

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



**TÜRKİYE'DEKİ *LUPINUS* L. (FABACEAE) TÜRLERİNİN  
MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NUR GÖKÇE ÇETİNER**

**BALIKESİR, OCAK - 2013**

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



**TÜRKİYE' DEKİ *LUPINUS* L. (FABACEAE) TÜRLERİNİN  
MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NUR GÖKÇE ÇETİNER**

**BALIKESİR, OCAK- 2013**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Nur Gökçe ÇETİNER** tarafından hazırlanan “**TÜRKİYE’ deki LUPINUS (FABACEAE) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02.01.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI olarak kabul edilmiştir.

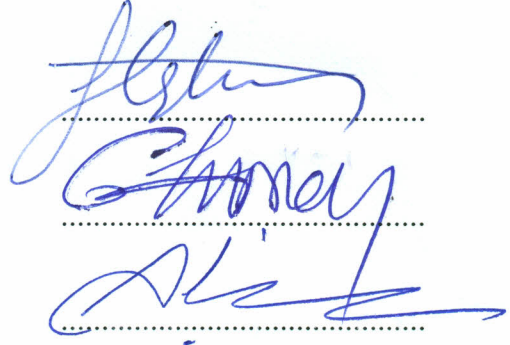
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Üye  
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN

Üye  
Doç. Dr. Ekrem AKÇİÇEK



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

**Bu tez çalışması kısmen TÜBİTAK tarafından 108T158 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**TÜRKİYE’ DEKİ *LUPINUS* L. (FABACEAE) TÜRLERİNİN  
MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
NUR GÖKÇE ÇETİNER  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: YARD. DOÇ. DR. FATİH COŞKUN)

BALIKESİR, 2013

Davis’in Türkiye Florası’ na göre ve yayınlanmış olan diğer literatürlere göre Türkiye’ de *Lupinus* (*Fabaceae*) cinsine ait 6 türe ait toplam 8 takson bulunmaktadır. Bu türlere ek olarak, *Lupinus luteus* Ikaria adalarında yetişmektedir. Türkiye Florası’ nın ek cildinde yer aldığı için bu çalışmaya dahil edilmiştir.

*Lupinus* (*Fabaceae*) cinsinin yeryüzünde yayılış gösteren yaklaşık 300 tane türü olduğu düşünülmektedir. Bu türler Eski Dünya Lüpenleri ve Yeni Dünya Lüpenleri olmak üzere iki farklı gen merkezinde yayılış göstermektedirler. Bu cinsin sistematigi hala problemlidir. Hala dünya çapında birçok araştırmacı bu cinsin sistematigini açıklığa kavuşturmak için çalışmalar yapmaktadır. Her yıl *Lupinus* (*Fabaceae*) cinsi için uluslar arası kongreler ve konferanslar düzenlenmektedir.

Ülkemizde bu cins için yapılan çalışmalara bakacak olursak bu çalışmalar, anatomi, zirai, biyokimya çalışmaları gibi alanlarda yapılmaktadır. Ülkemizde yetişen *Lupinus* (*Fabaceae*) türleri için moleküler sistematik bir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışma ile Türkiye’ de yetişen *Lupinus* L. (*Fabaceae*) cinsine ait taksonların ITS nrDNA dizileri elde edilmiştir. Dizilerin elde edilmesinden önce fenol-klorform-izoamil alkol DNA izolasyon yöntemi, CTAB DNA izolasyon yöntemi ve ticari kitler kullanılmıştır. ITS bölgesinin dizilenmesi için evrensel ITS5A ve ITS4 primerleri kullanılmıştır. PCR tekniği ile ITS bölgeleri çoğaltılmıştır. Elde edilen diziler Sequencher 4.10.1 adlı programda işlenmiş, ClustalW programı ile hizalanmış ve NEXUS formatına dönüştürülmüştür. En son NEXUS data PAUP\* 4.0b10 programı ile analiz edilmiş ve filogenetik ağaçlar elde edilmiştir.

PAUP\*\* da yapılan analizlerde parsimoni kriteri kullanılarak, karakter temelli yöntemlerden Heuristic Search, Bootstrap analizi ve Branch-and-Bound algoritması kullanılmıştır. Mesafe temelli yöntemlerden ise UPGMA ve NJ algoritmaları kullanılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda *L. angustifolius* ve *L. angustifolius* subsp. *reticulatus*’ un bir monofiletik grup oluşturduğu, *L. albus* ve *L. albus* subsp. *graecus*’ un bir monofiletik grup oluşturduğu belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Lupinus* (*Fabaceae*), ITS nrDNA, moleküler sistematik, filogenetik analiz.

## ABSTRACT

### MOLECULAR SYSTEMATIC ANALYSIS OF *LUPINUS* L. (FABACEAE) SPECIES IN TURKEY

MSC THESIS

NUR GÖKÇE ÇETİNER

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. FATİH COŞKUN )

BALIKESİR, 2013

According to The Flora of Turkey and other published literature, there are 8 taxa belonging 6 species growing in Turkey. *Lupinus luteus* grows in Ikaria Island. This work includes *Lupinus luteus* since it is contained in the Flora of Turkey's additional volume.

The genus *Lupinus* (*Fabaceae*) has about 300 species around the world. These species are widely distributed in two major gene centers. One of them is The Old World Lupin and the other one is The New World Lupin. Many researchers in the world are still studying on the systematics of *Lupinus*. Many international conferences and congresses are organized every year about systematics of *Lupinus*.

The studies about *Lupinus* in Turkey is have been conducted in the areas of agriculture, anatomy and biochemistry. But there is no study about molecular systematics of the Turkish lupins.

In this study, ITS nrDNA sequences of *Lupinus* species are obtained using ITS5A and ITS4 primers. First, gDNA was extracted by phenol-chloroform-isoamylalcohol and CTAB DNA extraction methods, and by some commercial extraction kits. Then entire ITS nrDNA region was amplified by PCR techniques.

DNA sequences were edited using Sequencher 4.9.1 program. ClustalW program was used for alignment of sequences. Finally, PAUP\* 4.0b10 program was used for phylogenetic and phenetic analyses of DNA sequences.

During the analysis, heuristic search and Branch and Bound, some of the character based methods, were implemented by using parsimony criterion. Bootstrap analysis was performed parsimony criterion as phylogenetic methods. UPGMA and NJ were employed as distance based methods for the phenetic analyses. All in all, the results were evaluated. As a result, *L. angustifolus* and *L. angustifolius* subsp. *reticulatus* is a monophyletic group, *L. albus* and *L. albus* subsp. *graecus* is a monophyletic group.

**KEYWORDS:** *Lupinus* (*Fabaceae*), ITS nr DNA, molecular systematics, phylogenetic analysis.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ .....	vii
KISALTMA LİSTESİ .....	viii
ÖNSÖZ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1    Fabaceae ( Leguminosae).....	1
1.1.1 <i>Lupinus</i> Genusu .....	3
1.1.1    Türkiye’de Yayılış Gösteren <i>Lupinus</i> L. Türleri .....	3
1.1.1.1 <i>Lupinus albus</i> .....	4
1.1.1.2 <i>Lupinus albus</i> subsp. <i>albus</i> .....	4
1.1.1.3 <i>Lupinus albus</i> subsp. <i>graecus</i> .....	5
1.1.1.4 <i>Lupinus angustifolius</i> .....	5
1.1.1.5 <i>Lupinus angustifolius</i> subsp. <i>reticulatus</i> .....	6
1.1.1.6 <i>Lupinus micranthus</i> .....	6
1.1.1.7 <i>Lupinus varius</i> .....	7
1.1.1.8 <i>Lupinus hispanicus</i> .....	7
1.1.1.9 <i>Lupinus luteus</i> .....	8
1.1.1.10 <i>Lupinus anatolicus</i> .....	9
1.1.2    Literatür Özeti .....	10
<b>2. MOLEKÜLER SİSTEMATİK .....</b>	<b>13</b>
2.1    Markır Tipleri.....	13
2.1.1    Morfolojik Markırlar.....	13
2.1.2    Biyokimyasal Markırlar .....	14
2.1.3    Moleküler Markırlar .....	15
2.2    Hibridizasyona (Melezlemeye) Dayanan Markırlar .....	16
2.2.1    RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntemi ..	16
2.3    PCR Tekniğine Dayanan Moleküler Markırlar.....	17
2.3.1    RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Yöntemi.....	18
2.3.2    SSR (Simple Sequence Repeats) Yöntemi .....	19
2.3.3    ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) Yöntemi .....	19
2.3.4    SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions/ Diziyile Krakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler) Yöntemi .....	20
2.3.5    CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence/ Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Diziler) Yöntemi .....	20
2.3.6    AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) Yöntemi ....	21
2.3.7    SRAP (Sequence Related Amplified Polimorphism/ Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm) Yöntemi .....	22
2.4    DNA Dizilemesine Dayalı Markırlar .....	22
2.4.1    Nükleer Markırlar: nrDNA .....	22

