlı metotlardandır. Bu yüzden çok geniş data setlerini oldukça çabuk bir şekilde analiz etmektedir. Dezavantajı ise benzerlik ve aralarındaki ilişkileri aynı karakterde kullanmak mümkün değildir. Benzerliğe göre sıralama yapılmaz, evrimsel ağacın verilisinde kullanılmazlar, karakter analizinde kullanılamazlar.

NJ (Neighbour Joining) Metodu

Belirli bir grup içindeki her bir ikilinin karşılaştırılmasıyla elde edilen aradaki farkı kullanarak ilgili grubun ağacını oluşturmada kullanılan yöntemdir. En az fark içeren ikililer “komşu(neighbours)” olarak isimlendirilir. Amaç komşuları doğru bir şekilde yerleştirip elde edilen veriyi yansıtarak dal uzunluklarını belirlemek ve o veriye göre ağaç elde etmektir. Aralarındaki genetik uzaklık en az olan türleri birleştirilerek bir ağaç meydana getirir.

Neighbour Joining Yöntemi ‘nde kümelenme temelli algoritmanın varsaydığı gibi taksonlar kökten eşit uzaklıkta kabul edilmez. Bu yöntem ile sadece bir tane ağaç oluşturulur ve diğer olası ağaç topolojileri test edilmez. Bu sorunun giderilmesi için genellenirilmiş komşu birleştirme yöntemi geliştirilmiştir. Ağacın dalları boyunca değişiklik hızının farklı olabileceğini kabul eder. Bu nedenle ağacın kökünü hesaplamaz. MEGA yazılımı kullanılabilir

Avantajları çok verimlidir. Geniş veri kümelerini analiz edebilir. Dezavantajı ise tüm olası topolojileri inceleyemez.

En İyi Durum Temelli Logaritmalar

Çok fazla farklı ağacın topolojisini (pek çok noktadan ve dallardan oluşan bir ağ yapısı) karşılaştırarak ağacın önceden tahmin edilebilen mesafeler ile gerçek evrimsel mesafeleri arasındaki en iyi uyumu göstereni seçmeyi sağlayan logaritmalardır.

1.3.4.1.2 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Programlar

Filogenetik alanında çalışmalar yapanlar, bu alanda program geliştirmek üzerine yoğunlaşanlar genelde çalışmalarında MAC in işletim sistemini kullanmaktadırlar. Programların diğer işletim sistemlerine uygun versiyonları bulunsa da MAC için yazılanlar daha ileri ve üst sürümlerdir.

Filogenetik ağaçları oluşturmada en yaygın kullanılan programlar PAUP, PHYLIP ve MRBAYES’ dir. Ancak bu programların önerdikleri ağaçları bilgisayarda görüntülenmesini sağlayan başka bir program daha vardır. Bu program Treeview programıdır [47].

1.3.4.1.2.1 PAUP* (*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods / Parsimoni ve Diğer Metotlar Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz)

Populasyon verilerini detaylı araştırmak için yardımcı programdır [48].

PAUP 4.0b10' un sahip olduğu bazı özellikler;

- Parsimoni yöntemine ek olarak Maksimum Olasılık yöntemi ve en iyi durum temelli yöntemlere dayanarak filogenetik ağaçların araştırılmasına tam destek sağlar.
- Belirli ağaçlar üzerinde veya ağaç oluşturulması sırasında, Maksimum Olasılık modeli parametrelerinin otomatik olarak önceden tahmin edilmesini sağlar.
- En genel geri dönüşebilir model ve onun alt modellerini de içeren geniş bir DNA değişim modelleri yelpazesi içerir.
- Adım adım ekleme, dal değiştirme, komşu birleştirme, quartet-puzzling, Yıldız bozulma ve UPGMA ağaç araştırma algoritmaları mevcuttur.
- Birbirine uyumlu evrimsel ilişkilere sahip olan bir gruptaki tüm ağaçlar için en geniş taksonlar alt kümesini gösteren uyuşma alt ağaçlarını hesaplar.
- Ön yüklemeye ek olarak, bütün en iyilik ölçütleri (optimality criteria) altında Jackknife yeniden örnekleme analizi yapabilir.
- Ağaçlar arasındaki belirli farklılıkların saptanabileceği parametrik ve non-parametrik testler vardır.
- Henüz oluşturulmamış ağaçların oluşturulup yayınlanması. Yeni ağaçların oluşturulması sırasında benzer sayfalar arasında aynı anda taramaların yapılabilmesine olanak sağlar.
- Goloboff' un örtük ağırlık cimrilik kriteri altında ağaç taraması ve değerlendirilmesi yapar.
- Maksimum olasılıkların (maximum likelihood) kullanımıyla atasal nükleotidlerin tahminini yapar.

1.3.4.1.2.2 Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny)

Filogeninin, Bayes Metodu ile tahmini için kullanılan bir programdır. Amaç tek bir doğru filogeniyi bulmayı değil, bütün muhtemel filogenilerin sonraki olasılık dağılımlarını hesaplamaktır [49].

Programın bazı özellikleri:

- ◆ Nükleotit, aminoasit, restriksiyon bölgesi, morfolojik bilgi analizi
- ◆ Tek bir analizde bilgi türlerini karıştırma
- ◆ Bilgi bölmeleri arasındaki parametreleri gösterme
- ◆ Evolusyon modelleri bakımından zenginlik
- ◆ Tamamen hiyerarşik olarak Bayes çerçevesi içinde pozitif olarak seçilmiş bölgelerin hesaplanması

1.3.4.1.2.3 PHYLIP (The Phylogeny Inference Package)

Filogenetik haritaların (evrimsel soyağaçlarının) çıkarılması için internet üzerinde bedava olarak ulaşılabilen bir programlar paketidir. Pakette kullanılabilen metotlar parsimony, uzaklık matrisi, çöz-bağla işlevi (bootstrapping) ve ortak karar (consensus) ağaçlarını kapsayan olasılık metotlarını içerir [50]. PHYLIP büyük olasılıkla en geniş şekilde dağılmış filogeni paketidir. PAUP ve Mr. Bayes' ten sonra üçüncü en çok kullanılan filogenetik paketidir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Bitki Örneklerinin Toplanması

Taze bitki materyalleri arazi çalışmaları ile temin edilmiştir. Temin edilen bitki materyalleri silika jel içerisinde DNA izolasyonu yapılmaya kadar muhafaza edilmiştir. Toplanan bitki örnekleri çiçek açma dönemleri olan 3-5. aylar ve 9-11. aylar arasında temin edilmiştir. Arazi ile temin edilemeyen bitkiler yerine farklı üniversitelerin herbaryumlarından alınan örnekler kullanılmıştır.

Türkiye’de yayılış gösteren *Cyclamen* L. cinsine ait taksonlar aşağıda belirtilmiştir. Endemik olan türler yanlarına (E) yazılarak belirtilmiştir. Kullanılan bitki türlerinin lokaliteleri bulgular kısmında Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Cyclamen hederifolium

Cyclamen graecum

Cyclamen cilicium var. *cilicium* (E)

Cyclamen cilicium var. *intaminatum* (E)

Cyclamen mirabile (E)

Cyclamen repandum var. *repandum*

Cyclamen persicum

Cyclamen pseud-ibericum (E)

Cyclamen coum var. *coum*

Cyclamen coum var. *caucasicum*

Cyclamen trochopteranthum (E)

Cyclamen creticum

Cyclamen parviflorum var. *subalpinum* (E)

2.1.2 Kullanılan Cam ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Kullanılan pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, çözeltiler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121°C de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

2.1.3 Kullanılan Kimyasallar

DNA izolasyonu için kullanılan fenol-kloroform ve etanol Merck'ten, tris, üre, izopropil alkol ve EDTA solüsyonlarıyla PCR reaksiyonlarında kullanılan dNTP mix, 10X tampon, Taq DNA polimeraz ve MgCl₂ Fermantas'tan; borik asit, jel elektroforezinde kullanılan Agaroz Biomax'tan, etidyum bromid Appllichem'den, yükleme boyası ve DNA büyüklük belirleyici Fermantas' tan yerli kuruluşlar aracılığıyla temin edilmiştir.

2.1.3.1 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

2.1.3.1.1 Fenol- Kloroform- İzooamilalkol Metoduyla Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan bitki materyallerinin genomik DNA' sı (gDNA) Dellaporta ve arkadaşları [51] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle izole edilmiştir. İzolasyon için kullanılan tüm kimyasallar Tablo 2.1' de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri.

Çözeltiler	Kompozisyonları
Ekstraksiyon tamponu (1 L)	33.6 gr. Üre 0.5 M EDTA (pH 8) 1 M Tris-HCl (pH 8) 5 M NaCl % 10 SDS
Fenol / Kloroform / İzooamil alkol	25: 24: 1
NaAc 3 M	(pH 5.2)
İzopropil alkol	% 100
TE	10 mM
RNaz A	10 mg / mL
EtOH	% 70 ve % 100

2.1.3.1.2 Kit ile Yapılan İzolasyonda Kullanılan Kimyasallar

Bitki materyallerinin özellikle herbaryum örneklerinin gDNA' sı için SIGMA G2N70 Plant Genomic DNA Miniprep Kit Kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kit ile gelen hazır solüsyonlar; Lysis Solution Part A, Lysis Solution Part B, Precipitation Solution, Binding Solution, Column Preparation Solution, Wash Solution, Elution Solution

2.1.3.1.3 PCR' da Kullanılan Kimyasallar

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (IDT A.B.D.) firmasından temin edildi. Primerler laboratuara gelir gelmez veya -20°C buzdolabından çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 sn 12.000 rpm' de santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve 1 ml dH₂O içerisinde çözülerek

stok hazırlandı. Her bir primerin son konsantrasyonu 5 nmol/ml (5 µM) olacak şekilde sulandırıldı.

Tablo 2.2: PCR’ de (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanılan kimyasallar.

Kimyasalın Adı	Miktarı	Konsantrasyonu
dH ₂ O	9 µl	-
Tampon	2.5 µl	10 X
DMSO	2.5 µl	-
ITS4B	2.5 µl	pmol / ml
ITS5A	2.5 µl	pmol / ml
MgCl ₂	1.5 µl	25 mM
dNTP	2 µl	10 mM
Taq DNA Polimeraz	0.5 µl	5 ünite
gDNA	2 µl	-
Toplam	25 µl	

New England BioLabs Inc. firmasından temin edilen OneTaq Quick – Load 2X Master Mix ile de PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

Tablo 2.3: Master Mix ile PCR’da kullanılan kimyasal.

Kimyasalın Adı	Miktarı	Konsantrasyonu
gDNA	1 µl	-
ITS4B	1 µl	pmol / ml
ITS5A	1 µl	pmol / ml
Master Mix	12.5 µl	2X
dH ₂ O	9.5 µl	-
Toplam	25 µl	

Tablo 2.4: PCR’de kullanılan primerler

	Primer	Nükleotid Dizisi (5’- 3’)	Tm Değeri	Dizaynı Yapan
Forward	ITS 5A	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49.9 °C	Kenneth J. Wurdack tarafından (Alice M. Stanford, 2000) [120]
Reverse	ITS 4	CCTTATCATTAGAGGAAGGAG	52.1 °C	Bruce G. Baldwin, 1992- White et al.,1990[120]

2.1.3.1.4 Agaroz Jel – Elektroforez Tamponları

Agaroz jel elektroforezi için 0.5X’lik TBE kullanılmaktadır. Bunun için hazırlanan 5X TBE seyreltilir.

Tablo 2.5: 5X TBE tamponu hazırlama.

Tris – Base	54 g
Borik Asit	27.5 g
0.5 M EDTA	20ml
Saf su	1 L’ ye tamamlanır

2.2 Yöntem

2.2.1 Bitkilerden Genomik DNA İzolasyonu

Kullanılan bitki materyallerinin bir kısmının gDNA’sı Dellaporta ve arkadaşları [51] tarafından geliştirmiş ve modifiye edilmiş yöntemle izole edilirken, diğer kısmı ise Sigma ticari kitinin protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

2.2.1.1 Fenol- Kloroform- İzoamil Alkol Protokolü

Fenol- Kloroform- İzoamil Alkol ile DNA izolasyonu yapılırken silika jel içerisinde bulunan taze bitki örneklerinden 100 mg tartılarak porselen havan içerisinde alınır. Havana sıvı azot ilave edilir ve yapraklar toz haline getirilene kadar ezilir.

Toz haline getirilmiş olan bitkiler eppendorf tüpüne aktarılır. Tüp içerisinde 600 µL izolasyon (ekstraksiyon) tamponu eklenir, tüp 5 dk alt-üst edilir sonrasında vortekslenerek karışımın homojen dağılımı sağlanır.

Üzerine 500 µL fenol-kloroformizoamilalkol eklenir ve 5 dk daha tüp alt-üst edilerek karışımın homojen olması sağlanır.

Bunun ardından 12000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak çökelti oluşturulur. Dibe çöken kısım proteinlerdir, DNA üst kısımda yer alır.

Üstte kalan 500 µL'lik süpernatant temiz bir tüpe aktarılır. Pellet atılır.

Süpernatantın hacminin %10'u kadar yani 50 µL 3M'lık Sodyum Asetat (NaAc: ph 5.2) eklenir ve alt-üst edilir.

Süpernatant hacmi kadar yani 500 µL'lik izopropanol eklenerek yavaş bir şekilde pipetaj yapılır bu sırada DNA kompleksini çıplak gözle görmek mümkündür.

2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapılarak DNA çöktürülür.

Üstteki çözelti atılır dipte kalan pelletle izolasyona devam edilir.

Pellete 500 µL TE (10 mM, ph 8) eklenir ve pipetaj yapılarak çözülmesi sağlanır.

Çözeltiye 5 µL RNaz A (10 mg/ml) eklenerek pipetaj yardımıyla yağsı tabaka homejen hale getirilir.

30 dk 37°C'de inkübasyona bırakılarak RNA'nın DNA'dan ayrılarak ortamdan uzaklaşması sağlanır.