2.4.2	ITS (Internal Transcribed Spacer) .....	23
2.4.3	ITS' in Genel Özellikleri .....	24
2.4.4	ITS' in Taksonomide Tercih Edilmesinin Nedenleri.....	25
2.4.5	nrDNA Bölgeleri.....	26
2.4.6	Küçük Alt Birim nr DNA (18S) .....	26
2.4.7	5.8S nrDNA .....	26
2.4.8	Büyük Alt Birim nrDNA (28S, LSU).....	27
2.5	<i>DNA Dizileme</i> .....	27
2.5.1	Maxam ve Gilbert'in Kimyasal Kırılma Yöntemi.....	28
2.5.2	Sanger ve Coulson' un Zincir Sonlanma Yöntemi .....	28
2.5.3	Otomatik DNA Dizileme Yöntemi .....	30
2.5.4	Dizilerin Hizalanması, CLUSTALW ve MULTALIN.....	31
2.6	<i>Filogenetik Analiz</i> .....	32
2.6.1	Filogenetik Ağaç.....	34
2.6.2	Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler .....	35
2.6.2.1	Karakter Temelli Yöntemler .....	36
2.6.2.1.1	Maximum Parsimoni (MP) Metodu.....	36
2.6.2.2	Maximum Olasılık (ML) Metodu .....	37
2.6.2.3	Bayes Metodu .....	37
2.6.2.4	Mesafe Temelli Yöntemler .....	38
2.6.2.4.1	UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means).....	38
2.6.2.4.2	Neighbor-Joining Metodu.....	38
2.6.3	Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar	39
2.6.3.1	PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods) .....	39
2.6.3.2	Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny) .....	40
2.6.3.3	PHYLIP (The Phylogeny Inference Package) .....	40
<b>3.</b>	<b>MATERYAL METOD</b> .....	<b>42</b>
3.1	<i>Bitki Materyallerinin Toplanması ve Saklanması</i> .....	42
3.2	<i>Dış Grup Seçimi</i> .....	44
3.3	<i>Kullanılan Kimyasal Maddeler</i> .....	44
3.3.1	Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ..	44
3.3.2	Agaoroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasallar .....	46
3.3.3	PCR İçin Gerekli Kimyasal Malzemeler .....	46
3.3.4	DNA İzolasyonları .....	47
3.3.4.1	Fenol-Klorofom-İzoamilalkol DNA İzolasyon Yöntemi.....	47
3.3.4.2	CTAB DNA İzolasyon Yöntemi.....	48
3.4	<i>Agaroz Jel Elektroforezi</i> .....	50
3.5	<i>DNA Miktar Tayini</i> .....	50
3.6	<i>PCR Reaksiyonları</i> .....	50
3.7	<i>Verilerin Toplanması</i> .....	51
3.7.1	DNA Dizilerinin Eldesi (Cycle Sequencing) ve Poliakrilamid Jelde ya da Kapiler Elektroforezle Görüntülenmesi .....	51
3.7.2	DNA Dizilerinin Görsel Olarak Sequencher ile Gözden Geçirilmesi .....	51
3.7.3	DNA dizilerinin homoloji açısından CLUSTAL veya MULTALIN ile hizalanması .....	52
3.7.4	Hizalanmış verilerin #NEXUS formatına çevirimi ve PAUP*ta analize hazır hale getirilmesi .....	52



3.7.5 PAUP*' ta Filogenetik Analiz Yapımı .....	52
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>53</b>
4.1 <i>Genomik DNA</i> .....	53
4.1.1 DNA Miktar Tayinleri .....	55
4.2 <i>PCR Ürünleri</i> .....	55
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>59</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>66</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>72</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1: Faboideae alt familyasının karakteristik çiçek yapısı[4].....	2
Şekil 2: <i>Lupinus albus</i> [10].....	4
Şekil 3: <i>Lupinus angustifolius</i> .....	5
Şekil 4: <i>Lupinus micranthus</i> .....	6
Şekil 5: <i>Lupinus varius</i> [13] .....	7
Şekil 6: <i>Lupinus hispanicus</i> [14] .....	8
Şekil 7: <i>Lupinus luteus</i> [15] .....	9
Şekil 8: rDNA gen kümesi.....	23
Şekil 9: 18S-26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal Transcribed sequence (ITS) bölgesi[52] .....	24
Şekil 10: Dideoxynükleotidlerin genel yapısı[59].....	29
Şekil 11: Zincir sonlanma yöntemi sonucunda baz diziliminin saptanması[59] .....	30
Şekil 12: Otomatik dizi analizi sonucu oluşan pikler .....	31
Şekil 13: 1866' da Haeckel tarafından öne sürülen filogeniye dayalı sınıflandırma şeması[63] .....	33
Şekil 14: Fenol Kloroform izoamil alkol yöntemi ile elde edilen gDNA'ların jel görüntüsü.....	53
Şekil 15: CTAB yöntemi ile elde edilen gDNA'ların jel görüntüsü .....	54
Şekil 16: Analytik Jena Kit ile elde edilen gDNA' ların jel görüntüsü.....	54
Şekil 17: Bazı <i>Lupinus</i> türlerinin ITS ile elde edilen PCR görüntüsü.....	55
Şekil 18: Bazı <i>Lupinus</i> Türlerine ait ITS PCR jel görüntüsü .....	56
Şekil 19: Parsimoni kriteri kullanılarak elde edilen 1 nolu Heuristic Search ağacı .....	60
Şekil 20: Parsimoni kriterine göre elde edilen Bootstrap ağacı.....	62
Şekil 21: Parsimonu kriterine göre elde edilen Branch-and-Bound ağacı.....	63
Şekil 22: UPGMA ağacı .....	63
Şekil 23: NJ algoritması ile elde edilen filogenetik ağaç .....	64

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1:</b> Kimyasal Kırılma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar .....	28
<b>Tablo 2:</b> Kullanılan bitki materyalleri ve lokaliteleri.....	42
<b>Tablo 3:</b> Fenol-kloroform izoamil alkol yönteminde kullanılan solüsyonlar ve bileşimleri .....	45
<b>Tablo 4:</b> CTAB yönteminde kullanılan kimyasal maddeler.....	45
<b>Tablo 5:</b> 5X TBE Hazırlamak için kullanılan malzemeler ve miktarları .....	46
<b>Tablo 6:</b> PCR' da kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	46
<b>Tablo 7:</b> Kullanılan Primerler ve dizileri .....	47
<b>Tablo 8:</b> PCR programının özellikleri.....	51
<b>Tablo 9:</b> gDNA' ların spektrofotometre ölçümleri .....	55

## KISALTMA LİSTESİ

**RFLP** : Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism)

**PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction)

**RAPD** : Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (random amplification of polymorphic DNA)

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

**SSR** : Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeat)

**VNTRs** : Çeşitli Sayıda Ardışık Tekrarlar (Variable Number Tandem Repeats)

**ISSR** : Basit İç Dizi Tekrarları (Inter-Simple Sequence Repeat)

**CAPS** : Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (cleaved amplified polymorphic sequence)

**ESTs** : İşaretli İfade Edilen Diziler (Expressed Sequence Tag)

**SNP** : Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

**SSCP** : Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm (Single-strand Conformation Polymorphism)

**STS** : Dizisi Etiketlenmiş Alanlar (Sequence Tagged Site)

**SPAR** : Tek Primerle Çoğaltılmış Reaksiyon (Single Primer Amplification Reaction)

**SRAP** : Diziye İlişkin Çoğaltılmış Polimorfizm (Sequence-related Amplified Reaction)

**ITS** : Internal Transcribed Spacer

**cDNA** : Complementary DNA (Komplementer DNA)

**dNTP** : Deoksiribonükleosid Trifosfat

**ddNTP**: Dideoksiribonükleosid Trifosfat

**DMSO**: Dimetil Sülfoksit

**DNA** : Deoksiribo Nükleik Asit

**mtDNA**: Mitokondri DNA'sı

**Taq** : *Thermus aquaticus*

**gDNA** : Genomik DNA

**TE** : Tris-EDTA

**EDTA** : Etilendiamintetraasetik Asit

**MP** : Maximum Parsimony (Maksimum Parsimoni)

**ML** : Maximum Likelihood (Maksimum Olasılık)

**PAUP** : Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Method (Parsimoni ve diğer metodları kullanarak Filogenetik analiz)

**PHYLIP**: The Phylogeny Inference Package

**bp** : Baz Çifti

**DNA** : Deoksiribonükleik Asit

**ETS** : External Transcribed Spacer

**IGS** : Intergenic Spacer (Dış transkribe uğramış alan)

**mat K** : Maturase K geni

**cpDNA** : Kloroplast DNA

**NOR** : Nükleolar Organizer Region

**nrDNA** : Nüklear Ribozomal DNA

**NTS** : Non Transcribed Spacer (Transkribe uğramamış alan)

**SSU** : Small Subunit (Küçük alt ünite)

**ETOH** : Etil Alkol / Etanol

**rpm** : Dakikadaki Döngü Sayısı

**TBE** : Tris-Borikasıit- EDTA

**UPGMA**: Unweighted Pair-Group Metod of Arithmetic Averages

**NJ** : Neighbour Joining (Komşu katılımı)

**MEGA** : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**dH<sub>2</sub>O** : Distile Su

**NaCl** : Sodyum Klorür

**NaAc** : Sodyum Asetat

**L.** : Linne

**T<sub>m</sub>** : Erime Sıcaklığı

**NCBI** : National Center For Biotechnology Information

**MgCl<sub>2</sub>**: Magnezyum Klorür

## ÖNSÖZ

Bu çalışma 2012 yılında, Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarları'nda yüksek lisans çalışması olarak yürütülmüştür.

Bu tezin oluşma sürecinde benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen, her zaman en iyisini öğretmek için üstün çaba sarfeden, yeri geldiğinde bir arkadaş bir baba gibi bizlere yardımcı olan danışman hocam Yard. Doç Dr. Fatih COŞKUN' a teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman bilgi ve birikimlerinden destek aldığım hocalarım Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR' a ve Prof. Dr. Feray TURA KÖÇKAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bana destek olan, hoşça vakit geçirdiğim arkadaşlarım Cüneyt TEZ' e, Gülsüm GÖREN' e, Necla ŞAHİN'e ve Emre SEVİNDİK'e, FC LAB ailesine yeni katılmış diğer araştırmacı arkadaşlarımın hepsine ve ED LAB araştırmacılarına teşekkürlerimi sunarım.

DeneySEL aşamalarımızda sürekli olarak bizleri destekleyen BAÜ-BÜTAM kuruluşuna teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak bin bir zorlukla beni okutan, daha anne karnına ilk düştüğüm günden itibaren sıkıntı verdiğim, her şeye rağmen bana destek olan, her zaman yanımda olan ÇETİNER ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Fabaceae ( Leguminosae)

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermathophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledonae
Subclass	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Subfamilia	: Faboideae
Tribe	: Genistae
Subtribe	: Lupininae
Genus	: <i>Lupinus</i> L.

Fabaceae familyası büyük ve önemli familyalar içerisinde yer alır; 450-500 cinse ait 1300 kadar türü vardır.[1] Odunsu veya otsu bitkilerdir. Yapraklar alternat, genellikle stipulat, basit bipinnat, digitat, trifoliolat, unifoliolat veya phyllodiktir. Çiçekler aktinomorf yada zigomorftur, hipogin veya bazen perigindir, genellikle hermafrodittir ve rasemözdür. 4 ya da 5 sepal vardır, bir sepal daima öndedir. Petaller 1-5 tane, valvat veya imbrikat, petaller serbest ya da nadiren kısmen connivent. Stamenler monadelf, diadelf ya da tamamı serbest şekildedir. Meyvesi legümen (bakla) olarak adlandırılır. 1 ve daha fazla tohumludur.[2]



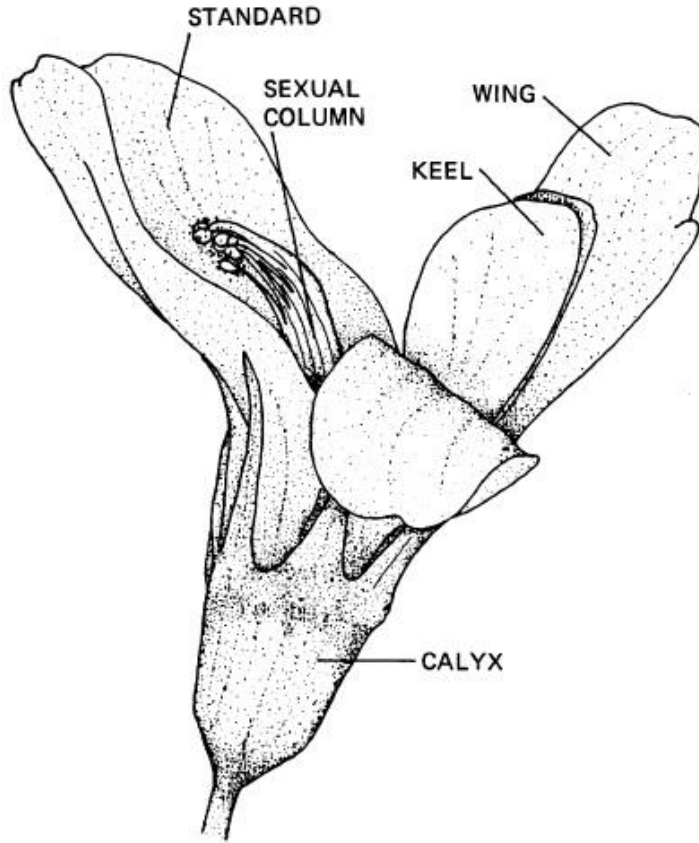
Bu familya üç alt familyaya ayrılır. Bazı araştırmacılar bu altfamilyaları ayrı birer sınıf olarak kabul ederler.

**1) Mimosoidae:** Ağaç, çalı veya otsu bitkilerdir. Yapraklar çift tüysü (katlı tüysü) dür. Çiçekleri aktinomorf, küçük, başçık veya başak tipi çiçek durumu oluştururlar. Çanak bileşik, bazen körelmiştir. Taç az belirgin, stamenler serbest veya bileşik, filamentler uzun ve renkli, polenler kitle halindedir.

**2) Caesalpinioideae:** Ağaçlar, çalılar, ender olarak otsu bitkilerdir. Yapraklar basir tüysüdür. Çiçekler aktinomorftur. Petaller alttan üste doğru birbirini kiremitvari örterler. Stamenler serbesttir.

**3) Faboideae (Papilionaceae, Papilionatae):** Çoğunlukla otsu, çalı veya yarı çalılar, ender olarak ağaçlardır. Yapraklar üçgül, tüysü, basit (tam kenarlı) veya elsidir. Çiçekleri zigomorf, nadir olarak aktinomorftur, salkım tipi çiçek durumu oluştururlar. Petallerin üçü serbest ikisi bileşiktir. Üst taç yaprak büyük ve dik olup Bayrak (Standard), yanlardaki iki küçük taç yapraklar ise Kanat (Keel/Wings), en alttaki iki taç yaprak birlikte büyür ve Kayıkçık (Karina)' yı oluştururlar. Meyve legümandır.[3] Karakteristik çiçek yapısı şekil 1'de verilmiştir.[4]

Bu alt familya on tribusa ayrılır. Genistae tribusu bu alt familya altında yer alır ve *Lupinus* genusu bu tribus altında yer alır.[3]



Şekil 1: Faboideae alt familyasının karakteristik çiçek yapısı[4]

### 1.1.1 *Lupinus* Genusu

*Lupinus* genusu Magnoliopyta (Angiospermae) divizyonu, Magnoliatae (Dicotyledoneae) alt sınıfı, Rosanae Takht. Süper ordosu, Fabales Nakai ordosu, Fabaceae familyası, Lupinae Hutch. Tribüsü altında yer alır.[5]

Genus, adını Latince kurt anlamına gelen lupus sözcüğünden almaktadır. Bunun kurt ayak izlerine benzeyen palmat yapraklarla bağlantılı olduğu düşünülmüştür.[6]

Bu genus tek yıllık ve çok yıllık otsu, fruktoz türlerden oluşmaktadır. Lüpenler kazık kök sistemine sahiptir. Ana kök 1-2 m derinliğe ulaşır. Kökler, özellikle ana eksen havadaki nitrojeni fikse eden *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) bakteri nodülleri taşır. Derinlere inen kökleri ile nitrojeni iyi fikse edebilmesi bu genusa 'lupus' adının verilmesinin başka bir nedeni olabilir.[5]

Birleşik palmat yapraklar, elongat sitüpül tarafından uzun petiol üzerinde gövdeye bağlanır. Yaprakçıkların şekilleri çeşitlidir; oval oblong, dar lineer, lanseolat. Yaprakçıkların yüzeyi çoğu durumda tüylüdür.

Çiçek durumu vertisillat veya semi-vertisillattır. Korolla zigomorfiktir. Çiçek bir bayrak, kanatlar ve karina ile ovaryum ve 10 adet stamenden oluşur.

Meyveler orbikular, basık, düz veya kavisli, hafifçe sıkılmıştır. Kabuk yüzeyi sert, kabuk rengi krem, kahve veya siyahtır. Tohumlar büyüklük, şekil ve renk bakımından çeşitlidir. Tohum yüzeyi pürüssüzdür. Tohum sapı mikropil üzerinde asılıdır. Bükülmüş embriyo besin maddelerinin saklandığı kotiledonun üzerinde yer alır. Birincil gerçek yapraklar karşılıklıdır. Diğer yapraklar alternattır.[5]

### 1.1.1 Türkiye'de Yayılış Gösteren *Lupinus* L. Türleri

*Lupinus* L. cinsi Türkiye'de 6 türe ait 8 taksonla temsil edilmektedir. Bu türler *L. angustifolius*, *L. angustifolius* subsp. *reticulatus*, *L. albus*, *L. albus* subsp. *graecus*, *L. micranthus*, *L. varius*, *L. hispanicus*, *L. luteus*, *L. anatolicus*. [2, 7-9]

### 1.1.1.1 *Lupinus albus*

Kısa tüylü, tek yıllık bir bitkidir. 120 cm' ye kadar boylanabilir. Yaprakçıklar 25-35 x 14-18 mm' dir. Yaprakçıklar obovat, mukronat ve her iki yüzü tüylüdür. Çiçekler rasemoz 15-16 mm, alternat dizilişli. Kaliks 8-9 mm, kaliksin her iki dudağı da loblu. Korolla 15-16 mm, rengi beyazdan maviye doğru. Legüm ilk başta kılsı çıkıntılı, sonra glabrescent ve sarı renkli. Tohumlar 8-14 mm ve düz yüzeyle. Çiçeklenme zamanı 5-6 aylar arasında.[2]

### 1.1.1.2 *Lupinus albus subsp. albus*

Korolla beyaz, keel'in tepesi soluk mavi, legüm 80-100 X 14-20 mm, tohumlar 10-14 mm ise *Lupinus albus subsp. albus*. *Lupinus albus subsp. albus*' un sinonimi *Lupinus termis* Forssk ' tir. Yenilebilen tohumları için yetiştirilmektedir. Bursa ilinde yetiştirildiği rapor edilmiştir. Türkiye'de; A1(E) Çanakkale: Gallipoli, Durham, A2 (A) İstanbul: Paşabahçe' de rapor edilmiştir.[2]



Şekil 2: *Lupinus albus* [10]

### 1.1.1.3 *Lupinus albus subsp. graecus*

Korolla tamamen mavi, legüm 60-70 X 11-13mm, tohumlar 8-9 mm ise *Lupinus albus subsp. graecus*. Bu takson A2 (A) İstanbul- Paşabahçe yakınlarında ve A3 Bolu- Akçakoca yakınlarında rapor edilmiştir.[2]