50 µL NaAc (3M) eklenerek tüp alt-üst edilir.

1 mL %90'lık ETOH eklenir ardından tüp tekrar alt-üst edilir ve -80°C'de 10 dk beklemeye bırakılır.

Daha sonra 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlanır. Üstteki süpernatant kısım çöpe atılır ve altta pellet kısım kaldı.

Kalan pellet %70'lik ETOH ile pipetaj yapılarak yıkanır.

2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapılır ve oluşan çökeltiden etanol pipet yardımıyla pellete dokunmadan dikkatlice uzaklaştırılır.

20-30 sn 12000 rpm'de son bir santrifüj yapılır ve ependorf tüpler kâğıt üzerine yan yatırılarak kalan etanol kalıntılarının uçması sağlanır.

Oluşan gDNA çökeltisi, 50 µL TE veya 200 µL saf su eklenerek pellet kaybolup homojen bir çözelti elde edilene kadar pipetaj yapılır.

Tüm bu işlemlerin sonunda bitki gDNA'sı izole edilmiş olur [51].

2.2.1.2 Kit ile Yapılan DNA İzolasyonunun Protokolü

Bitki materyallerinden 100 mg alınır ve porselen havan içerisinde eklenen sıvı azot yardımıyla toz haline getirilir.

350 µL Lysis Solution (Part A) ve 50 µL Lysis Solution (Part B) eklenir.

Vorteks yapılır ve 4µl RNaz eklenerek pipetaj yapılır.

65°C'deki sıcak su banyosu içerisinde 10 dk yüzdürülür.

130 µL Precipitation Solution eklenerek 5 dk buzda bekletilir.

5 dk maksimum hızda 16000 g'de santrifüj yapılır.

Üstte kalan sıvı kısım alınarak mavi filtreli tüpe aktarılır. Kalan çökelti tüpüyle beraber çöpe atılır.

Mavi filtreli tüp 1 dk maksimum hızda santrifüj edilir. Daha sonra kolon atılır, elimizde ependorf tüp kalır.

Üzerine 700 µL Binding Solution eklenir ve toplamda 1000 µL'lik bir karışım elde edilmiş olur.

<Bu basamaklardan bağımsız olarak kırmızı kolonlu tüpler hazırlanması için kullanılacak her bir kırmızı kolonlu tüpe 500 µL'lik Column Preparation Solution eklenerek 1 dk'lık 12000 g'de santrifüj yapılır.>

Sıvı atılır ve kolon önceki basamaktaki 1000 µL'lik sıvının geçirilmesi için hazır hale gelmiş olur.

1000 µL'lik karışımın 700 µL'lik kısmı kırmızı kolonlu tüpe aktarılır ve 16000 g' de 1 dk santrifüj yapılır.

Sıvı çöpe atılır ve kırmızı kolon tüpe yeniden konarak kalan 300 µl'lik kısım da kolondan geçirilerek maksimum hızda 1 dk'lık santrifüj yapılır.

Sıvı ve tüp atılır.

Kolon yıkanması için yeni bir tüpe konarak 500 µL Wash Solution eklenir. Maksimum hızda 1 dk santrifüj yapılır. Sıvı kısım atılır tüp kalır.

500 µL Wash Solution eklenerek maksimum hızda 3 dk daha santrifüj yapılır. Sıvı kısım yine kolona temas ettirilmeden atılır.

Yeni 2ml'lik tüp çıkarıldı ve içerisine kolon yerleştirildi.

İçerisine 100µl Elution Solution eklenir. Maksimum hızda 1dk santrifüj yapılarak kolon sıvıya temas ettirilmeden çıkarılır ve böylelikle 1. Solüsyon hazır hale gelmiş olur.

Yeni 2 ml' lik tüp hazırlanır ve kolon bu tüpe yerleştirilir.

100 µl Elution Solution kullanmadan önce 65°C'de ısıtılır sonrasında eklenir. Yaptığımız işin devamında maksimum hızda 1 dk santrifüj yapılır.

Kolon sıvıya temas ettirilmeden çıkarılır ve atılır.

Böylelikle izole edilmiş DNA mızın 2. tüpüde hazırlanmış olur.

2.2.2 DNA Saflık Tayini

DNA' nın sıvı solüsyonlar içerisinde, ultraviyole ışığın altında sahip oldukları absorpsiyon (optik yoğunluk, OD) üzerinden doğrudan ölçülebilir. Örnek eğer safsa yani protein, fenol gibi kontaminantları çok düşük miktarlarda ise, nükleotid bazları tarafından absorbe olan ultraviyole radyasyonun miktarını spektrofotometrik olarak basit ve doğru bir biçimde ölçebiliriz. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilebilmektedir. Nükleik asitlerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu A260 olarak ölçülür. Proteinlerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu ise A280'dir. Karbonhidratlar, peptitler, fenoller veya aromatik bileşikler gibi maddelerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu da A230'dur.

A260/A280 oranı nükleik asitlerin saflığı için kullanılır. Bu oran saf bir DNA için 1.7 ile 2 arasında olmalıdır. İzole ettiğimiz DNA'ların saflığı bu değerler arasında çıkmıştır. İzole edilen gDNA'ların absorbans değerlerinin ölçümü quartz küvetlerle yapılmıştır.

Küvetteki ilk kuyu kör (boş örnek) seçilmiştir ve buraya sadece 200µl saf su konulmuştur. Küvetteki diğer kuyuların hepsine 5µl DNA, 195µl saf su konulmuştur. Daha sonra DNA'nın spektrofotometrede A260 ve A280 değerleri ölçülmüştür [52].

Çift zincirli DNA molekülünün miktar tayini spektrometrik sonuçlara göre, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Formüldeki seyreltme katsayısı 40 olarak hesaplanmıştır. 5µl DNA ve 195µl su konulmuştur, yani DNA 40 kat kadar seyreltilmiştir.

$$\text{DNA Konsantrasyonu}(\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{Absorbans değeri (A260)} \times \text{Seyreltme Katsayısı} \times 50\text{ng}/\mu\text{l} \quad (2.1)$$

2.2.3 PCR Yapılışı

İzole edilen genomik DNA'ların ITS bölgeleri için primerler yardımıyla PCR yapılmıştır [53].

Tablo 2.6: Kullanılan PCR programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	4dk	1 döngü
Denatürasyon	94°C	30sn	35 döngü
Primer Bağlanma (Annealing)	50°C	1dk	
Uzatma (Extension)	72°C	1dk	
Son Uzatma (Final Extension)	72°C	7dk	1 döngü
Son Sıcaklık (Final Hold)	4°C	1sa50dk	

2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrasında meydana gelen bantları agaroz jel üzerinde gözlemleyebiliriz. Bunun için %0,8'lik agaroz jel yapıldı. 0,8 g agaroz tartılarak 100 mL 0,5 X TBE tamponu ile bir erlenmayer içerisinde karıştırılarak mikrodalga fırında kaynatarak çözünmesi sağlandı. Karışım 50°C'ye soğutularak çeker ocak içerisinde 1 µL EtBr ilave edildi. Jel kasetine taraklar yerleştirildi ve jel dökülerek polimerleşmesi için 15 dk kadar beklendi.

Jel polimerleştikten sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılarak jele zarar vermeden kasetten çıkarıldı. Uygun bir şekilde tanka yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar 0.5X TBE tamponu eklendi.

PCR örneğinin uzunluğunu belirleyebilmek için 5 µl DNA büyüklük belirleyici (1 kb DNA ladder) en baştaki boş kuyucuğa yüklendi. 3 µl PCR ürünü, 3 µl yükleme boyası (6X DNA loading dye) ile boyanarak pipet yardımıyla kuyucuklara yüklenerek jel üzerinde dizilir.

Örnekler 120 voltta 30 dk karar yürütüldü. Yürütülme işlemi bittikten sonra jel görüntüleme cihazına alınarak UV ışık altında oluşan bantlar görüldü ve jel görüntüleme cihazının programı vasıtasıyla görüntünün fotoğrafları çekilerek veriler kayıt altına alındı.

2.2.5 Dizileme ve Dizi Analizi

PCR' ı yapılarak çoğaltılmış olan örneklerin DNA dizilerini tespit etmek amaçlı ürünler dizilemeye gönderilerek hizmet alımı yapılmıştır. Dizilerin bir kısmı REFGEN, bir kısmı LabBiotek firmasına gönderilmiştir.

Gelen diziler bu iş için kullanılan bir bilgisayar programı olan CodonCode Aligner dan faydalanıldı. Programlarda kontiglerin (contig) durumlarına bakılarak DNA dizilerinin eksik kısımları görsel olarak işlendi ve bu sayede konsensus dizileri çıkarılmış oldu. Oluşturulan konsensus dizileri Word' e kopyalanarak dizi hizalamasına uygun hale getirildi.

Dizilerin hizalanmasında internetle ücretsiz olarak kullanılan ClustalW kullanıldı. Word'e kopyalanmış diziler ClustalW programına yapıştırılarak dizilerin hizalaması yapıldı.

2.2.6 Filogenetik Analiz

Cyclamen cinsine ait türlerin akrabalık derecelerini öğrenebilmek için dizileri elde edilmiş olan verilerle dünyada oldukça yaygın kullanımı olan PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0b10 programının uygun parametreleri yardımıyla filogenetik analiz kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

Çalışmada kullanılan *Cyclamen* L. Cinsine ait örneklerin bir kısmı arazi çalışmalarında toplanarak bir kısmı çiçeklenme döneminde yakalanamadığından herbaryumlardan alınmıştır. Dış grup olarak kullanılan *Primula veris*, *Primula farinosa*, *Primula verticillata* gen bankasından elde edilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan bitki materyalleri ve lokaliteleri

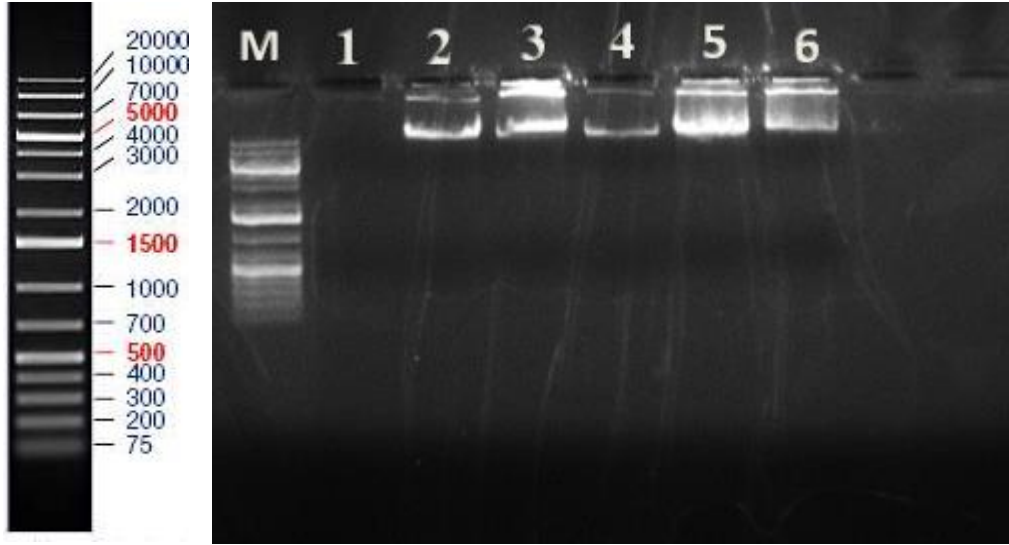
No	Taksonlar	Lokalite Bilgisi
1	<i>Cyclamen hederifolium</i>	Istanbul: Büyükdere; Sıpye Dağı üzeri Manisa; Samsun Dağı üzeri Güzelçamlı, 800 m; Mugla Marmaris'ten Emecik'e giderken 5 m
2	<i>Cyclamen graecum</i>	Mugla: Fethiye, 100 m.; Antalya Kemer yanında, İçel: Liman Kalesi, Silifke Taşucu burnuna karşı
3	<i>Cyclamen cilicium</i> var. <i>cilicium</i>	Antalya: Akseki, 1500 m, Erenkaya 700 m; Isparta/Konya: Yesildag, Beysehir, 1035 m; İçel: Gülek Boğazı, Fındık Pınarı, Mersin yukarisında 1200 m; Adana: Adana'dan Karsanti'ya giderken Hasandede 900 m; Bursa: Ulu Dağ inegöl ve Tavşanlı arasında; Eskisehir: 53 km de Kütahya'dan Çukurhisar'a 1000 m
4	<i>Cyclamen cilicium</i> var. <i>intaminatum</i>	Antalya: Akseki; Adana: Bürücek
5	<i>Cyclamen mirabile</i>	Aydın: Çine Barajı Karşısı, 400 m
6	<i>Cyclamen repandum</i> var. <i>repandum</i>	Izmir: Smyrna, 1859, Kotschy Suppl. 372; C5 Adana: Misis, O. Schwarz; C6 Hatay: Belen, Hausskn.
7	<i>Cyclamen persicum</i>	B1 Izmir: Çesme, 10-50 m, D. 41814! CI Izmir: Kusadasi, 13 vi 1966, Pankhurs! C4 Antalya: Alanya burnu, 100 m, D. 25849! C6 Hatay: Iskenderun. Sint. 1888:70! Antakya, St. Peter's Kilisesi yakınında Davidson
8	<i>Cyclamen pseud-ibericum</i>	Izmir: Smyrna, 1859, Kotschy Suppl. 372; C5 Adana: Misis, O. Schwarz; C6 Hatay: Belen, Hausskn
9	<i>Cyclamen coum</i> var. <i>coum</i>	Istanbul: Belgrad Ormanı, Kirazlı yakınında A2(A) Istanbul: 5 km from Yalova, A. & T. Baytop (STE 10664)! Alem Da., A3 Bolu: Gerede, 1000-1200 m, D. 26288! A4 Kastamonu: Gökgöl, Ihsaniye yakınında, Lazi 173! A5 Amasya: Merzifon, Maniss. 304! A6 Ordu: Ünye, Gukhard TU R/6/59! A7 Trabzon: Maçka, 300 m, Stainton 8121! A8 Trabzon: 107 km S.E. Trabzon, 920 m, Grey-Wilson & Hewer 20! B2 Bursa: Keysikler, B. Post! CI Mugla: Aziziye yakınında, 11 iv 1882, Luschan, C3 Antalya: Finike, Gleisberg 66. Adana: d. Bahçe, Düldül Dağı, 1300 m, D. 26110! Hatay: Hasan Beyli Osmanliye'ye, 455-610 m
10	<i>Cyclamen coum</i> var. <i>caucasicum</i>	N. Anatolia. A5 Corum: Corum, 850 m, Tobey 2499! A7.Trabzon: Maçka, 300 m, Stainton 8121! A8 Çoruh: d. Murgul, Damar-Tiryal Da., 1350 m, Düzenli 6820
11	<i>Cyclamen trochopteranthum</i>	C2 Mugla: Telmessus, 914 m, Davidson 8! Marmaris Emecik, 350 m, D. 25368! d. Fethiye, Eren Da. (Girdey Da.) 1300 m, D. 25579! Denizli: Çukurköy yakınında, 1200 m
12	<i>Cyclamen creticum</i>	Antalya: Akseki, 1500 m, Antalya Kemer yanında