### 1.1.1.4 *Lupinus angustifolius*

Kısa tüylü, tek yıllık , 20-80 cm arası boylanabilir. Yaprakçıklar 20-50 x 2-4 mm, düz, linear veya spatulat. Çiçekler alternat dizilişli. Korolla 11-13 mm ve mavi. Kaliksin üst dudağı iki parçalı. Legüm 35-60 x (6-) 8-13 mm, kısa ve tüylü. Legüm rengi sarıdan siyaha doğru. Tohumlar 6-7 mm, düz ve çeşitli renklerde. 3-5. aylarda çiçeklenir. Deniz seviyesinden 100 m yüksekte, hafif topraklarda yetişir. Türkiye’de; A1 (E) Çanakkale, A2 (E) İstanbul: Rumelihisarı, A2 (A) Kocaeli: Hereke, B1 İzmir: Emiralem, C1 Muğla: Bodrum, C2 Aydın: Yenipazar, C4 Adana: Anamur’ da rapor edilmiştir. [5]



Şekil 3: *Lupinus angustifolius*

### 1.1.1.5 *Lupinus angustifolius* subsp. *reticulatus*

Kısa tüylü, tek yıllık, 20-40 cm boylanabilir. Yaprakçıklar 10-20 x 2 mm, condiplucat veya linear. Legüm 35-45 x 6-8 mm. Tohumlar 4.5-5 x 3-3.5 mm. 4-5. Aylarda çiçeklenir. Türkiye’de B1 Balıkesir: Ayvalık (Sarımsaklı/Küçükköy)’ de rapor edilmiştir. Doğal yaşam alanı Yugoslavya’ dır.[7]

### 1.1.1.6 *Lupinus micranthus*

Lanat, tek yıllık, karışık renkli indumentuma sahip ve 10-40 cm boylanabilir. Yaprakçıklar 15-70 x 5-15 mm, obovat, mukronat, alt ve üst yüzeyi tüylü. Rasemöz 5-12 cm, alt çiçekler alternat, üst çiçekler düzensiz vertisillat. Çiçek sapı 3-8 mm. Kaliks 2 parçalı, alt dudaklar derin 3 parçalı. Korolla 10-14 mm ve mavi. Standart ve keel’ de beyaz lekeler var. Legüm 30-50 x 10-12 mm. 3-4 tohumlu. Legüm yoğun şekilde kahverengi. Tohumlar düz ve değişik renklerde. 3-5. aylarda çiçeklenir. Deniz seviyesinde doğal olarak yetişir. Türkiye’ de; A1 (E) Çanakkale: Suvla, A2 (E) İstanbul: Ortaköy, A2 (A) İstanbul: Yakacık, Kocaeli: Zhukovsky, A5 Sinop: İnceburun’ da rapor edilmiştir.[11]



Şekil 4: *Lupinus micranthus*

### 1.1.1.7 *Lupinus varius*

Kılsı, çıkıntılı, tek yıllık, 15-50 cm' e kadar boylanabilir. Yaprakçıklar 25-25 x 6-9 mm, oblong, obovat, mukronat, alt ve üst yüzeyi tüylüdür. Rasemöz 8-10 cm' dir.

Çiçekler düzensiz helezonik şekilde dizilmiş. Çiçek sapı 6-15 mm. Kaliks iki parçalı üst dudak ile birlikte. Alt dudak tamamen üç parçalı. Korolla 13-22 mm ve mavi. Standart beyaz lekeli. Legüm 35-60 x 8-20 mm, 2-4 tohumlu ve kırmızımsı kahve renginde. Tohumlar 7-9 mm, tüberkülat ve çeşitli renklerde. 3-5. aylarda çiçeklenir. Hafif kumlu topraklarda, maki örtüsünün bulunduğu alanlarda 500 m yükseklikte yetişir. Bazen kültürünün yapıldığı görülmüştür. Türkiye'de; A1 (E) Tekirdağ: Naipköy, A2 (E) İstanbul: Belgrad Ormanı, C3 Antalya: Kumköy, C4 Adana: Anamur, C6 Adana: Bahçe' de rapor edilmiştir.[12]



Şekil 5: *Lupinus varius* [13]

### 1.1.1.8 *Lupinus hispanicus*

Villous, tek yıllık. Yaprakçıklar 40-60 x 8-12 mm, obovat, oblong fakat mukronat değil. Rasemöz 5-16 cm. Çiçekler düzenli şekilde sıralanmış. Korolla 13-16 mm, ilk önce kremi bir renge sahip daha sonra pembe ve mor. Kaliksin üst dudağı iki parçalı. Legüm 40-50 x 10 mm, kısa tüylü, yeşil yada siyah. Tohumlar 4.5-6 mm, tüberkülat ve çeşitli renklerde. 5. ayda çiçeklenir. Kumlu topraklarda,

kuru dere yataklarında, 720 m' den daha yüksek alanlarda yetişir. Türkiye'de B1 İzmir: Yamanlar, C1 Aydın: Arslanlı, Megen Çayı' nda rapor edilmiştir.[12]



Şekil 6: *Lupinus hispanicus* [14]

#### 1.1.1.9 *Lupinus luteus*

Dikenli, tek yıllık, 20-80 cm boylanabilir. Yaprakçıklar mukronat, obovat, oblong, 30-60 x 8-15 mm, sitüpül dimorfik, yapraklar subulat. Çiçek durumu rasemöz, 5-25 cm. Çiçekler vertisillat dizilişli. Çiçek sapı kısa. Kaliksin üst dudacı 6-7 mm ve çok derin yarıklı. Alt dudak 10 mm ve 3 dişli. Korolla altın sarısı, 14-16 mm. Legüm villous, 40-60 x 10-14 mm. 4-6 tohumlu, tohumlar 6-8 mm ve düz. 4-5. Aylarda çiçeklenir. 500 m yükseklikte, kumlu ve asitli topraklarda, kuzeye bakan yamaçlarda yetişir. İkaria adası Mavrati'de rapor edilmiştir.[9]





Şekil 7: *Lupinus luteus*[15]

#### 1.1.1.10 *Lupinus anatolicus*

Tek yıllık, 40 cm' e kadar boylanabilir. Gövde ve çiçek sapı yoğun şekilde kıllı. Beyaz yayılmış tüyler 3 mm. Sitüpüller linear, 14 x 1 mm. Yaprakçıklar 7-9 mm, oblanceolat, koyu yeşil, her iki yüzü de kıllı. Çiçeklenme rasemöz, oldukça uzun çiçek sapı var. Çiçekler 19-24 mm, subvertisillat şeklinde dizilmiş. Kaliksin üst dudağı belirgin şekilde 2 parçalı, alt dudak ise bütün halinde. Satandart mavi ve üzerinde büyük beyaz bir leke var. Keel beyaz, tepe kısmı kahvemsî. Legüm 50-65 x 18-22 mm, 3-5 tohumlu, yoğun şekilde kıllı. Tohumlar 10-12 x 6-10 x 4-5 mm, yassı şekilde geniş, basık ve düz, kahverengi. 3-5. aylarda çiçeklenir. *Lupinus varius*' a benzerlik gösterir fakat pürüzsüz tohumları ile morfolojik olarak *Lupinus varius*' tan ayrılır. Kimyasal taksonomiye göre, 2 kat daha az alkaloid içerir. Türkiye'de C1 Aydın: Efes – Kuşadası arasında rapor edilmiştir. Türkiye'ye endemiktir.[8]



### 1.1.2 Literatür Özeti

Lupinus genusunun içerdiği tür sayısı hakkında açık bir görüş yoktur. Sayılarının 100-200 ile 800-1000 tür arasında değiştiği düşünülmektedir. Lupinus türleri iki geniş alanda yayılış göstermektedir: Akdeniz ülkeleri ve Afrika, ikinci bölge ise Amerika.

*Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* ve *Lupinus luteus* pek çok ülkenin tarımsal alanda en çok ürettiği *Lupinus* türlerindedir. Lüpenlerin tarımda kullanılması çok eski tarihlere dayanır ve Akdeniz tarım sisteminin önemli bir elementidir.[5]

Lüpen türlerinin tarım sistemine çeşitli yollarla katkıları bulunmaktadır. Akdeniz bölgesindeki Lüpenler çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Yeşil gübre, toprak koruma ve hayvancılıkta doğrudan otlak olarak kullanımı mevcuttur.

Pek çok lüpen türü eski tarımcılar tarafından tahımları için, yeşil gübre ve yem olarak kullanılmıştır. Eski Romalılar ve Yunanlılar beyaz lüpeni toprak ıslahı için kullanırlardı. Lüpen tohumları hala Akdeniz bölgesindeki pek çok ülkede meze olarak tüketilmektedir.

20. yüzyılın ikinci yarısından sonra bazı Lüpen türleri önemli tarım bitkisi haline gelmiştir. 20. yüzyılda üç *Lupinus* türü evcilleştirilmiş ve ticari kabul görmüştür: *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* ve *Lupinus luteus*.[5]

Modern lüpen yetiştiriciliği 1920'lerde Almanya'da başlamıştır. Almanya'da Dr. von Sengbusch çeşitli, alkaloid içermeyen lüpen türleri geliştirdi. [17]

*Lupinus* genusuna ait türlerin azotlu gübreye ihtiyacı yoktur. Bu da bu türleri tarım için elverişli hale getirmektedir. Nominotypical alt tür olan *Lupinus albus* subsp. *albus* insan besini olarak tüketilmesi açısından uzun bir geçmişe sahiptir.[16] *Lupinus albus* subsp. *albus* tohumları diyabet ve intestinal parazitlerin tedavisinde tıbbi bitki olarak da kullanılmaktadır.[17]

Alkaloid oranı düşük olan lüpen türleri insan ve hayvan beslenmesinde güvenle kullanılmaktadır. Lüpen tohumları çok değerli içerik maddelere sahiptir.

Lüpen tarımının toprak yapısını düzeltmesi, derine inen kazık kökleri ile alımı zor olan Fosfordan faydalanma, daha sonra gelecek olan bitkilere ideal yapıda bir ortam bırakma gibi avantajları vardır.[18]

Lüpenler protein kaynağı, lif ve mevcut yan ürünleri takviyesi için kullanılabilir. Aynı zamanda ekmek, bisküvi, makarna ürünleri ve diğer gıda ürünlerinde de kullanılabilirler.[19] Lüpenler yüksek protein oranına sahip (%28-47.6) ve diğer baklagillerin yetişemediği marjinal alanlarda yetişebilen özel bir bitkidir.[20]

Acıbakalar uzun yıllardır yeşil gübre, yem bitkisi ve tohumlarından insan ve hayvan beslenmesinde yararlanılan bitki türleri olarak bilinmektedir. Bazı acıbakla türlerinden süs bitkisi olarak da yararlanılmaktadır. Özellikle son yıllarda farklı acıbakla türleri mevsimlik çiçek olarak önerilmekte ve kesme çiçek kataloglarında yer almaktadır.[21]

Ainocuhe ve arkadaşları 2004 yılında *Lupinus* cinsine ait 47 takson içeren bir çalışma yayınlamışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar nrDNA ITS dizilerini kullanmış ve *Lupinus* genusunun filogenetik pozisyonunu saptamışlardır. Bu çalışma Türkiye’ de yetişen bütün *Lupinus* türlerini içermemektedir. Çalışmanın sonuçlarına göre Eski Dünya Lupinleri ve Yeni Dünya Lupinleri monofiletik bir grup değildir. Doğu Amerika Kladı ve Batı Amerika Kladı olarak ayrılırlar.[22]

Swiçcicki ve arkadaşları, 1995 yılında, *Lupinus anatolicus*’ u Eski Dünya Lupinleri’ nin yeni bir üyesi olarak tanımlayan çalışmalarını yayınlamışlardır. Bu çalışmada *Lupinus anatolicus*, 20 morfolojik karakter, bazı fizyolojik karakterler kemotaksonomik karakterler dikkate alınarak *Lupinus pilosus* ve *Lupinus micranthus* ile karşılaştırılmıştır.[23]

Camillo ve arkadaşları, 2006 yılında Güney Amerika Andean bölgesinde yetişen 16 *Lupinus* türünün kromozom sayıları üzerine sitotaksonomik bir çalışma yayınlamıştır. Bu çalışmada 16 *Lupinus* türüne ait 22 birey kullanılmıştır. Çalışmaya göre *Lupinus bandeliera* hariç diğer türler  $2n=48$  kromozoma sahiptir. *Lupinus bandeliera* ise  $2n=36$  kromozoma sahiptir. Çalışmanın sonuçlarına göre sitolojik

olarak, Andean Bölgesi (And Dağları) türlerinin büyük çoğunluğu Kuzey Amerika Türleri'ne Güney Amerika Türleri'nden daha yakındır.[24]

Conterato ve Wittmann, 2006 yılında bazı Amerika Lupinlerinin mayotik davranışları ve polen fertilitesi üzerine bir çalışma yayınlamıştır. Bu araştırmacılar 20 farklı Amerika Lupin'inin kromozom sayılarını da araştırmışlardır.[25]

Käss ve Winkk, 1996 yılında 55 farklı *Lupinus* türü üzerinde filogenetik bir çalışma yayınlamışlardır. Bu çalışmada *rbcL* genlerinin nükleotid dizileri ve ITS1+ITS2 nrDNA bölgeleri kullanılmıştır. Maximum Parsimoni ve Neighbour Joining algoritmaları kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır. Her iki veri seti kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçların çoğunlukla uyumlu olduğu görülmüştür. *Genistae* ve *Crotalarieae* kardeş gruplar olarak belirlenmiş ve *Hermopsidae/Podalyrieae* ile aynı atayı paylaştığı tespit edilmiştir. *Genistae* içinde monofiletik grup oluşturan *Lupinus* cinsi Eski-Yeni Dünya Lupinleri olarak belirgin bir ayrım gösterir.[26]

## 2. MOLEKÜLER SİSTEMATİK

Moleküler sistematik 1960 yılları esnasında protein içeriği, yakından ilgili türler arasında protein elektroforezi teknikleri kullanıldığı zaman ortaya çıkmıştır.[27] İlk zamanlarda allozimler bu analizler için araç olarak kullanılırdı. Fakat bu analizler proteinlerin gen düzeyindeki farklı elektroforetik hareketliliklerini anlamak için yeterince detaylı değildi.[28] Bu sorunlar moleküler sistematik çalışmaların gerekliliğini ortaya çıkardı.

1980' li yıllarda PCR tekniğinin keşfedilmesi ile bu tarz sorunların üstesinden gelinmeye başladı ve moleküler sistematik çalışmaları başlamış oldu. Diğer bir yandan morfolojik verilerle sistematikteki yeri belirlenemeyen cins ve familyaların varlığı araştırmacıları moleküler sistematığe yöneltti.

Moleküler sistematığın bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarında genomik DNA, mitekondri DNA'sı ve kloroplast DNA'sı moleküler veri olarak kullanılabilir.

Pek çok çeşitte moleküler sistematik tekniği mevcuttur. Bu teknikler DNA-DNA Hibridizasyonu, Protein markırların kullanılması veya PCR tabanlı teknikler olabilir. Bu teknikler içerisinde en popüler olanları PCR tabanlı olan tekniklerdir.

### 2.1 Markır Tipleri

#### 2.1.1 Morfolojik Markırlar

Morfolojik çalışmalar genellikle karmaşık ekipmanlar ve uzun hazırlık prosedürleri gerektirirler. Bu nedenle bir avantajları da ucuz yöntemler oluşlarıdır. Temel dezavantajlardan biri normal bir fenotip de gizli bir değişikliğin meydana gelip gelmediğinin garanti olmamasıdır. Bu değişiklikler resesif olarak meydana gelmiş olabilir ve sonuç olarak heterozigot formdadır. Bitkinin kendisine döl incelemesi yapılan kadar bu resesif değişiklikler görünmez.

Tek lokus ile ifade edilen morfolojik özellikler morfolojik markırlar olarak kullanılabilirler. Populasyon genetik yapısının belirlenmesi için yapılan ilk çalışmalar morfolojik markırlara dayanan çalışmalardır. Genetik yapının tamamı morfolojiye yansımadağı için morfolojik markırlar yeterli olmamaktadır. Ayrıca morfolojik özellikler çevreden ve diğler lokuslardan da etkilenirler. Bu nedenle günümüzde morfolojik markırlar kullanılarak yapılan çalışmalar gelişmiş teknikler kullanılarak yapılan çalışmalara göre daha azdır. [29]

### **2.1.2 Biyokimyasal Markırlar**

İzozim veya izoenzim kavramı Markır ve Moller tarafından üretilmiştir. Markır ve Moller izozimleri farklı moleküler formlardaki proteinler aynı enzimatik spesifiteye sahip olabilirler şeklinde tanımlamışlardır.[30]

Zon elektroforez ve histokimyasal boyanma kombinasyonu, moleküler çeşitliliğin teknik araçlarla çözülmesini sağla, bu biyoloji ve genetik alanının gelişmesinde yaygın şekilde kullanılmıştır.

Yaptığı son derlemede Markır, birçok türde biyolojik problemin araştırılmasında izoenzimlerin kullanıldığını kaydetmiştir. Bazen izoenzimler araştırma konusu olmuştur, bazen de diğler problemlerin çözülmesi için araç olarak kullanılmışlardır. İkincisi henüz bu araçların sistematik problemleri çözmek için uygulaması sınırlıdır. Günümüze kadar kesinlikle bazı izoenzim modelleri içeren karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır fakat bu çalışmaların pek çoğu sistematik ilişkilerin aydınlatılmasından çok bu taksonların biyokimyasal olarak tanımlanması ile ilgiliydi. Bu sorun açıkça izoenzim verilerin büyük ölçekli olması ile ilgili olup, bu sorunun henüz tatmin edici bir cevabı yoktur.[31]

Biyokimyasal markırlar, genlerin ürettiği proteinler olarak da tanımlanabilir. Farklı elektrik yüküne sahip bu proteinlere izoenzimler denir. İzoenzimler elektroforez yöntemleri kullanılarak birbirlerinden ayırtedilebilirler. Her enzimin spesifik olarak katalizlediği bir biyokimyasal reaksiyon vardır. Kendilerine özgü substratları ve kofaktörleri vardır. Bu reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir ve renkli ürünler elektroforez sonrası jel üzerinde görülebilir hale gelir. Bantlar halinde

görüntü meydana gelir ve bu bantlar genetik bilgi sağlamaktadır. Morfolojik markırlara oranla daha sık tercih edilmelerine rağmen izoenzim lokuslarının az olması ve çevre koşullarından olumsuz etkileniyor olması kullanımlarını kısıtlar.[32]

### 2.1.3 Moleküler Markırlar

Moleküler markırlar, kaynağını kendilerinin üretildiği bitkinin hücrelerinde bulunan DNA'lardan alır. Canlıların yapısını belirleyen şifre de DNA zincirlerinde olduğundan, moleküler markırlar bitki populasyonundaki çeşitlilik veya o populasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilirler. Bu gün moleküler markırlar bitki sistematğinde, ıslahında ve gen kaynaklarının değerlendirilmesinde etkin olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda sistematik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan moleküler Markırlar çeşitli avantajlara sahiptir;

1. Çevre faktörlerinden etkilenmezler,
2. Çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip mitekondri ve kloroplast gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışabilir,
3. Genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotrofiktirler. (Bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi)
4. Herbir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orjini tesbit edilebilir,
5. Sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir.

DNA markırlarında amaç, bireyler arasındaki DNA seviyesinde farklılığın ortaya çıkarılmasıdır. Eğer bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa bu bir allel olarak adlandırılır. DNA seviyesinde bunu yapmanın başlıca avantajı, herhangi bir DNA zincirinin, iki birey arasındaki allelik farklılığı gösterebilmesidir. Bunun için o DNA dizininin herhangi bir proteini kodlayıp kodlamadığını bilmeye bile gerek yoktur.