Tablo 3.1' in Devamı

13	<i>Cyclamen parviflorum var. subalpinum</i>	A7 Trabzon: Zigana geçidi, 1200-2300 m, Furse & Synge 814! Guichard TUR/96/62! Mathew & Tomlinson 4341! Zigana Dağı, Sint. 1890:2098! A8 Gümüsane: Karakapan, 2300 m Balls 348! Rize: İkizdere, 1200 m
14	<i>Primula veriş</i>	GenBank: KM198347.1
15	<i>Primula farinosa</i>	GenBank: EF218170.1
16	<i>Primula verticillata</i>	GenBank: HM629103.1

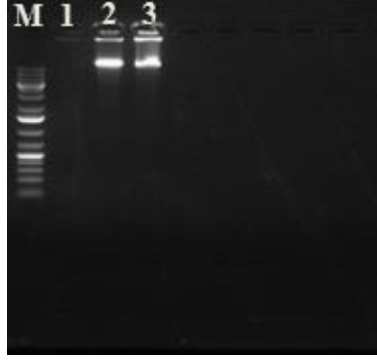
3.2 DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan bitki örneklerinin genomik DNA' ları Fenol-Kloroform ve Sigma ticari kitinin prosedürlerine uygun olarak elde edilmiştir.



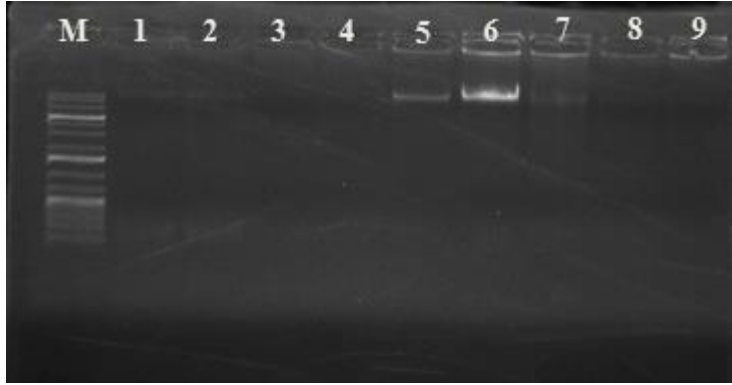
Şekil 3.1: İzole edilen bazı *Cyclamen* türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü

M-Markır (1 kb), 1-*Cyclamen creticum*, 2-*Cyclamen hederifolium*, 3-*Cyclamen mirabile*, 4-*Cyclamen coum var. coum*, 5-*Cyclamen graecum*, 6-*Cyclamen trochopteranthum*



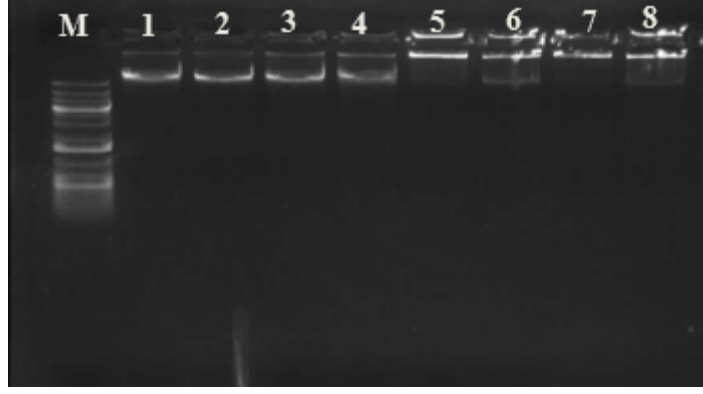
Şekil 3.2: İzole edilen bazı *Cyclamen* türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü

M-Markır (1 kb), 1-*Cyclamen cilicium* var. *cilicium*, 2- *Cyclamen cilicium* var. *intaminatum*, 3-*Cyclamen mirabile*



Şekil 3.3: İzole edilen bazı *Cyclamen* türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü.

M-Markır (1 kb), 1-*Cyclamen graecum*, 2- *Cyclamen cilicium* var. *cilicium*, 3- *Cyclamen trochopteranthum*, 4-*Cyclamen coum* var. *coum*, 5-*Cyclamen repandum* var. *repandum*, 6-*Cyclamen* var. *intaminatum*, 7-*Cyclamen coum* var. *caucasicum* 8- *Cyclamen persicum*, 8- *Cyclamen pseud-ibericum*, 9- *Cyclamen parviflorum* var. *subalpinum*



Şekil 3.4: İzole edilen bazı Cyclamen türlerini izolasyon sonrasında gDNA'larının agaroz jel görüntüsü.

M-Markır (1 kb), 1-*Cyclamen creticum*, 2-*Cyclamen hederifolium*, 3-*Cyclamen mirabile*, 4-*Cyclamen coum* var. *coum*, 5-*Cyclamen graecum*, 6-*Cyclamen trochopteranthum*, 7-*Cyclamen süs bitkisi*, 8-*Cyclamen coum* var. *caucasicum*

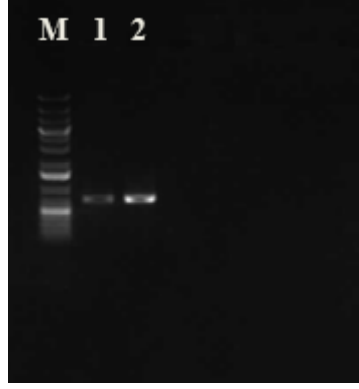
3.3 PCR

İzole edilen gDNA'larının; ITS4B ve ITS5A primerleriyle ve gerekli **Tablo 2.2** ve **Tablo 2.3** 'deki kimyasallar kullanılarak PCR reaksiyonları yapıldı. PCR yardımıyla taksonların gDNA'larının istenen ITS bölgesi çoğaltılmış oldu.



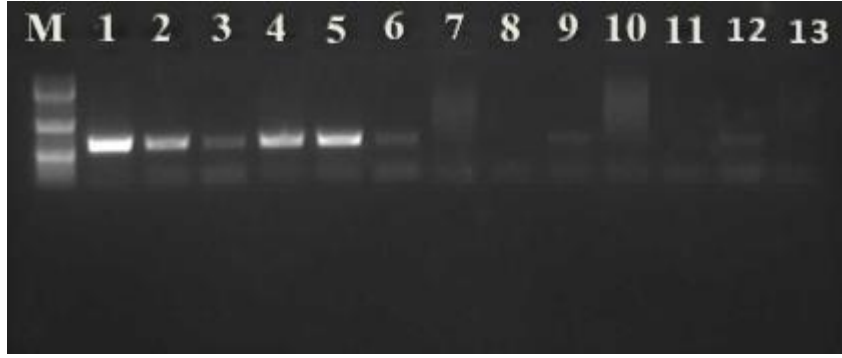
Şekil 3.5: PCR sonucunda bazı *Cyclamen* türlerinin bantları.

M-Markır, 1-*Cyclamen hederifolium*, 2-*Cyclamen mirabile*, 3-*Cyclamen graecum*, 4-*Cyclamen cilicium* var. *cilicium*



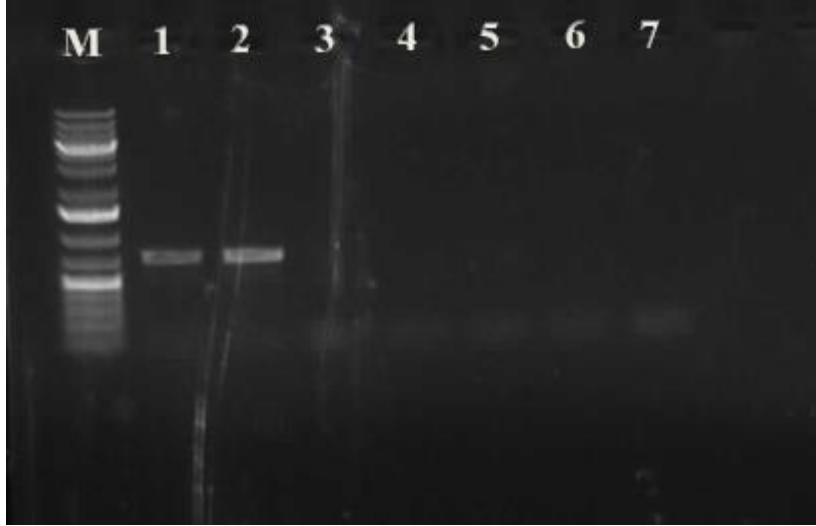
Şekil 3.6: PCR sonucunda bazı *Cyclamen* türlerinin bantları.

M-Markır 1-*Cyclamen trochopteranthum*, 2- *Cyclamen coum* var. *coum*



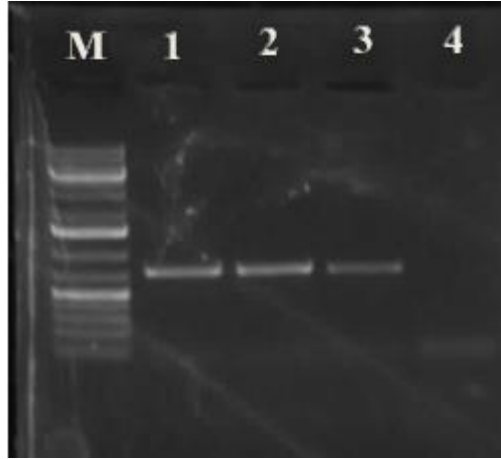
Şekil 3.7: PCR sonucunda bazı *Cyclamen* türlerinin bantları.

M-Markır 1-*Cyclamen hederifolium*, 2-*Cyclamen coum* var. *coum*, 3-*Cyclamen trochopteranthum*, 4-*Cyclamen mirabile*, 5-*Cyclamen* sp. (süs bitkisi) ,6- *Cyclamen cilicium* var. *intaminatum*, 7- *Cyclamen coum* var. *caucasicum*, 8- *Cyclamen persicum*, 9- *Cyclamen repandum* var. *repandum*, 10- *Cyclamen parviflorum* var. *subalpinum*, 11- *Cyclamen creticum*, 12- *Cyclamen pseud-ibericum*, 13- *Cyclamen persicum*



Şekil 3.8: PCR sonucunda bazı *Cyclamen* türlerinin bantları.

M-Markır 1-*Cyclamen hederifolium*, 2-*Cyclamen mirabile*, 3- *Cyclamen pseud-ibericum*, 4- *Cyclamen repandum* var. *repandum*, 5- *Cyclamen cilicium* var. *intaminatum*, 6- *Cyclamen cilicium* var. *cilicium*, 7- *Cyclamen creticum*



Şekil 3.9: PCR sonucunda bazı *Cyclamen* türlerinin bantları.

M-Markır 1- *Cyclamen creticum*, 2- *Cyclamen repandum* var. *repandum* 3- *Cyclamen persicum*, 4- *Cyclamen repandum* var. *repandum*

3.4 DNA Dizileme ve Dizi Analizi

ITS bölgesinin tamamı PCR ile elde edildikten sonra, PCR ürünlerinin saflaştırılması ve dizilenmesi (Cycle sequencing) için dizilerin bir kısmı Labbiotek bir kısmı Refgen firmasından hizmet alımı yapılmak üzere gönderildi. Hizmet alımı; PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizileme reaksiyonları (cycle sequencing), dizileme

ürünlerinin saflaştırılması (purification) ve poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla dizileme ürünlerinin kromatogramlar (elektroferogramlar) haline getirilmesi işlemlerini içermektedir. Gerçekleştirilen dizileme reaksiyonlarının sonuçları ABI prism formatındaki dosyalar şeklinde elimize ulaştı.

3.4.1 DNA Dizileme Reaksiyonları

ABI prism formatındaki dosyalar şeklinde gelen DNA dizilerin işlenmesi için CodonCode Aligner programı kullanıldı. Her bir türe ait gelen ileri (forward) ve geri (reverse) dizilerden kontig oluşturuldu. Dizileme reaksiyonlarını gerçekleştiren cihazın yanlış okumuş olduğu bazı bazlar, kromatogramdaki (videogram) piklerin boyutuna ve temizliğine bakılarak CodonCode Aligner programında el ile görsel olarak düzeltildi. En temiz kontig dizileri böylece elde edilmiş oldu. Böylelikle çalışılan taksonların ITS bölgelerinin ITS5A DNA dizileri elde edildi.

3.5 Verilerin Filogenetik Analize Hazırlanması

Dizilerin hizalamak için ClustalW programı kullanıldı. Clustal W programı Fasta formatında çalışmaktadır. Bu yüzden elde ettiğimiz DNA dizilerini Microsoft Office Word programı yardımıyla Fasta formatına çevirerek hizalamaya hazır hale getirdik. DNA baz sıralamaları için ClustalW programında varsayılan komutlar kullanılarak hizalama yapılarak ve türler arasındaki var olan baz farklılıkları tespit edildi [54]. Cyclamen cinsinin 13 taksonuna ait olan DNA dizilerin hizalanması sonucunda öğrenilen baz farklılıkları aşağıda gösterilmiştir.