Kullanılacak markır sistemini etkileyen bazı faktörler vardır. Polimorfizmin seviyesi veya populasyonun tipi, farklı çevrelerdeki stabilitesi, lokus sayısı, kolaylık, analiz maliyeti, alt yapı bu kriterlerden bazılarıdır. Her moleküler markır yöntemi avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Markır seçimi bütün kriterler göz önünde bulundurularak amaca uygun olarak yapılır. Temelde, iki farklı DNA markır tekniği mevcuttur. Birincisi DNA hibridizasyonuna dayalı RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), diğeri ise PCR (Poylmerase Chain Reaction)'a dayalı SSR (Simple sequence repeats), RAPD (Random amplified polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) ve SRAP (Sequence related amplified polymorphism) gibi birçok sayıda tekniklerdir. Yeni yaygınlaşmaya başlayan ve sağlık bilimlerindeki araştırmaların öncülük ettiği SNP (Single nucleotide polymorphism), DNA zincirindeki tek nükleotid farklılığını kullanmaktadır. Bu teknik bitki genomuna ait DNA zincir bilgisini gerektirdiğinden, bitki bilimlerine girmesi gecikmiştir. Fakat řu anda sürmekte olan EST (Expressed sequence tags) projeleri SNP markırlarının geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır.[33]

## **2.2 Hibridizasyona (Melezlemeye) Dayanan Markırlar**

### **2.2.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Yöntemi**

İlk keşfedilen DNA markırıdır.[34] Southern blotting olarak da adlandırılan bu yöntem řu şekilde yürütülür: DNA, spesifik DNA bölgelerini kesen enzimlerle kesilir. Böylece bir tek enzimin kesebildiği, ancak farklı uzunluklarda DNA populasyonu oluşturulur, elektroforez yöntemi ile farklı büyüklükte DNA fragmentleri büyüklüklerine göre ayrılır, hibridizasyonun yapılacağı naylon filtrelele (zarımsı) transfer edilir, biyotiniasyonla işaretlenmiş ve radyoaktif olmayan veya radyoaktif problarla (genellikle P<sup>32</sup> ile işaretlenmiş, 300-3000 bp uzunluğunda kısa DNA zincirleri) hibridize edilen fragmentler radyografi yöntemi ile tespit edilir. İki veya daha fazla bireyin tesbit edilen bantları karşılaştırıldığında, eğer enzimle kesilen DNA'ların uzunluklarında bir farklılık varsa polimorfizm elde edilir. Bu farklılıklar DNA parçası eklenmesi veya çıkarılması ve kromozomal rekombinasyon olması durumunda oluşur. Nükleotid değişikliklerinden dolayı restriksiyon enzim kesme

noktası kazancı veya kaybı nedeniyle polimorfizm oluşabilir. Bu yöntemle zigotik embriyoların tespitine izin veren kodominant markırlar elde edilir.

Problar değişik kaynaklardan elde edilebilir. cDNA ve restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA'lar en çok kullanılan kaynaklardan bazılarıdır. Özellikle ilk kaynak tek kopya ya da düşük sayıda kopyalanmış kodlayıcı DNA bölgelerine ait problar verdiği için oldukça etkilidir. Genomik DNA'da PstI problarının kaynağı ise şu şekilde açıklanır; kodlayıcı genler metilasyonlu değildirler, genellikle en yaygın metilasyonlanmış zincirler GC ve GXC (X: her hangibir nükleotid) şeklinde bulunan C'lerdir. PstI restriksiyon enzimi de C metilasyonuna duyarlıdır ve sadece metilasyonlanmamış yerleri keser.[33]

### **2.3 PCR Tekniğine Dayanan Moleküler Markırlar**

Birkaç markır sistemine temel teşkil eder. PCR kaynaklı markır sistemlerinde 10-25 bp uzunluğunda primer olarak adlandırılan oligonükleotidler kullanılır. Bu primerler genomda bağlandıkları yerlerin arasını, eğer 3-4 kb'nin altında olursa 1-1.5 milyon defa çoğaltırlar. PCR kaynaklı polimorfizmin sebebi, kromozom düzeyinde meydana gelen ekleme/çıkarma (insertion, deletion: indel) ve mutasyon nedeniyle oluşan primer yapışma bölgesi kazancı/kaybı olabilir.

Genomdaki değişik yerlerdeki polimorfizmi bulmak için primerler değişik şekilde tasarlanabilir. Farklı primerler veya kombinasyonları kullanılarak farklı markırlar geliştirilebilir [RAPD, AFLP, ISSR (inter-simple sequence repeats) gibi]. Spesifik iki primerin kullanılması ile PCR ürünleri elde edilir ve polimorfizm PCR sırasında sadece primerlerin 3' sonlarında bulunan sayıları 2 ile dört arasında değişen sabitleştirici nükleotidlerden kaynaklanır (AFLP markırında). Primer sentezi için klonlama ve zincir tesbiti gerekir ve varyasyon, iki primerin yapıştığı noktalar arasındaki mesafeden kaynaklanır. Bu şekilde dizini bilinen genler içinde primerler geliştirilebilir (SCAR: sequence characterized amplified region ve SSR için). PCR reaksiyonları sırasında kullanılan şartlar, üretilen bantları ve bantların tekrarlanabilirliğini etkiler. Bunlar DNA ve magnezyum konsatrasyonu (MgCl<sub>2</sub>), primerlerin DNA dizinine en uygun yapışma sıcaklığı (primerin G+C miktarı



belirleyicidir) ile primerlerin uzunluğudur. Tekrarlanabilir RAPD markırları elde edebilmek için geliştirilen PCR şartlarına aynen bağlı kalınmalıdır.[33]

### **2.3.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Yöntemi**

On bp'lik her hangi bir diziden alınmadan tesadüfi olarak oluşturulmuş baz dizinleri kullanılarak geliştirilen primerler yaygın olarak kullanılır ve matematiksel olarak bunlardan  $4^{10}$  adet dizayn etmek mümkündür. Çünkü 10 bp'nin her noktasında 4 değişik nükleotid kullanılabilir. Bu primerler genomun birden fazla bölgesine yapışır. Yani bir primer birden çok markır verir. Genel olarak yöntem şu aşamaları içermektedir: yukarıda açıklanan primerleri içeren PCR reaksiyonlarıyla hedef bölgeler kopyalanır, büyük sayılarda kopyalanan spesifik DNA zincirleri elektroforezle büyüklüklerine göre jeller üzerinde ayrıldıktan sonra, etidyum bromid veya gümüş nitrat boyamasıyla tesbit edilir. Prosedür olarak aynı aşamaları kullanan iki yöntem daha vardır bunlar DAF (DNA Amplification Fingerprinting) ve AP-PCR'dır (Arbitrary Primed-PCR).[35]

RAPD tekniği genetik kaynaklar arasındaki çeşitlilik, bitki populsayonunda kullanılan bireyler arasındaki ilişkilerin tesbitinde ve genetik haritalama çalışmalarında en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir. Primerlerin rasgele genetik haritalama çalışmalarında en fazla kullanıldığı yöntemlerden birisidir. Primerlerin rasgele DNA zinciri üzerinde 200-2000 bp mesafede farklı dizinlere yapışması gerekir. Eğer bu mesafeden daha fazla olursa polimeraz enzimi tarafından güçlendirilemez. RAPD markırlarının en büyük dezavantajı, markırın üretildiği popülasyonun dışında o markırın çoğu zaman bulunamamasıdır. Bununla birlikte, tek dominant genler için gene çok yakın olduğu durumlarda başka popülasyonlarda da kullanılabilir. RAPD markırlarının tekrarlanabilirliği, PCR ve DNA tespiti sırasında şartların tam olarak kontrol edilememesi nedeniyle düşüktür. Bu nedenle, hassasiyet gerektiren durumlarda RAPD markırları daha güvenli olan SCAR markırlarına dönüştürülerek bu markırların güvenilirliği artırılabilir.[36]

### 2.3.2 SSR (Simple Sequence Repeats) Yöntemi

Yüksek organizmalarda henüz görevleri bilinmeyen, ancak düzenleyici rollere sahip olduğu düşünülen, rasgele tekrarlanan DNA bölgeleri vardır.[37] Bu tekrarların her ünitesindeki nükleotid sayısına göre, mikrosatellit veya minisatellit olarak adlandırılır. Mikrosatellitler içerisinde en yaygın dinükleotid (örneğin ATATAT) tekrarları olmakla birlikte, 1-6 bp'lik tekrarlar da bulunabilmektedir. Mikrosatellitler, aynı zamanda STR (Short Tandem Repeats/ Kısa ardışık tekrarlar) olarak da anılır ve 11-60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR) farklıdır. Minisatellitler genellikle kromozomların uç kısımlarında, yani telomere yakın bölgelerde bulunmasına karşın, mikrosatellitler yüksek organizma (*Eucaryote*)'lara ait kromozomlar üzerinde daha bol ve gelişigüzel bir dağılım gösterir.[38] Bu nedenle, bu tür tekrarlara dayalı bilgiler bütün genomu daha doğru temsil etmektedir. Bitkilerde (AT)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub> ve (AAT)<sub>n</sub> gibi tekrarlar çok yaygındır.[39] DNA tekrarlarının farklı bitkilerdeki durumunu görmek için yapılan bir çalışmada, ortalama olarak her 100 kb'lik DNA dizisinde 0.224 adet di-, tri- ve tetra-merik mikrosatellitler tesbit edilmiştir.[40]