ClustalW' de Hizalanan ITS Dizilerinin Veri Matrisi

Cyclamen hederifolium_C1_	-----GGTG	4
Cyclamen coum	-----	
Cyclamen intaminatum	-----TG	2
Cyclamen trochopteranthum_	-----	
Cyclamen cilicium_	-----	
Cyclamen parviflorum	-----	
Cyclamen graecum	-----	
Cyclamen mirabile_C14	-----TAACAAGGTTCCGTAG-TGA	20
Cyclamen mirabile_C3	TCCTTATCATTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGA	50
Cyclamen mirabile_C12	TCCTTATCATTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGA	50
Cyclamen mirabile_C13	--NTTATCAATTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGA	48
Cyclamen caucasicum	-----TCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGA	24
Cyclamen pseudibericum	-----	
Cyclamen creticum	-----	
Cyclamen persicum	-----G	1
Cyclamen repandum_subsp. repandum	-----	
Primula veris	-----TTTCCGTAGGTGA	13
Primula farinosa	-----	
Primula verticillata	-----	
Cyclamen hederifolium_C2 ITS	-----	
Cyclamen_sus_bitkisi_C8	-----	
Cyclamen hederifolium_C1_	ACCTGCGGA-GGATCATTGTCGCAAC--TGCTGGCAGAGCGACCCG-GG	50
Cyclamen coum	-----GGCAGAACGACCCGTGA	17
Cyclamen intaminatum	AACTGCGGAAGGATCATTGTCGCAACC-TGCTCGGCAGAACGACCCGTGA	51
Cyclamen trochopteranthum_	-----TGA	3
Cyclamen cilicium_	-----TGA	3
Cyclamen parviflorum	-----TGA	3
Cyclamen graecum	-----TGA	3
Cyclamen mirabile_C14	-CCTGCGGA-GGATCATTGTCGCAACC-TGCTCGGCAGAACGACCCGTGA	67
Cyclamen mirabile_C3	ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGCAACC-TGCTCGGCAGAACGACCCGTGA	99
Cyclamen mirabile_C12	ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGCAACC-TGCTCGGCAGAACGACCCGTGA	99
Cyclamen mirabile_C13	ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGCAACC-TGCTCGGCAGAACGACCCGTGA	97
Cyclamen caucasicum	AC-TGCGGAAGGATCATTGTCGCAACC-TGCTCGGCAGAACGACCCGTGA	72
Cyclamen pseudibericum	-----GCA-AACGACCCGTGA	15
Cyclamen creticum	-----CG-GA	4
Cyclamen persicum	AACTGCGGAAGGATCATTGTCGCAACC-TGCTCGGCAGAACGACCCGCGA	50
Cyclamen repandum_subsp. repandum	-----CGA	3
Primula veris	ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGCAAAAC-TGTAAGTTGCATGACCTGTGA	62
Primula farinosa	-----CGAAAAC-TGTAAGTTGCACGACCCGTGA	29
Primula verticillata	-----C-TGCAAAGTTGGANGACCCGAGG	23
Cyclamen hederifolium_C2 ITS	-----CTGGGGTCGCGATCG-GGGCACCCTCACGGCGGAGCCCTGG	42
Cyclamen_sus_bitkisi_C8	GCCTGACCTGGGGTCGCGTCTAGCCGATTGCGCCGTTGGTCT-TGT	49
Cyclamen hederifolium_C1_	A-CTGTATATACTCCGGACG-CGCTGGACC---CCC-GG--C---GT	88
Cyclamen coum	A-CATGTTAATAACTC-GGGCG-CGCTGTTCC---CCCAGG-T---GT	55
Cyclamen intaminatum	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGACC---CCC-GG--C---GT	88
Cyclamen trochopteranthum_	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGACC---CCC-GG--C---GT	40
Cyclamen cilicium_	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGACC---CCC-GG--C---GT	40
Cyclamen parviflorum	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGTCC---CCC-GG--C---GT	40
Cyclamen graecum	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGTCC---CCC-GG--C---GT	40
Cyclamen mirabile_C14	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGACC---CCC-GG--C---GT	104
Cyclamen mirabile_C3	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGTCC---CCC-GG--C---GT	136
Cyclamen mirabile_C12	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGACC---CCC-GG--C---GT	136
Cyclamen mirabile_C13	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGACC---CCC-GG--C---GT	134
Cyclamen caucasicum	A-CATGTTAATAACCCC-GGGCG-CGTCGGACC---CCC-GG--C---GT	109
Cyclamen pseudibericum	A-TATGTTAATAACCC--AGGCG-CGTCGGTAC---CCC-GG--C---GT	51
Cyclamen creticum	A-CATGTATCTACCCCGGAACG-TGTGGGACC---CC--GG--C---AC	41
Cyclamen persicum	A-CATGTTTCTACCC--GGACG-TGTCGG--CC---CC--GG--C---AT	84
Cyclamen repandum_subsp. repandum	A-CATGTATTAAACCCCGGACA-CGCAGGGCA---ACC-GG--C---GT	41
Primula veris	A-CTCGTATATAAATCTGGAGGGCACCGGAACAGTCCCTGGACC---TT	107
Primula farinosa	A-TAAGTACCTAAACCGGATGGCATCGGATTGGTCCCTCGGACC---GT	74
Primula verticillata	A-CATGTACCTAAACNN	68
Cyclamen hederifolium_C2 ITS	GTCATGAAGCAAACCGTTACG-GCACGGGC---ACGGCAG---GATT	83
Cyclamen_sus_bitkisi_C8	TTTGTGTTCCCGTCGGACGACG-CCTCGGGCC--GCGACGACCGGAGT	96
	*	*

Cyclamen_hederifolium_C1_ T----GTCCG-TTGCCAGGGGTGG-----GCCCTTGTCTCCTC----- 121
 Cyclamen_coum C----GTCCG-TTGCCAGGGGTGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 88
 Cyclamen_intaminatum C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 121
 Cyclamen_trochopteranthum_ C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 73
 Cyclamen_cilicium_ C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 73
 Cyclamen_parviflorum C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 73
 Cyclamen_graecum C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 73
 Cyclamen_mirabile_C14 C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 137
 Cyclamen_mirabile_C3 C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 169
 Cyclamen_mirabile_C12 C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 169
 Cyclamen_mirabile_C13 C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 167
 Cyclamen_caucasicum C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 142
 Cyclamen_pseudibericum C----GTCCG-TTGCCAGGGGCGG-----GCCCGTCGTCCCC----- 84
 Cyclamen_creticum A----GTCCG-TTGCCAGTGGCGG-----GCTCGTCGTCCCC----- 74
 Cyclamen_persicum T----GTCCG-TTGCCAGGGCGG-----GCTCGTCGTCCCC----- 117
 Cyclamen_repandum_subsp. repand C----GTCCG-TTGCCAGTGTCCG-----GCACGTCTCCCC----- 74
 Primula_veris TCCTTGTTCCA-TCCTCGTGGGTGAGTGTGTGTCGTGTCTCCACAGG 156
 Primula_farinosa TCGGTGTTCG-TCCTCGTTGGGTG--TGCGTACGCGTTCGCCCTCTCCGGG 121
 Primula_verticillata TCGACGTCCA-TNNNNNNNNNNNN--NACGCACGCGTTCGCCCTCTCTTCG 115
 Cyclamen_hederifolium_C2_ITS GGAAGTTCCGACGACCACAATTG-----CCGCGACAC-CGT----- 120
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 TGATAGTTCAACCACCAC---TGG-----TCGCGACGTGCGTC----- 131
 * * * * *
 Cyclamen_hederifolium_C1_ GGGGCATCGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 166
 Cyclamen_coum GGGCTGACGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACAACACC-GGC GCA 133
 Cyclamen_intaminatum GGGCCGATGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 166
 Cyclamen_trochopteranthum_ GGGCCGACGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 118
 Cyclamen_cilicium_ GGGCCGACGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 118
 Cyclamen_parviflorum GGGCCGACG-ATCCG-GAT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 117
 Cyclamen_graecum GGGCCGACG-ATCCG-GAT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 117
 Cyclamen_mirabile_C14 GGGCCGCGGATCCG-ATT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 182
 Cyclamen_mirabile_C3 GGGCCGCGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 214
 Cyclamen_mirabile_C12 GGGCCGCGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 214
 Cyclamen_mirabile_C13 GGGCCGCGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 212
 Cyclamen_caucasicum GGGCCGCGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 187
 Cyclamen_pseudibericum GGGCCGACG-ATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 128
 Cyclamen_creticum GGGCCGCGGTTCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 119
 Cyclamen_persicum GGGCCGACGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 162
 Cyclamen_repandum_subsp. repand GGGCCGACGGATCCG-GTT-CCTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 119
 Primula_veris GGGCCCTTGTGTACACATTTCTTGGCCGAACA--ACGAACACC-GGC GCA 203
 Primula_farinosa GGG--CACGAGTCCGCATTACCCAGCACAACA--ACGAACACC-GGC GCA 166
 Primula_verticillata GG---CGCAGTCCGCATTCCCTAGCAAAACACAACACCCCGCGCG 162
 Cyclamen_hederifolium_C2_ITS -GGCCGTTGCTT-CGTTTT--TAGGCTGGCCG-----GCCGCA 154
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 -G-CCGGGGGAG-CGCATT--TGGCCGCGCCG-----GCCGG 164
 * * * * *
 Cyclamen_hederifolium_C1_ A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGAGTCTGCGCCCCAA--CCC 210
 Cyclamen_coum A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCG-ACCC 178
 Cyclamen_intaminatum A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAATCAAGATTTCTGCGCCCCGAGCC 212
 Cyclamen_trochopteranthum_ A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCA-ACCC 163
 Cyclamen_cilicium_ A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCA-ACCC 163
 Cyclamen_parviflorum A-ACCGCGCAA-GGAACA--TCAACCAAGATTTCTGCGCCCCA-ACCC 162
 Cyclamen_graecum A-ACCGCGCAA-GGAACA--TCAACCAAGATTTCTGCGCCCCA-ACCC 162
 Cyclamen_mirabile_C14 A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCA-ACCC 227
 Cyclamen_mirabile_C3 A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCA-ACCC 259
 Cyclamen_mirabile_C12 A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCA-ACCC 259
 Cyclamen_mirabile_C13 A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCA-ACCC 257
 Cyclamen_caucasicum A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGTCGCCCCA-ACCC 232
 Cyclamen_pseudibericum A-ATCGCGC-AA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGCGCCCCA-ACCC 172
 Cyclamen_creticum A-ATCGCGCAAAGGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGCGCCCCA-ACCC 165
 Cyclamen_persicum A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGCGACCCC-A-ACCC 206
 Cyclamen_repandum_subsp. repand A-ATCGCGCAA-GGAAAA--TCAACCAAGATTTCTGCGCCCCA-ACCC 164
 Primula_veris A-TCCGCTCAA-GGAAAT--TCAACCAATAGATTGCGCTCCTT-G-CTCC 248
 Primula_farinosa A-TCCGTGCAA-GGAAAT--TCAACCAAGATATCACGCTCCT-G-CTCC 210
 Primula_verticillata A-TCCGCGCAA-GGAAAT--CAAACAGAGATACGTGCTC-C-TCCC 206
 Cyclamen_hederifolium_C2_ITS ACAGCGCAC---GGGGG---CCAATA----TCCGC-CCAGCACAGCA 192
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 G-GACGCAC---GGGGG---CCATTC----TCCGC-CCCCCA---CA 198
 * ** *

Cyclamen hederifolium_C1_ CGTACGCGGGGCTT-GGCGTGC GCGGAGGAATCAAGTA-TGAGTAAA--C 256
 Cyclamen coum CGTACGCGGGGCGCGGGGCGTGCACAGGATCTTGCA-TGAGTAAAAAC 227
 Cyclamen intaminatum CGTACACGGGGCGTGGGG-CGTGCGACAGAATCTTGCAATGAGTAAA--C 259
 Cyclamen trochopteranthum_ CGTACGCGGGGCGCGGGG-CGTGCGATATAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 209
 Cyclamen cilicium_ CGTACGCGGGGCGCGGGG-CGTGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 209
 Cyclamen parviflorum CGTACGCGGGGCGCGGGG-TGCG-GATATAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 207
 Cyclamen graecum CGTACGCGGGGCGCGGGG-TGCG-GATATAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 207
 Cyclamen mirabile_C14 CGTACGCGGGGCGCGGGG-CGTGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 273
 Cyclamen mirabile_C3 CGTACGCGGGGCGCGGGG-CGTGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 305
 Cyclamen mirabile_C12 CGTACGCGGGGCGCGGGG-CGTGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 305
 Cyclamen mirabile_C13 CGTACGCGGGGCGCGGGG-CGTGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 303
 Cyclamen caucasicum CGTACGCGGGGCGCGGGG-CGTGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAA--C 278
 Cyclamen pseudibericum CGTTTGC GGGGCGCGGGT-C--GCGATAGAATCTTCCA-TGAGTAAA--C 216
 Cyclamen creticum CGTACGCGGGTFCGCGGGG-TGCGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAAA-- 211
 Cyclamen persicum CGTTTCGCGGG--CGGGG-CGCGCGATAGAATCTTGCA-TGAGTAAAA-- 249
 Cyclamen repandum_subsp. repand CGTACGCGGGGCGCGGGG-AGCGCGCATGATCTTGAATGAGTAAA--C 211
 Primula veris CGTTCGCGGGCTATTACG--AGTGTAGAATCTTGCA----TATAA-C 289
 Primula farinosa CGTTTCGCGGGTGTTCGG--AGGGTAAGAATCTTGCA----TATAA-C 251
 Primula verticillata CGTTCGCGGGTGTATAG--AGCGTAGGAGTCTTGCA----TATAA-C 247
 Cyclamen hederifolium_C2 ITS CCTTCGGGTGCTAGGGGG--GGCGACGCGTT-GTGAGACGCCAGG--C 236
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 CTCCCAGGGGAGGGGG--GGCGACGCGAT-GCGTGACGCCAGG--C 242
 * * * * *

Cyclamen hederifolium_C1_ ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 302
 Cyclamen coum ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 273
 Cyclamen intaminatum AAAACG-ACTTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 305
 Cyclamen trochopteranthum_ ACAACG-ACTTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 255
 Cyclamen cilicium_ ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 255
 Cyclamen parviflorum ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 253
 Cyclamen graecum ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 253
 Cyclamen mirabile_C14 ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 319
 Cyclamen mirabile_C3 ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 351
 Cyclamen mirabile_C12 ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 351
 Cyclamen mirabile_C13 ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 349
 Cyclamen caucasicum ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 324
 Cyclamen pseudibericum ACAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 262
 Cyclamen creticum ATAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 257
 Cyclamen persicum ATAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 295
 Cyclamen repandum_subsp. repand AAAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 257
 Primula veris AAAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 335
 Primula farinosa AAAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 297
 Primula verticillata AAAACG-ACTCTCGGC--AACGGATATCTAGGCT-CTCGCATCGATGAAG 293
 Cyclamen hederifolium_C2 ITS A-GGCGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGGCGCAACTTGCCT---TCAA 282
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 A-GACGTGCCCTCGGCCTAATGGCTTCGGGGCGCAACTTGCCT---TCAA 288
 ** * ***** ** * * ** * * * * *

Cyclamen hederifolium_C1_ AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 350
 Cyclamen coum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 321
 Cyclamen intaminatum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 353
 Cyclamen trochopteranthum_ AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 303
 Cyclamen cilicium_ AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 303
 Cyclamen parviflorum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 301
 Cyclamen graecum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 301
 Cyclamen mirabile_C14 AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 367
 Cyclamen mirabile_C3 AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 399
 Cyclamen mirabile_C12 AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 399
 Cyclamen mirabile_C13 AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 397
 Cyclamen caucasicum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 372
 Cyclamen pseudibericum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 310
 Cyclamen creticum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 305
 Cyclamen persicum AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 343
 Cyclamen repandum_subsp. repand AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 305
 Primula veris AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 383
 Primula farinosa AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 345
 Primula verticillata AACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCA--GAATCCCGTGAAC 341
 Cyclamen hederifolium_C2 ITS AACTCGATGGTTCACGGGATTC--TGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT 330
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 GACTCGATGGTTCACGGGATTC--TGCAATTCACACCAAGTATCGCATTT 336
 ** * * * * *

```

Cyclamen_hederifolium_C1_    CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 395
Cyclamen_coum                CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCAAAG--CCATTAGGCCGA 366
Cyclamen_intaminatum        CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 398
Cyclamen_trochopteranthum_  CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 348
Cyclamen_cilicium_          CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 348
Cyclamen_parviflorum        CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 346
Cyclamen_graecum             CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 346
Cyclamen_mirabile_C14       CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 412
Cyclamen_mirabile_C3        CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 444
Cyclamen_mirabile_C12       CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 444
Cyclamen_mirabile_C13       CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 442
Cyclamen_caucasicum         CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 417
Cyclamen_pseudibericum      CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 355
Cyclamen_creticum           CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 350
Cyclamen_persicum           CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGNNNN 388
Cyclamen_repandum_subsp.    CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 350
repandum
Primula_veris                CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--TCATTAGGCCGA 428
Primula_farinosa            CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCTGA 390
Primula_verticillata        CATCGAGTTTTTGA---ACGCAAGTTGCGCCCGAAG--CCATTAGGCCGA 386
Cyclamen_hederifolium_C2_   TGCTACGTTCTTCATCGATGCGAG---AGCCTAGATATCCGTT--GCCGA 375
ITS
Cyclamen_sus_bitkisi_C8     CGCTACGTTCTTCATCGATGCAAG---AGCCGAAATATCCGTT--GCCGA 381
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Cyclamen_hederifolium_C1_    GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCTAGCA 441
Cyclamen_coum                GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGCGCA 412
Cyclamen_intaminatum        GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--TCGCGCA 444
Cyclamen_trochopteranthum_  GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--TCGCGCA 394
Cyclamen_cilicium_          GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTTGCCCCC--TCGCGCA 394
Cyclamen_parviflorum        GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGCGCA 392
Cyclamen_graecum             GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGCGCA 392
Cyclamen_mirabile_C14       GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGTGCA 458
Cyclamen_mirabile_C3        GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGTGCA 490
Cyclamen_mirabile_C12       GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGTGCA 480
Cyclamen_mirabile_C13       GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGTGCA 490
Cyclamen_caucasicum         GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGTGCA 463
Cyclamen_pseudibericum      GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--C-GTGA 400
Cyclamen_creticum           GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAATGCGTCGCCCCG--TGCGCA 395
Cyclamen_persicum           NGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAATGCGTCGCCCCC--CGCGCA 434
Cyclamen_repandum_subsp.    GGG-CAGGCCTGCCTGGGCGTCTC--ACAACGCGTCGCCCCC--CCGCGCA 396
repandum
Primula_veris                GGG-CAGGTCTGCCTGGGCGTCTC--ATAATGCGTCGCTACACCACCAG 437
Primula_farinosa            GGG-CAGGTCTGCCTGGGCGTCTC--ATAATGCGTCGCTACACCACCAG 433
Primula_verticillata        GAG-----TCGTTGTGTTTACTCATACAAGATTCTCCGCACACGCCAA 419
Cyclamen_hederifolium_C2_   GAG-----TCGTTTGGT-ATACG-ACGGGCATCCGACCACCCCCAGA 423
ITS
* * * * *
Cyclamen_hederifolium_C1_    CCCCA---GGGTG-T-GGGG-C-GGGGCGGATA-----TCGG--CTT 474
Cyclamen_coum                CCCCC---GGGTGCC-GTGCT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 446
Cyclamen_intaminatum        CCCCC---GGGTGCC-GTGCT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 478
Cyclamen_trochopteranthum_  CCCCC---GGGTGAC-GTGTT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 428
Cyclamen_cilicium_          CCCCC---GGGTGCC-GTGCT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 428
Cyclamen_parviflorum        CCCCC---GGGTGCC-GTGCT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 426
Cyclamen_graecum             CCCCC---GGGTGCC-GTGCT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 426
Cyclamen_mirabile_C14       CCCTC---GGGTGCC-TTGTT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 492
Cyclamen_mirabile_C3        CCCTC---GGGTGCC-TTGTT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 524
Cyclamen_mirabile_C12       CCCTC---GGGTGCC-TTGTT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 524
Cyclamen_mirabile_C13       CCCTC---GGGTGCC-TTGTT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 522
Cyclamen_caucasicum         CCCTC---GGGTGCT-TTGTT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 497
Cyclamen_pseudibericum      CCCCC---AGGTGTC-GTGCT-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 434
Cyclamen_creticum           CCCAC---GGGTGCC-GCGCC-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 429
Cyclamen_persicum           CCCCC---GGGTGC--GCGCC-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 467
Cyclamen_repandum_subsp.    CCCCC---GGGTGCC-GCGCC-GGGGCGGATA-----TTGG--CTC 430
repandum
Primula_veris                ATCTATTAGGGCATTGGTGCTTGAAGCGGATA-----TTGG--CTC 515
Primula_farinosa            CTCCCATTAGGGCGTGGTGCTTGAAGCGGATA-----TTGG--CTC 477
Primula_verticillata        CTCCCGTAAGGGCGTTGGT-CTTGAAGCGGATA-----TTGG--CTC 472
Cyclamen_hederifolium_C2_   GCCCC---GCGTACG-GGGTGGGGGCGCGGACT-CTTGGTTGA-TTTT 462
ITS
Cyclamen_sus_bitkisi_C8     GCTCC---GCGGACG-GGCGTGGGGACGGGGAATGCTCCTTTGAGTTTT 468
* * * * *

```

Cyclamen hederifolium_C1_ CCCGTGCGGTGG-TGGG--GGCG--GCCC GCC-----TAAAAA-- 507
Cyclamen coum CCCGTGCACAGT-FGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-T 480
Cyclamen intaminatum CCCGTGCGCAGC-TGTTGCCGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-A 514
Cyclamen trochopteranthurm_ CCCGTGCGCAGC-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-A 462
Cyclamen cilicium_ CCCGTGCGCAGC-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-A 462
Cyclamen parviflorum CCCGTGCGCAGC-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-- 459
Cyclamen graecum_ CCCGTGCGCAGC-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-- 459
Cyclamen mirabile_C14 CCCGTGCGCAGC-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-T 526
Cyclamen mirabile_C3 CCCGTGCGCAGA-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-T 558
Cyclamen mirabile_C12 CCCGTGCGCAGC-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-T 558
Cyclamen mirabile_C13 CCCGTGCGCAGA-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAA-T 556
Cyclamen caucasicum CCCGTGCGCAGA-TGTG--CGCG--GTCAGCC-----TAAAAAAT 532
Cyclamen pseudibericum CCCGTGCGCAGC-CGTG--TGCG--GTCAGCC-----TAAAA--C 467
Cyclamen creticum CCCGTGTGCAGC-CGTA--CGCG--GCCAGCC-----TAAAAAC-- 462
Cyclamen persicum CCCGTGCGCA---CGCG--CGCG---CCAGCC-----TAAAAAC-- 497
Cyclamen repandum_subsp. repand CCCGTGCGCAGT-TGTG--CGCG--GCCAGCC-----TAAAAAT-- 463
Primula veris CCCGTGTGCACT-AGTG--CGCG--GTCG GCC-----TAAAAA-- 548
Primula farinosa CCCGTGTGCATT-CGTG--CGCG--GTCG GCC-----TAAAAA-- 510
Primula verticillata CCCGTGCGAATC-TGTG--CAGC--GTCG GCC-----TAAAAA-- 505
Cyclamen hederifolium_C2_ITS CCTTGGCGCATTTCGCGCCGTTTGTTCGTTGTCGCCAGGAACCGGAT-C 511
Cyclamen_süs_bitkisi_C8 CCTTGGCGCATTTCGCGCCGTTTGTTCGTTGTC-----CCGCA-- 506
** * * * * *

Cyclamen hederifolium_C1_ CGAAGCACCGGCCGAG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTG- 542
Cyclamen coum CGAAGCATCGGCCACTG-GTGCCGC-----GGCAATTTGTGG 516
Cyclamen intaminatum CGAAGCACCGGCCACTG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 550
Cyclamen trochopteranthurm_ CGAAGCACCGGCCACTG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 498
Cyclamen cilicium_ TGAAGCACCGGCCACTG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 498
Cyclamen parviflorum CGAAGCGCCGTCCACTG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 495
Cyclamen graecum_ CGAAGCGCCGTCCACTG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 495
Cyclamen mirabile_C14 CGAAGCATCGGCCAATG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 562
Cyclamen mirabile_C3 TGAAGCATCGGCCAATG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 594
Cyclamen mirabile_C12 TGAAGCATCGGCCAATG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 594
Cyclamen mirabile_C13 CGAAGCATCGGCCAATG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 592
Cyclamen caucasicum CGAAGCATCGGCCAATG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 568
Cyclamen pseudibericum CGAAGCGCCGTCCACTG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 503
Cyclamen creticum TAAAGCACCGGCCGCC--GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 497
Cyclamen persicum AGAAGCACCGGCCACCC-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 533
Cyclamen repandum_subsp. repand CGAAGCACCGGCCACCG-GTGTCCG-----GGCAATTTGTGG 499
Primula veris CGAGTC-CTGATGATCG-ACGTCCG-----GGCAATTTGTGG 583
Primula farinosa CGAGTC-CCGACGATCG-ACGTCCG-----GGCAATTTGTGG 545
Primula verticillata CGAGTC-CCGCGCATCT-ACGTCCG-----GGCAATTTGTGG 540
Cyclamen hederifolium_C2_ITS CGATGCCCGAAGGACAAAGGGCCCAACCCCTGGCAACGGACAACCG-CGG 560
Cyclamen_süs_bitkisi_C8 CGGCACGGCGGGGACGCACGTCCCGTGGGGGGTTGGGGCAACGGCGGG 556
* * * * *

Cyclamen hederifolium_C1_ -TGTGCA-ACCTTCC-----AATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 574
Cyclamen coum TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 549
Cyclamen intaminatum TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 583
Cyclamen trochopteranthurm_ TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 531
Cyclamen cilicium_ TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 531
Cyclamen parviflorum TTGCCAA-ACCATCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 528
Cyclamen graecum_ TTGCCAA-ACCATCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 528
Cyclamen mirabile_C14 TTGTCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 595
Cyclamen mirabile_C3 TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 627
Cyclamen mirabile_C12 TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 627
Cyclamen mirabile_C13 TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 625
Cyclamen caucasicum TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 601
Cyclamen pseudibericum TTGTCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 536
Cyclamen creticum TTGCCAA-ACCTTAT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGC--- 530
Cyclamen persicum TTGCCAA-ACCGTCT-----CATCCTGCCGCGCC-GTGT--- 566
Cyclamen repandum_subsp. repand TTGCAAA-ACCGTCC-----AATCGTGTCCGCCCCCGTGT--- 533
Primula veris TTGTAAAGACTGTTT-----CATGCTGCTGTCAC-GTTT-CG 619
Primula farinosa TTGTCAA-ACTGTTG-----CATGCTGCCGTGCCG-GTTT-CG 580
Primula verticillata TTGTCAA-ACCGTGT-----CATGCTGCCGTGTGC-GTTTTCG 576
Cyclamen hederifolium_C2_ITS GGGTCCAGCGCGTCCGGAAGTATATACAAGTTGCGCG-GTC--GTTT--- 604
Cyclamen_süs_bitkisi_C8 GGGCCCGCCCCCTC-----TCCGCGG-GCCCCGATT--- 586
* * * * *