Tekrarlanan DNA'ların sağındaki ve solundaki zincirler o dizine özgüdür, yani spesifiktir. Bu dizinler SSR primerlerini dizayn etmek için kullanılarak belli bir lokus PCR ile klonlanıp çoğaltılır. PCR ürünleri ise jeller üzerinde büyüklüğüne göre ayrıldıktan sonra floresan gümüş nitrat veya etidium bromid yöntemlerinden birisi ile boyanarak tespit edilir. Polimorfizm, kaynağını tekrar sayısından alır ve aynı sayıdaki tekrarları temsil eden her bant, farklı bir allele işaret eder. Tekrar sayısındaki farklılıkların kaynağı ise DNA replikasyonu sırasındaki kaymalardır (slippage).[41] SSR markırları genetik haritalama, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

### 2.3.3 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) Yöntemi

Teknik, 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak PCR reaksiyonunda kullanılmasını, PCR ürünlerini elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir.[42] Primer olarak 2 ile 4 arasında değişen farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen,

basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılır. Bu reaksiyonda tekrarlanan zincir aynı kalmak kaydıyla, sabitleştirici DNA'ların farklı kombinasyonları primer olarak aynı reaksiyonda kullanılarak bir tek PCR reaksiyonunda güçlendirilen hedef DNA zincirlerinin sayısı artırılır. Dolayısıyla da bir tek jel üzerinde üretilebilecek bant ya da markır sayısı artırılır. Bu, diğer DNA markırlarının üretebildiği sayılarla karşılaştırıldığında önemli bir avantaj sağlar.[43] RAPD markırlarında olduğu gibi, genellikle dominant markırlar verir.

#### **2.3.4 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions/ Diziyle Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler) Yöntemi**

RAPD ve ISSR gibi markır spesifitesi düşük olan markırların gücü, bu yöntemlerle elde edilen bantların jel üzerinden çıkarılarak, 3' sonlarındaki DNA zincirlerinin tespiti ve bunların daha uzun, dolayısıyla da daha spesifik primerler olarak PCR reaksiyonlarında kullanılması ile artırılır.[44] Tekrarlanabilirliği, RAPD ve ISSR markırlarına nazaran daha yüksektir. Genellikle dominant markırlar oluşturmasına rağmen, tek tek bantların kısa nükleotid kesici restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle kodominant markırlara dönüştürülebilir.

#### **2.3.5 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence/ Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Diziler) Yöntemi**

Bu teknik, PCR reaksiyonu ile güçlendirilen ürünlerin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektorforezle büyüklüklerine göre ayrılan bu kesilmiş fragmentlerin tespitini içerir.[45] Primerler cDNA veya genomik DNA klonlarından, klonlanan ve DNA zincirleri tespit edilen RAPD veya ISSR bantlarından elde edilir.

Hem SCAR hem de CAPS primerleri geliştirebilmek için DNA zincir bilgisine gereksinim duyulduğundan ve RAPD ile AFLP gibi alternative markır sistemleri bulunduğundan her iki yöntem de yaygın olarak kullanılmayıp daha çok RAPD, ISSR ve AFLP gibi spesifitesi düşük markırların spesifitesini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır.

### 2.3.6 AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) Yöntemi

RAPD ile RFLP yöntemi arasında bir yöntem olan AFLP, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmentlerinin adaptor DNA ile birleştirilmesinden sonra arka arkaya yapılan iki PCR reaksiyonu ve bu reaksiyonlarda seçici primer kullanılmasıyla yürütülür.[46] Bu markır sisteminin temeli, PCR'la daha önceden iki enzimle kesilip uygun adaptörler bağlanmış DNA fragmentlerinden bir kısmının klonlanması ve tespiti. Adaptör ve onun bağlandığı restriksiyon dizini, DNA primerlerinin bağlanma yeri olarak görev yapar. Seçici baz primerin 3' sonuna eklenir. Her iki primer çiftinin sonundaki seçici bazlar değiştirilerek veya değişik kombinasyonlar da kullanarak her seferinde yeni fragmentler klonlanır ve bu yolla yeni polimorfizm elde edilir ki bu özellik bu yöntemin en büyük avantajını oluşturur. Örneğin, kullanılan iki farklı restriksiyon enzim dizilerinin sonuna birer nükleotid ekleyerek hedef fragment sayısı  $1/4 \times 1/4 = 1/16$  defa azaltılır. Eğer çözünürlük yeterli değilse, birer seçici nükleotid daha eklenebilir. Hedef fragment sayısı  $1/16 \times 1/16 = 1/256$  oranına düşürülür. Bu işlem açık tekrarlanabilir bantlar alınana kadar devam eder. Yaygın olarak son amplifikasyonda işlem açık tekrarlanabilir bantlar alınana kadar devam eder. Yaygın olarak son amplifikasyonda ( $^{33}\text{P}$ ) ATP ve T4 polinükleotid kinaz enzimiyle işaretlenmiş primer kullanılması halinde elektroforezden sonra primerler işaretlenmeksizin gümüş nitrat boyamasıyla da DNA tespiti mümkündür.

Bu teknik, aynı jel üzerinde orijini tesadüfi olan pek çok markır oluşturur. Bu da özellikle genetik haritalama çalışmalarında kısa sürede bol miktarda markır vererek haritanın markırlarla doyurulmasını sağlar. Kodominant markır verebilmesine rağmen zigotik durumlarının tespit edilebilmesi güçtür. Çünkü bu yöntem kantitatif markır üretir. Homozigot markırlar daha koyu bantlar verirken ince bantlar heterozigot genotipi ifade eder. Çok az sayıda test edilen primerle çok sayıda markır oluşturması nedeniyle son yıllarda en çok çalışılan tekniklerden birisidir.

Tekniğin aşamaları şu şekildedir;

- DNA spesifik enzimlerle kesilir (ECoRI/MseI). Kesilen parçalar biyotinle işaretlenmiş iki adaptor ile DNA Ligaz enzimi kullanılarak birleştirilir.

- Kullanılan adaptörlere uygun primerler ve kesilen fragmentler PCR ile ön çoğaltma işlemine tabi tutulur.
- Radyoaktif olarak işaretlenen özel primerlerle gerçek amplifikasyon yapılır. Sonuçlar bir tek nükleotid değişimine bile duyarlı olan poliakrilamid jelde yürütülür.[47]

### **2.3.7 SRAP (Sequence Related Amplified Polimorphism/ Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm) Yöntemi**

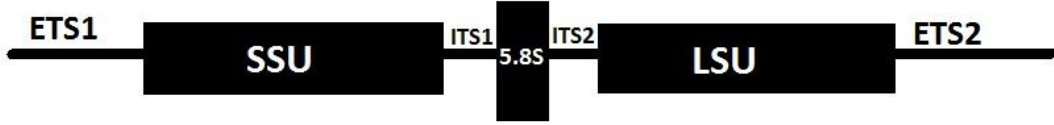
Bu markırlar 17 veya 18 bp uzunluğundaki ileri ve geri primerlerin kullanılmasıyla elde edilir. İleri primerler 13 veya 14 bp uzunluğundaki çekirdek dizini ve buna 5' sonda eklenmiş CCGG dizini, geri primerlerde ise yine aynı uzunluktaki çekirdek dizini ve bu dizine eklenmiş AATT dizini içermektedir. Hem ileri hem geri primerler 3' sonda üç adet seçici nükleotid içermektedir. Bu primerler doğrudan gen bölgelerini hedef almaktadır. SRAP markırları, RAPD markırlarına göre daha yüksek oranda tutarlı sonuçlar ortaya koymaktadır ve AFLP markırlarına göre daha ucuz ve daha az işçilik gerektirmektedir.[48]

## **2.4 DNA Dizilemesine Dayalı Markırlar**

### **2.4.1 Nükleer Markırlar: nrDNA**

Nükleer DNA genomuna ait herhangi bir bölgenin kodlama yapısını veya yapmasını, çoğaltılarak dizilenmesine dayalı olarak yapılır. Ribozomal alt ünitelerinden dolayı, filogenetik analiz çalışmalarında nükleer genetik markır olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır. rRNA' ları kodlayan çekirdek rDNA genleri genellikle filogenetik analizde kullanılmaktadır. rDNA' lar ardışık sıralı şekilde ve yaklaşık 5000 kopya olarak çekirdek genomunda yer alırlar. Her tekrar eden birim üç parçadan oluşur. Bu parçalar; küçük alt birim (SSU), büyük alt birim (LSU) ve 5.8S rDNA' larıdır. RNA kodlayan bu bölgeler birbirinden ayraçlar ile ayrılır. SSU ve LSU iki adet dış yazılan ayraç (ETS) ve bir yazılmayan ayraç (Non-Transcribed

Spacer, (NTS) ile ayrılır. 5.8S rDNA ise iki yazılabilen ayraç (internal transcribed spacerlar, ITS1 ve ITS2) arasına yerleşmiştir.[49] (Bknz. Şekil.3)