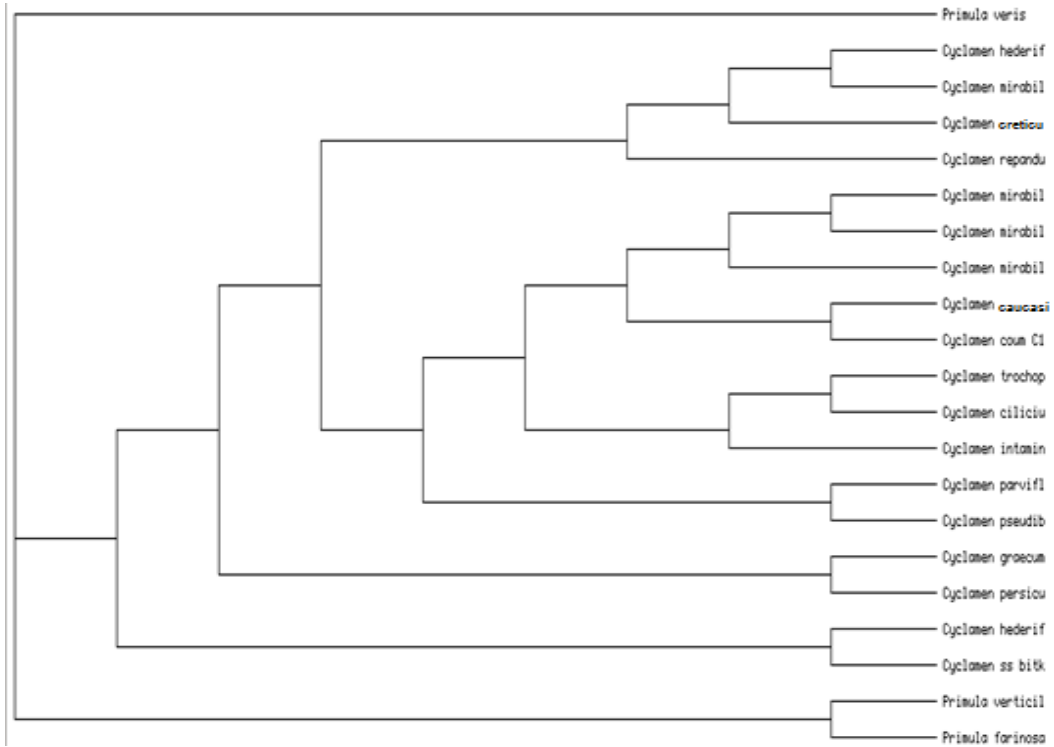
Cyclamen hederifolium_C1_ --CGTAACCGGTT--GGCTTT-CATGACCCACGGGCTCCGCCCGTGAGT- 618
 Cyclamen coum --CTCAACCGATT--GGCTT--CTTGACCCCGGA----CGTC-GCGCGTG 588
 Cyclamen intaminatum --CTTAACCGGTT--GGCTT--CTTGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATG-- 624
 Cyclamen trochopteranthurm_ --CTTAACCGGTT--GGCTT--CTTGACCCCGGAGCTCCGCC-GCGTGT- 573
 Cyclamen cilicium_ --CTTAACCGGTT--GGCTT--CTTGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATGT- 573
 Cyclamen parviflorum --CTTAAC-GGTT--GGCTT--CTTGACCCCGGAGCTCCGCT-AAATGT- 569
 Cyclamen graecum --CTTAAC-GGTT--GGCTT--CTTGACCCCGGAGCTCCGCT-AAATGT- 569
 Cyclamen mirabile_C14 --CTTGACCGGTT--GCCTT--CTAGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATGC- 637
 Cyclamen mirabile_C3 --CTTGACCGGTT--GCCTT--CTAGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATGC- 669
 Cyclamen mirabile_C12 --CTTGACCGGTT--GCCTT--CTAGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATGC- 669
 Cyclamen mirabile_C13 --CTTGACCGGTT--GCCTT--CTAGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATGC- 667
 Cyclamen caucasicum --CTTGACCGGTT--GCCTT--CTAGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATGC- 643
 Cyclamen pseudibericum --CTTAAC-GGTA--GCCTT--CTTGACCCCGGAGCTCCGCT-GCATGC- 577
 Cyclamen creticum --CGTAACCGGTT--GGCTT--CTTGACCCCGGAGCTCCGCC-GCAAGT- 572
 Cyclamen persicum --CTCAACCGGTT--TGCTT--CCCGACCCAGGACGTCGCGC-GCGAGC- 608
 Cyclamen repandum_subsp. repand --CGTAACCGGTC--GGCTT--CCTGACCCCGGAGCTCCGCC-GCAAG-- 574
 Primula veris TTCGTTATCGGGA--GTCTC--ATTGACGCTGTAGCGCCATTGCTTG-- 663
 Primula farinosa ATC--TCATCGGTA--GACTC--ATTGACCCCGTGTAGCACCATTGCTTG-- 623
 Primula verticillata ATC--CCTCGGTT--TACTC--ATCGGCCCTGTTGCATCATTGCGTG-- 618
 Cyclamen hederifolium_C2_ITS TGCCAAGCAGGTTGCGACAATGATCCTTCCGCGAGGTTCA--CCTACGGAAA 653
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 TGTAAACCGG----GG-----TTCCGGGGTCCGGTTTCCGG--- 619
 * *
 Cyclamen hederifolium_C1_ -GGTGCCTCGATCGCGACCCCGAGTTCAGGGCGGTATACCCCG----- 660
 Cyclamen coum CGGTGCCTCGAT----- 600
 Cyclamen intaminatum CGGTGCCTCGATCGCGACCCCGAGTTCAGGGCGGATTACCCCGTGAGTTTAA 674
 Cyclamen trochopteranthurm_ TAATAAATTAATA----- 586
 Cyclamen cilicium_ TAATAAATTAATA----- 586
 Cyclamen parviflorum TTATAATTTTATT----- 582
 Cyclamen graecum TTATAATTTTATT----- 582
 Cyclamen mirabile_C14 -GGTGCCTCGATCGCGACCCCGAGTTCAGGGCGGATTACCCCG----- 666
 Cyclamen mirabile_C3 -GGTGCCTCAATCGCGACCCCGAGTTCAGGGCGGATTACCCCG----- 710
 Cyclamen mirabile_C12 -GGTGCCTCGATCGCGACCCCGAGTTCAGGGCGGATTACCCCGTGAGTTTA 718
 Cyclamen mirabile_C13 -GGTGCCTCGATCGCGACCCCGAGTTCAGGGCGGATTACCCCGTGAGTTTA 716
 Cyclamen caucasicum -GGTGCCTCGATCGCGACCCCGAGTTCAGGGCGGATTACCCCG-TGAGTTTA 691
 Cyclamen pseudibericum -GGTGCCTCGAT----- 588
 Cyclamen creticum -AAA-----TAAATTTA 583
 Cyclamen persicum -GGTGCCTCGATCGCGANNNNAGTTCAGGGCGGATTACCCCG-TGAGTTTA 656
 Cyclamen repandum_subsp. repand --TAAATATAATTTAA----- 588
 Primula veris -GTGCCTCGATCGTGACCCCGAGTTCAGGGCGGATTACCCCGTGAAATTTA 711
 Primula farinosa -GTGCCTCGA----- 632
 Primula verticillata -GTGCCTCGATCGCGACCCCG----- 637
 Cyclamen hederifolium_C2_ITS CCTTGTTACNACTTCTCCTTCTCTAAATGATAANG----- 689
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 ----GTTTCG----- 625

 Cyclamen hederifolium_C1_ -----
 Cyclamen coum -----
 Cyclamen intaminatum GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 698
 Cyclamen trochopteranthurm_ -----
 Cyclamen cilicium_ -----
 Cyclamen parviflorum -----
 Cyclamen graecum -----
 Cyclamen mirabile_C14 -----
 Cyclamen mirabile_C3 -----
 Cyclamen mirabile_C12 AGCATATCAATAANCGGAGNA--- 739
 Cyclamen mirabile_C13 AGCATATCAATAAGCGGAGGA--- 737
 Cyclamen caucasicum AGCATATCAATAAGCGGAGGAAA- 714
 Cyclamen pseudibericum -----
 Cyclamen creticum TA----- 585
 Cyclamen persicum AGCATATCAATA----- 668
 Cyclamen repandum_subsp. Repand -----
 Primula veris A----- 712
 Primula farinosa -----
 Primula verticillata -----
 Cyclamen hederifolium_C2_ITS -----
 Cyclamen_süs_bitkisi_C8 -----

3.6 Filogenetik Analiz

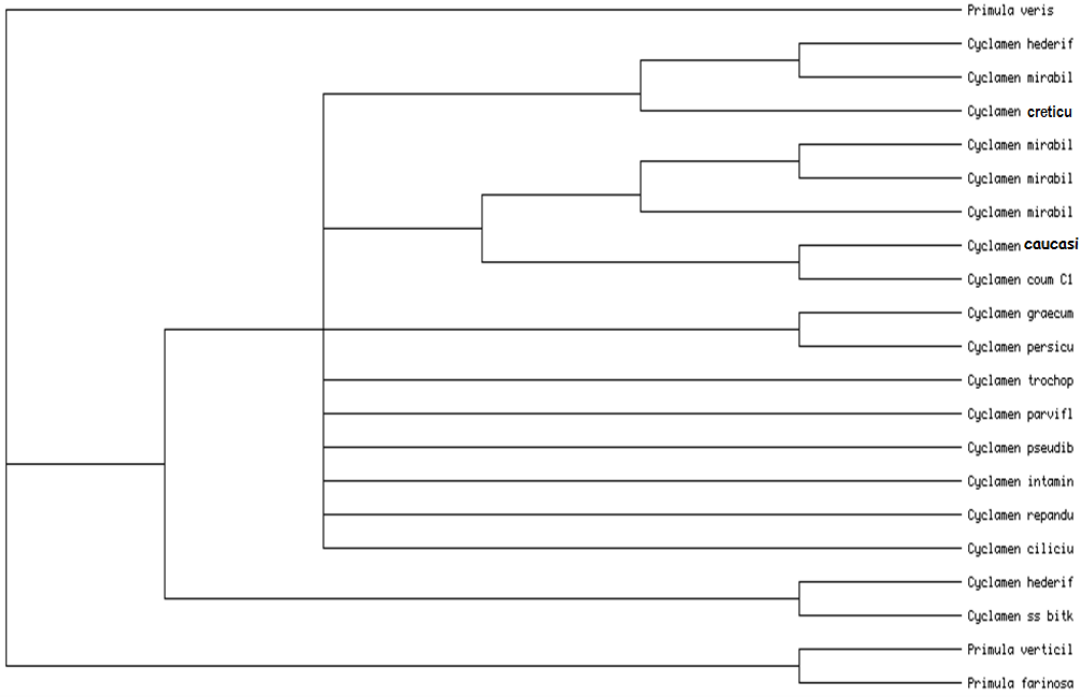
Filogenetik analiz için PAUP 4.0b10 programı kullanıldı. PAUP 4.0b10 programı #Nexus formatıyla ilerlemektedir. ClustalW yardımıyla hizalanan diziler #Nexus' a çevrilerek PAUP 4.0b10 ile filogenetik analiz için hazır hale getirildi. PAUP açıldıktan sonra uygun komutlarla ilerleyerek istediğimiz analizler kolaylıkla gerçekleştirildi ve filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

Karakter temelli yöntemlerden olan Parsimoni seçilerek Heuristic search ve bootstrap analizi yapıldı ve oluşan ağaçlar kaydedildi. Daha sonra mesafe temelli yöntem kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) ve NJ (Neighbour Joining) analizleri yapılarak oluşan ağaçlar kaydedilmiştir.



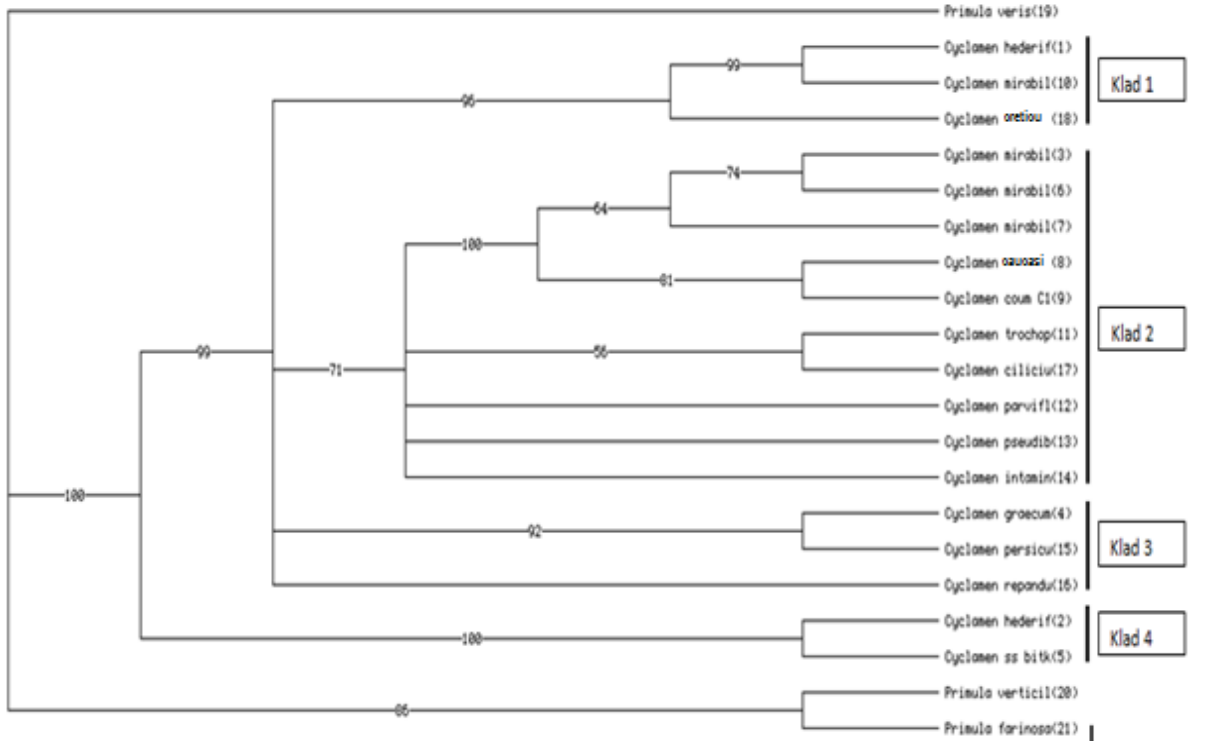
Şekil 3.10: ITS bölgesine ait diziler kullanılarak oluşturulan 1 numaralı ağaç.

Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak Heuristic search yapıldı. Oluşan ağaçlardan 1 numaralı filogenetik ağaç bu çalışma için sunulmuştur.



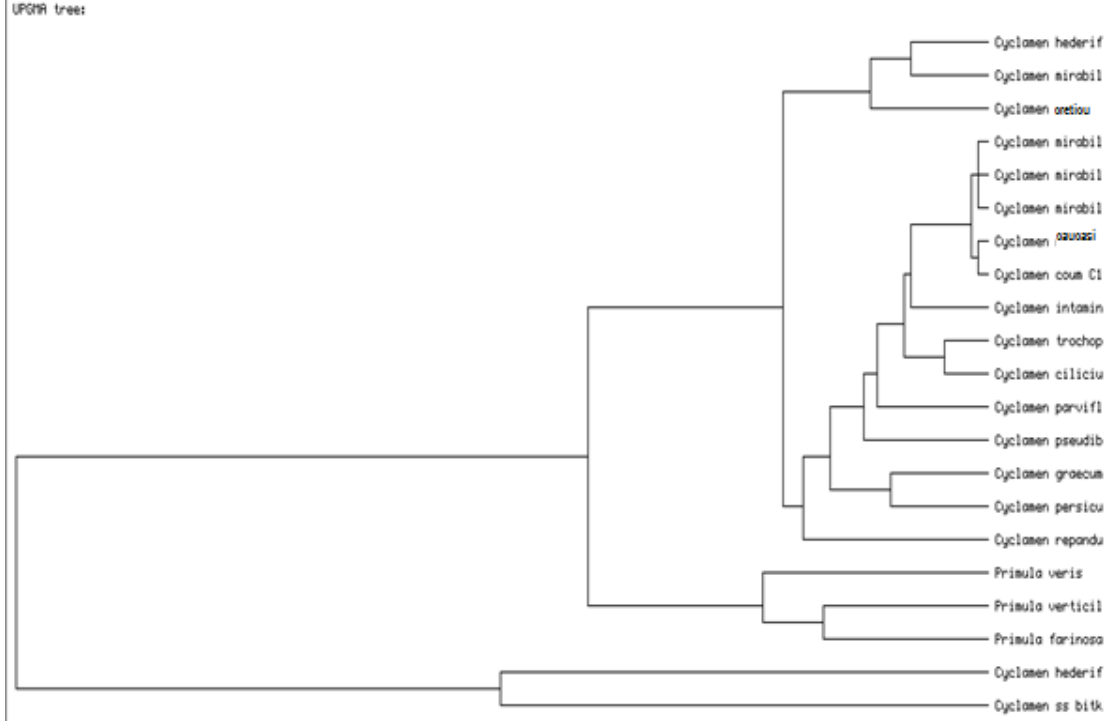
Şekil 3.11: Parsimoni ile oluşturulan strict consensus ağacı.

Elde bulunan dizilerle maksimum parsimoni yönteminde bootstrap analizi de yapılmıştır. Bu yöntem elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriteri kullanılarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dallarını belirlemede kullanılır.



Şekil 3.12: Parsimoni ile oluşturulan majority rule ağacı.

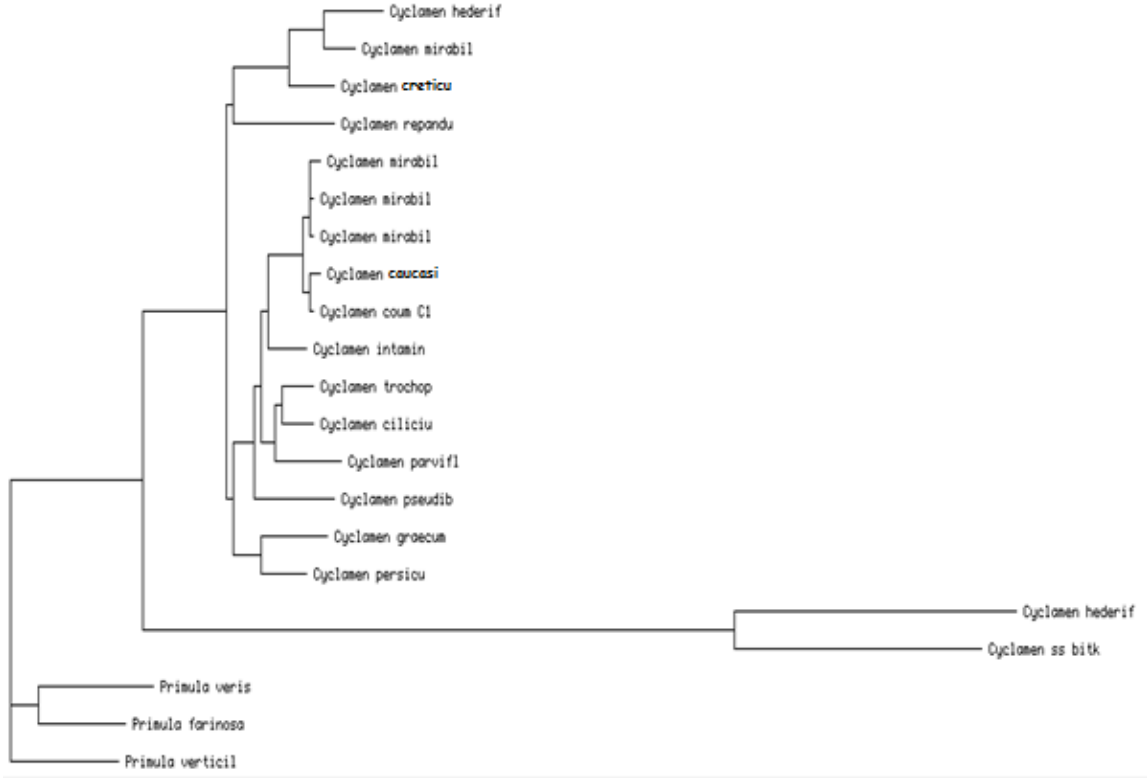
Oluşturulan bootstrap ağacına, yapılan bootstrap analizi sonucunda oluşan dalların desteklenme yüzdeleri yerleştirilmiştir



Şekil 3.13: UPGMA analizi sonucunda oluşan ağaç.

UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır.

Neighbor-joining trees



Şekil 3.14: NJ (Neighbour Joining) analizi sonucunda oluşan ağaç.

Oluşan filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

DNA dizi analizi çalışmaları, özellikle geçen bu yirmi yılda aşırı bir bilgi birikimi yapmayı mümkün kılmıştır [54]. Özellikle ITS bölgesi sağladığı imkanlar sebebiyle son zamanların en çok çalışılan bölgesi haline gelmiştir. ITS bölgesinin 200-250bp' den oluşan ITS1, 160 bp' lik 5.8S rDNA ve 200-250 bp' lik ITS2 bölgelerinden meydana geldiği Şekil 1.1' de belirtilmiştir. Bunların içerisinde 5.8S rDNA bölgesi korunmuş bir bölgedir, çalışmalarda ITS bölgesinin tercih edilmesini sağlayanlar ITS1 ve ITS2 bölgeleridir [55]. Bu bölgeler daha fazla mutasyon biriktirebilir bu sayede türler arası, tür içi ve hatta popülasyon düzeyinde bile mevcut polimorfizmlerin ortaya çıkmasında etkili olabilmektedirler [56].

Türkiye' de yayılış gösteren *Cyclamen L.* cinsinin akrabalık ilişkilerini ortaya koymak amacıyla nrDNA ITS bölgesi çalışıldı. Literatürde yapılan araştırmalara göre ülkemizde yetişen *Cyclamen L.* cinsine ait taksonlarla ilgili daha önceden yapılmış böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada *Cyclamen* türlerinin gDNA' ları izole edilerek, elde edilen gDNA' larının ITS bölgeleri PCR yaparak çoğaltıldı [57]. PCR'dan elde edilen dizilerde öncelikle dizi analizi yapılarak ve filogenetik ağaçlarına ulaşıldı. Böylece türler arasındaki genetik benzerlikler ve farklılıklar ortaya çıkmış oldu [58].

Çalışma sonucunda *Cyclamen* cinsinin taksonlarının ITS bölgelerinin DNA baz sıraları elde edildi ve ilk kez bu çalışma ile DNA dizilerine bağlı olarak akrabalık dereceleri tespit edilmiş oldu. Çalışılan taksonların ITS nrDNA bölgesinin tamamı kullanılarak toplam baz uzunluğunun 580-730 baz çifti değiştiği görüldü. Baz çiftlerine dayalı olarak filogenetik analiz PAUP* ile yapıldı. Analiz için ise parsimoni ve genetik uzaklık kriterleri kullanıldı. Parsimoni en sık çalışılan ve filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan metottur. Bu metot olası bütün ağaçları değerlendirerek, farklı ağaçlar arasından seçmeye yarar ve her biri için bir skor verme esasına dayanır. Maksimum parsimoni' de kriter, verilen ağaçtaki verileri açıklayabilmek için gerçek olduğu kabul edilen genetik değişimlerin sayısıdır. Parsimonisi en yüksek olan ağaç, en tutumlu olan yani genetik ilişkiyi en gerçekçi yansıtan ağaçtır [38].

Parsimoni kriteri kullanılarak oluşturulan ağaçlar Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de gösterilmektedir.

Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriterinde ITS bölgesine ait diziler kullanılarak 760 karakter incelenmiş ve bunların 637 karakteri sabit, 123 karakteri değişken karakterli çıkmıştır. Heuristic search yapılarak oluşan ağaçlardan 1 numaralı filogenetik ağaç bu çalışma için Şekil 3.10’ da sunulmuştur.

Şekil 3.10’ daki ağacı oluştururken dış grup olarak yine Primulaceae familyasından olan *Primula* cinsine ait *Primula veris*, *Primula farinosa* ve *Primula verticillata* taksonları kullanılmıştır. Taksonların dizileri gen bankasından alınmıştır. Bu taksonlar ağacın en altında ve en üstünde olarak yer alıp *Cyclamen* cinsinden bariz bir şekilde ayrılmışlardır.

Şekil 3.11’ de elde ettiğimiz dizilerle oluşturulan bootstrap ile oluşturulan strict konsensus ağacı görülmektedir. Maksimum Parsimoni kriterinde Heuristic search yapılarak analiz sonucunda 1000 ağacın ortak karar yani konsensus ağacı oluşturulmuştur. Konsensus yani uyumluluk ağacıdır [59]. İstatistiksel açıdan dallara herhangi bir güvenilirlik aralığı yüklemeyiz. Her bir dalın yüzdelik olarak ne oranda desteklendiğini gösterir. Eğer yapılan destek %50’nin altında ise program bu dalı çok zayıf olarak nitelendirir ve oraya güvenilemeyeceği için çökertir, çöken dal sonucunda oluşan basamaklanmamış dallanmaya politomi adı verilir.

Şekil 3.11’ de *Cyclamen trochopteranthum*, *Cyclamen parviflorum* var. *subalpinum*, *Cyclamen pseud-ibericum*, *Cyclamen cilicum* var. *intaminatum*, *Cyclamen repandum* var. *repandum* ve *Cyclamen cilicum* var. *cilicum* taksonlarının bulunduğu dalların desteği %50 nin altında bulunduğu için bu dallara güvenilir kabul edilmez ve dallarda çökme meydana gelir. Bu taksonların bulunduğu dallarda politomi mevcuttur. Ağacın bu kısmındaki dallanma modeli belirlenemediğinden güvenilebilir yorum yapılamaz. Bu dal tek düğümden çok çatallı olarak ayrılmıştır ve dallarda politomi mevcuttur denilebilir.

Şekil 3.12’ de oluşturulan bootstrap ağacına, yapılan bootstrap analizi sonucunda oluşan dalların desteklenme yüzdeleri yerleştirilmiştir. Bootstrap analizi için maksimum ağaç sayısı 1000 seçilmiş ve 100 tekrar yapılmıştır. Bu yöntem elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriteri kullanılarak istatistiksel yönden en

güvenilir olan dallarını belirlemede kullanılır [60]. Şekil 3.11 ve Şekil 3.12' de görüldüğü gibi bootstrap analizi sonucunda oluşan ağaçta dallarda çökme meydana gelmiştir. Bunun nedeni o dallar için bootstrap desteğinin %50'nin altına düşmüş olmasıdır. Ağacın bu kısmındaki dallanma modeli belirlenemediğinden bu kısım ile ilgili güvenilebilir bir yorum yapılamaz.

Şekil 3.12' de maksimum parsimoni ağacının üzerine bootstrap yüzdeleri işaretlenmiştir. Buna bakılarak 18 taksonun temelde 2 gruptan oluştuğu görülmektedir. Bu ayırım bootstrap analizi ile %100, %99, %100 olarak desteklenmektedir. Taksonların ayırımıyla 4 klad oluşmuştur.

%99 ile ayrılan grupta yer alan 3 klad kendi arasında %96, %71 ve %92 olarak birbirinden ayrılmaktadır. Klad 1' de %96'lık bir skorla ayrılan *Cyclamen hederifolium* ve *Cyclamen mirabile* yer almaktadır. İki tür kendi arasında monofiletik bir grup oluşturmuştur. Kladda yer alan *Cyclamen creticum* bootstrap desteğine sahip değildir.

%71'lik bir skorla ayrılmış olan Klad 2' de yer alan Farklı lokalitelerden toplanmış olan *C. mirabile* taksonlarının kendi içinde bir grup oluşturduğu ve bu dalın %64, %74 olarak desteklendiği görülmektedir. Bu durum ile birlikte farklı lokalitelerden toplanan aynı taksonların birbirinin aynısı olduğu ve farklılık gözlemlenmediği bilgisine ulaşılmaktadır. Dalın diğer tarafında ayırımı %61 le desteklenen *Cyclamen coum* var. *caucasicum* ve *Cyclamen coum* var. *coum* bulunmaktadır. Beklenildiği üzere kardeş takson çıkmışlardır. Kendi aralarında monofiletik bir grup oluşturmuşlardır.

Cyclamen trochopteranthum ve *Cyclamen cilicium* var. *cilicium* kendi aralarında bir grup oluşturmuşlardır. Bu iki takson monofiletik olarak ayrılmışlardır ve kardeş takson olarak adlandırılabilirler. Ayrıldıkları dal bootstrap analizinde %56 desteklenmektedir.

Cyclamen parviflorum var. *subalpinum*, *Cyclamen pseud-ibericum* ve *Cyclamen cilicium* var. *intaminatum* taksonlarının bulunduğu dallar bootstrap analizinde bir değere sahip değildir. Dalların desteği %50 nin altında bulunduğu için bu dallar güvenilir kabul edilmez ve dallarda çökme meydana gelir. Bu taksonların bulunduğu dallarda politomi mevcuttur. Ağacın bu kısmındaki dallanma modeli

belirlenemediğinden güvenilebilir yorum yapılamaz. Bu dal tek düğümünden çok çatallı olarak ayrılmıştır ve dallarda politomi mevcuttur denilmektedir. Anderberg'in yaptığı analizde *Cyclamen pseud-ibericum* ile *Cyclamen coum*, *Cyclamen mirabile* ve *Cyclamen intaminatum* % 96' lık bir değer ile desteklenmektedir. *Cyclamen coum*, *Cyclamen mirabile* ve *Cyclamen intaminatum* kendi aralarında monofiletik bir grup oluşturmaktadırlar [7].

Maksimum Parsimoniye göre yapılan bootstrap ağacına yerleştirilen değerlerde %92 'lik bir değerle ayrılarak klad 3 ü oluşturan *Cyclamen graecum* ve *Cyclamen persicum* kendi aralarında monofiletik bir grup oluşturarak kardeş takson olarak ayrılmışlardır. *Cyclamen repandum* var. *repandum* ağaççın bu kısmında bootstrap analizine ait bir değer taşımamaktadır. Bu yüzden bu kısım için net bir yorum yapılamamaktadır. Anderberg'in yaptığı çalışmada benzer şekilde *Cyclamen graecum* ve *Cyclamen persicum* %94 [7] destek ile ayrılmışlardır. Bu durum ile türlerin kardeş takson olduğu desteklenmektedir.

Cyclamen hederifolium ve onun hibriti olduğunu düşündüğümüz süs bitkisi olan Çalışmada *Cyclamen* süs bitkisi olarak etiketlenen takson ile birlikte Klad 4'ü oluşturmaktadırlar. Taksonlar beklenen bir sonucu vermektedir. Yapılan analizler sonucunda süs bitkisinin morfolojik açıdan çok benzediği *Cyclamen hederifolium* a genetik olarak da benzediği görülmüştür. Taksonların ayrılmış olduğu dal %100 ile desteklenmektedir.

Dış grup olarak analize katılmış olan *Primula verticilata*, *Primula farinosa*, *Primula veris* taksonları beklenildiği üzere %100'lük bir skorla *Cyclamen* cinsinden ayrılmışlardır.

Genetik uzaklık metodu, dizi çiftleri arasındaki farkın derecesine ve uzaklığına dayanır. Uzaklık metodunda iki farklı algoritma kullanılır. Küme temelli algoritmalarda uzaklık matrisi en benzer dizi çiftlerinden başlanarak yapılır. UPGMA ve NJ olmak üzere iki çeşidi vardır [56].

Şekil 3.13' deki UPGMA analizinde dal uzunlukları eşit olarak hesaplanmaktadır. Bu metot ilk kullanılan metot olup günümüzde kardeş taksonların aynı oranda mutasyona uğrama şartlarının geçerli kabul edilmemesinden dolayı

Neighbour Joining (Komşu Katılım) metoduyla mesafelerin ölçülmesini ortaya çıkarmıştır.

Şekil 3.14' te NJ analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaçtaki dal uzunluklarının birbirinden farklı olduğu gözlemlenmektedir. Filogramdaki bu dal uzunluklarının farklı olması türlerin hangisinin daha önce veya sonra ortaya çıktığını gösterir. Filogenetik ağaçtaki uzun olan dallar günümüze en yakın olan atayı göstermektedir, kısa olan dallar ise en eski (ilkel) atayı göstermektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Davis, P., *Flora of Turkey: And the East Aegean Islands.(Supplement)*, Edinburgh: Edinburgh University Press, (1965).
- [2] Özhatay, N. ve Kültür, Ş., "Check-List of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey III", *Turkey Journal of Botany*, 30, 281-316, (2006).
- [3] Clennet J. C. B. ve Compton, J. A., "Nomenclature in the dock. Overclassification leads to instability: a case study in the horticulturally important genus *Cyclamen* (Myrsinaceae)", *Botanical Journal of the Linnean Society*, 146, 339–349, (2004).
- [4] Grey-Wilson, C., *Cyclamen: a guide for gardeners, horticulturalists and botanists*, London: Batsford Press,(2003).
- [5] Gielly, L., Debussche, M. ve Thompson, J. D., "Geographic isolation and evolution of Mediterranean endemic *Cyclamen*: insights from chloroplast trnL (UAA) intron sequence variation", *Plant Systematics and Evolution*, 230, 75–88, (2001).
- [6] Anderberg, A., "Phylogeny and subgeneric classification of *Cyclamen* L. (Primulaceae)", *Kew Bulletin*, 49, 455–467, (1994).
- [7] Muller, J., "Fossil pollen records of extant angiosperms", *Botanical Review*, 47, 1–142, (1981).
- [8] Boulter, M.C. ve Collinson, M. E., *Magnoliophyta. The fossil record 2* (ed. by Benton, M.J.), London/New York: Chapman & Hall, (1993).
- [9] Mathew, B. ve Özhatay, N., *Türkiye 'nin Siklamenleri.*, Sirkeci, İstanbul,: Türkiye Doğal Hayatı Koruma Derneği, (2001).

- [10] Aksu, E., Erken K., ve Kaya, E., İhracatı Yapılan Doğal Çiçek Soğanları, Yalova: Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, 39, (2002).
- [11] Mummenhoff, K., Franzke A., ve Koch, M., "Molecular phylogenetics of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA", *Canadian Journal of Botany*, 75 (3), 469-487, (1997).
- [12] San Mauro, D. ve Agorreta, A., "Molecular systematics: A synthesis of the common methods and the state of knowledge", *Cellular & Molecular Biology Letters*, 15, 311–341, (2010).
- [13] Small, R.L., Cronn, R.C. ve Wendel, J.F., "Use of Nuclear Genes for Phylogeny Reconstruction in Plants", *Australian Systematic Botany*, 17(2), 145-170, (2004).
- [14] Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M.F., Campell, C.S. ve Donoghue, M.J., "The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny", *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 250-272, (1995).
- [15] Besnard, G., Rubio de Casas, R. ve Vargas, P., "Plastid and Nuclear DNA Polymorphism Reveals Historical Processes of Isolation and Reticulation in the Olive Tree Complex (*Olea europaea*)", *Journal of Biogeography*, 34 (4), 736-752, (2006).
- [16] Khan, S. ve Spoor, W., "Use of Molecular and Morphological Markers as a Quality Control in Plant Tissue Culture", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4 (4), 479-482, (2001).
- [17] Gomes, S., Mortin-Lopes, P. ve Guedes-Pinto, H., "Olive Tree Genetic Resources Characterization through Molecular Markes", *Genetic Diversity*, 15-28, (2012).
- [18] Gülşen, O. ve Mutlu, N., "Bitki Biliminde kullanılan genetik Markerlar ve Kullanım Alanları", *Alatarım*, 4 (2), 27-37, (2005).

- [19] Hughes, C., Faastwood, R. ve Bailey, C., "From Famine to Feast Selecting Nuclear DNA Sequence Loci for Plant Speciees- Level Phylogeny Reconstruction", *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 361, 1465, 211-225, (2006).
- [20] Agarwal, M., Shrivastava, N. ve Padh, H., "Advences in Molecular Marker Techniques and Their Applications in Plant Sciences", *Plant Cell Reports*, 27 (4), 617-631, (2008).
- [21] Saiki, G. D. H., Stoffel, R. K., Scharf, S. V., Hiquchi, R., Horn, G., Mullis, K. ve Erlich, H., "Primer Directed enzymatic amplification of DNA with athermastable DNA polymerase", *Science*, 239, 487-491, (1988).
- [22] Yıldırım, A. ve Kandemir, N., "Genetik Markörler ve Analiz Metotları", %1 içinde *Bitki Biyoteknolojisi II- Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, Konya, Selçuk Üniversitesi Basımevi, (2001).
- [23] Erlich, H.A., PCR Technology; *Principles and Applications for DNA Amplification*, London: Department of Human Genetics Cetus CorporationUSA, (1989).
- [24] Weissing, K., *DNA Fingerprinting Plants and Fungi*, USA: CRC press, (1995).
- [25] Welsh, M. J., "Fingerprinting genomes using PCR with orbitary primers", *Nücleic acid research*, 18 (24), 7213-7218, (1990).
- [26] Staub, J., Sequen, F. ve Gupta, M., "Genetic Markers", *Map Construction and Their Application in Plant Breeding Hort Science*, 31 (5), 729-741, (1996).
- [27] Rafalski, J. ve Tingey, S.V., "Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines", *Trends in Genetics*, 9 (8) 275-280, (1993).
- [28] Zabeau, M., "Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP)", European Patent Application Patent: 92402629.7, (1993).

- [29] Blears, M., Grandis, S., Lee H. ve Trevors, J., "Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): A Review of the Procedure and Its Applications", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21 (3) 99-114, (1998).
- [30] Okogbenin, E., Marin, J. ve Fregene, M., "An SSR-based molecular genetic map of cassava", *Euphytica*, 147 (3), 433–440, (2006).
- [31] Álvarez, I. ve Wendel, J., "Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3) 417-434, (2003).
- [32] Baldwin, B. G., "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1 (1), 3-16, (1992).
- [33] <http://pisum.bionet.nsc.ru/pg/32/42.htm>,.
- [34] Baldwin, B.G., "Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: an Example from the Compositae", *Molecular Phylogeny Evolution*, 1, 3-16, (1992).
- [35] Maxam, A., "A new method of sequencing DNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-564, (1977).
- [36] Sanger, F. ve Coulson, A., "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 463-467, (1977).
- [37] Sambrook, J. ve Maniatis, T., *Molecular Cloning, a laboratory manual*, New York: Cold spring harbor laboratory Press, (1989).
- [38] Klug, S. C. W., içinde *Concept of Genetics*, New Jersey, Prentice Hall, 745 (2000).
- [39] Sanger, F., "The Nucleotide and amino acid sequences of the N (5') terminal Region of gene G of bacteriophage phi X 174", *Journal of Molecular Biology*, 96, 703-719, (1975).

- [40] Sanger, F., "Nucleotide sequences in DNA", *Proceedings of the Royal Society of London*, 191, 317-333, (1975).
- [41] Thompson, G.T., "CLUSTALW: Improving the Weighting, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice", *Nucleic Acid Research*, 22, 4673-4680, (1994).
- [42] Notredame, C. D., "Saga: Sequence Alignment by Genetic Algorithm", *Nucleic Acid Research*, 28, 8, 1515-1524, (1996).
- [43] Saitou, N. ve Imanishi, T., "Relative Efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbor-Joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree", *Mol. Biol. Evol.*, 23 (10), 514-525, (1989).
- [44] Mount, D., *Bioinformatics, Phylogenetic prediction*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- [45] Freeman, G. ve Herron, J., *Evrimsel Analiz.*, Palme Yayıncılık, 438-449, (1999).
- [46] Felsenstein, J., "Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set", *Molecular Evolution*, 26, 123-131, (1987).
- [47] TREEVIEW, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>. (9 1 2011).
- [48] PAUP, <http://paup.csit.fsu.edu/>. (9 1 2011).
- [49] MR BAYES, <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>. (9 1 2011)
- [50] PHYLIP., <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. (9 1 2011).
- [51] Dellaporta, H. J., "A Plant DNA Minipreparation", *Plant Molecular Biology Reporter*, 4 (1), 19-21, (1983).
- [52] Bailey, C. D., Carr, T., Harris, S. ve Hughes, C., "Characterization of Angiosperm nrDNA Polymorphism, Paralogy and Pseudogenes", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3), 435-455, (2003).

- [53] Sang, T., "Utility of Low-Copy Nuclear Gene Sequences in Plant Phylogenetics," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37 (3), 121-147, (2002).
- [54] Hadidi, A. ve Candresse, T., "*Polymerase Chain Reaction*", *Viroids*, 115-122, (2003).
- [55] Soltis, P., Soltis, D. ve Doyle, J., "*Molecular Systematics of Plants*", New York: Chapman and Hall, (1992).
- [56] Ansorge, W., "Next-Generation DNA Sequencing Techniques", *New Biotechnology*, 25 (4), 195-203, (2009).
- [57] Jeanmougin, F., Thompson, J., Gouy, M., Higgins, D. ve Gibson, T., "Multiple Sequence Alignment with Clustal X", *Trends in biochemical sciences*, 23 (10), 403-405, (1998).
- [58] Singh, G., "Plants Systematics: An Integrated Approach", *Science Publishers*, (2004).
- [59] Baldwin, B. G., (Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA. Congruence of ETS and ITS trees of Calycadenia (Compositae)), *Molecular Phylogeny Evolution*, 10, 449-463, (1999).
- [60] Anderberg, A., "Phylogenetic relationships in the Primulales inferred from rbcL sequence data", *Plant Systematics and Evolution*, 211, 93-102, (1998).