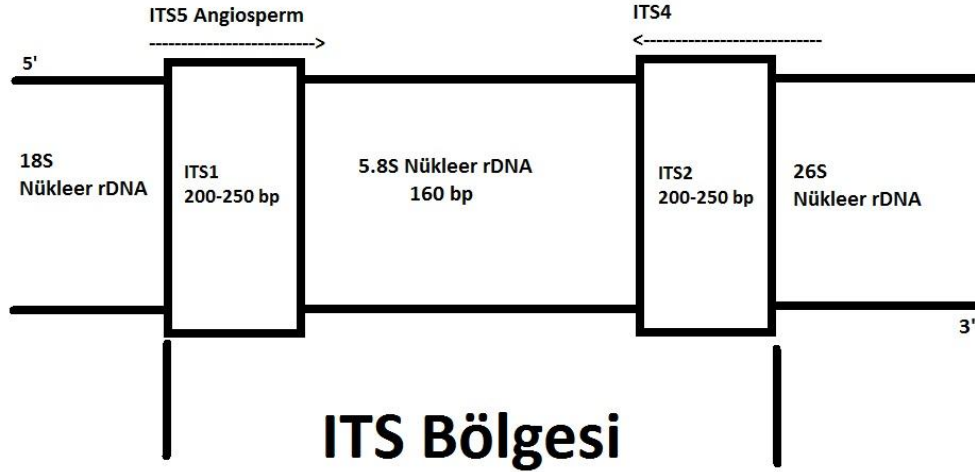
**Şekil 8:** rDNA gen kümesi

En küçük çekirdek rDNA olan 5.8S rDNA' nın dizisindeki korunmuşluk oranı SSU rDNA ile aynı olmasına rağmen çok uzun bir dizi değildir. 5.8S rDNA bölgesi yaklaşık 150 bç uzunluğunda olduğundan yeteri kadar filogenetik bilgi içermemektedir. Bu nedenle 5.8S rDNA bölgesi filogenetik çalışmalar da çok tercih edilmemektedir. [50]

#### **2.4.2 ITS (Internal Transcribed Spacer)**

Moleküler biyoloji alanındaki son gelişmeler, türe özgü gen bölgelerinin belirlenmesiyle bitki türlerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Buna yönelik olarak rDNA'nın ITS bölgeleri, bitkilerdeki moleküler sistematik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen yöntemler arasında yerini almıştır.[51]

Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri ardışık tekrarlı diziler şeklindedir. rDNA tekrarları DNA' nın NOR (Nükleolar Organize Region) bölgelerine yerleşmiş durumdadır ve 18S küçük alt birim (Small Sub Unit), 5.8S ve 28S büyük alt birim (Large Subunit)' den oluşmaktadır. ITS bölgeleri buradaki DNA bölgeleri arasına yerleşmiştir. Bu bölgeler, rDNA' nın alt birimleri ile transkribe edilmektedir ve korunmuş bölgeleri (18S, 5.8S ve 28S) birbirinden ayıran iki kısımdan (ITS1 ve ITS2) oluşur.[51] Bu ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS bölgeleri şekil.4 te gösterilmiştir.



**Şekil 9:** 18S-26S nükleer ribozomal DNA (nrDNA)'ın Internal Transcribed sequence (ITS) bölgesi[52]

rDNA genleri, kopya edilemeyen bölgeler (IGS) ve ITS bölgelerinin varlığı ile birbirinden ayrılmaktadır. ITS1 18S (SSU) ile 5.8S arasında yerleşmiştir. ITS2 ise 5.8S ile 26S genlerini ayırdan DNA bölgesidir. Bu gen yapılarını içeren rDNA tekrarlarının ökaryotik organizmalardaki kopya sayısı, 2000-30.000 arasında değişmektedir.[51]

### 2.4.3 ITS' in Genel Özellikleri

- ITS bölgesinin toplam uzunluğu yaklaşık 700 bp kadardır. Ökaryotik organizmalarda 5.8S gen bölgesi ile ITS bölgesi genellikle birlikte değerlendirilir.
- ITS bölgesi diğer korunmuş rDNA bölgelerine göre daha çok değişkenlik göstermektedir.
- ITS1 ve ITS2 bölgelerinin filogenetik açıdan sundukları veriler farklı düzeydedir. Bu bölgelere dayalı analizlerde ITS1 verileri, daha fazla filogenetik çözümler sunmaktadır ve nükleotid içeriği ITS2' ye göre % 29 daha değişkendir.
- Bu bölgeler, rDNA' nın olgun 18S, 5.8S ve 28S alt birimlerinin oluşumu sürecinde görev almaktadır. [51] 1970' lerde DNA dizi analizi çalışmaları hız kazanmıştır. rRNA' lar ve komşu bölgeleri üzerindeki sekonder yapı çalışmaları büyük artış göstermiştir. Her tekrar birimi, olgun rRNA' ları oluşturacak olan bir preRNA olarak kopya edilir.[53]

ITS1 ve ITS2 bölgeleri ribosomal transkripsiyon ürününün bir parçası olmalarına rağmen olgun ribosomal alt birimlerin yapısına dahil edilmezler. Ancak bu bölgeler, rRNA' ların olgunlaşması sürecine katkıda bulunurlar.[53] PreRNA molekülünün çeşitli olgun RNA türlerine dönüşmesini sağlayan transkripsiyon sonrası süreçte her iki ITS bölgesi kesilip çıkarılır ve ortamdan uzaklaştırılır. ITS bölgelerinin, baz değişimi sınırlamalarından nispeten uzak olduğuna inanılmaktadır. Bu durum, Angiosperm' lerden elde edilen ITS bölgelerine dayalı filogenetik analiz sonuçları ile desteklenmektedir. [54] ITS1' de meydana gelebilecek delesyon-insersiyon veya nokta mutasyonları olgun SSu ve LSU rDNA' ların üretimine engel olabilmektedir. ITS2 bölgesinde oluşabilecek bu çeşit mutasyonlar sonucunda da büyük alt birim rRNA' ların oluşumu zarar görebilmektedir. Bütün bunlara rağmen ITS bölgesinin sekonder yapıları oldukça korunmuştur. [54]

#### **2.4.4 ITS' in Taksonomide Tercih Edilmesinin Nedenleri**

nrDNA üzerinde yer alan ITS bölgeleri, moleküler ve sistematik açıdan ayırt edici özelliklere sahip olması nedeniyle filogenetik analiz çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

Bu bölgeler;

- Filogenetiğin yeniden inşasında yeterli varyasyon kadar uygun büyüklüktedir (600-700 bp),
- Cins ve tür içi seviyelerde ileri derece korunmuş olan rDNA gen bölgelerine komşu olarak yer almaktadır,
- PCR ile çoğaltılarak karşılaştırılmaları için büyüklüğü son derece elverişlidir,
- rDNA gen bölgelerine göre daha hızlı nükleotid baz değişimleri göstermektedirler,
- Cins ve tür seviyesindeki filogenetik çalışmalarda DNA içerikleri, açıklayıcı bilgiler sunmaktadır,
- Genomik DNA üzerinde yüksek kopya sayısına sahiptirler.



Bu bölgelerin evrenselliği, alt birim unsurları ve bölgeler arasındaki farklı baz varyasyon oranları nedeniyle sistematikde sıklıkla kullanılırlar.[55]

#### **2.4.5 nrDNA Bölgeleri**

#### **2.4.6 Küçük Alt Birim nr DNA (18S)**

Küçük alt birim nrDNA' sı yüksek derecede korunmuş DNA bölgelerinden bir tanesidir. Bu özelliği nedeniyle şube ve sınıf kategorisindeki filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu güne kadar 4000 farklı tür için küçük alt birim nrDNA' sı dizilenmiştir. Küçük veya büyük alt birim nrDNA nükleotid baz sıralarında aşırı korunmuş ve değişebilir bölgelerin bulunması, ilgili özel sorular için optimum filogenetik cevaba ulaşılmasını sağlar.

Küçük alt birim rDNA baz sıraları, ata soyların belirlenmesinde, temel ökaryot ve fungal soylar arasında, Angiospermler içinde, hayvanların düzenlenmesi gibi farklı taksonomik seviyelerde filogeninin yeniden inşasına olanak sağlar.[53]

#### **2.4.7 5.8S nrDNA**

5.8S nrDNA, rDNA tekrar birimleri içerisinde yer alan en küçük uzunluktaki nükleer DNA' dır. rRNA' nın büyük al biriminin bir parçasıdır. 5.8S rDNA' nın lokus uzunluğu ve nükleotid içeriği ileri derecede korunmuştur. 5.8S rDNA filogenetik açıdan yeterli uzunluğa sahip olmadığı için (163-164 bp) filogenetik çalışmalarda tek başına kullanımı tercih edilmez. Bu nedenle bu bölgeye ait nükleotid baz değişimlerinden, ITS bölgeleri ile birlikte kullanılarak yararlanılır.[53].

#### **2.4.8 Büyük Alt Birim nrDNA (28S, LSU)**

Küçük alt birim rDNA ile kıyaslandığında daha uzundur ve baz içeriği daha fazla varyasyon gösterir. Büyük alt birim rDNA çok farklı alt birimlerden oluştuğu için filumlar arasında önemli derecede gen varyasyonu gösterirler.

Büyük ve küçük alt birim rDNA'sı üzerinde değişebilir bölgeler veya yayılan segmentler olarak adlandırılan domainler bulunmaktadır. Fakat bu bölgelerdeki genişlemeler; rDNA baz dizilerinin, akraba türleri ayırt etmede kullanılabilmesi için yeterli varyasyonu sunmamaktadır. Bu nedenle rDNA genlerinin gösterdiği varyasyonlardan familya bazında ve daha yukarı seviyelerde faydalanılmaktadır. [53]

rDNA tekrarlarının ITS ve IGS bölgeleri, yüksek oranda varyasyon göstermeleri bakımından cisimler arasında, tür seviyesinde ve popülasyon çalışmalarında karşılaşılan taksonomik problemleri çözmek amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak IGS (4-5 kb) bölgeleri ITS bölgelerine göre oldukça uzundur. Dizi analizindeki zorluk nedeniyle filogenetik çalışmalarda çoğunlukla ITS tercih edilmektedir.[53]

Yapılan RFLP çalışmaları, bu ara bölgelerin son 50 milyon yıl içinde ayrılmış olan yakın akraba taksonlar arasındaki filogenetiği ortaya koymada kullanılabileceğini göstermiştir.[53]

#### **2.5 DNA Dizileme**

DNA dizi analizi veya sekans analizi, DNA birincil yapılarının belirlenmesinde ve nükleotid baz dizilerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdendir. DNA dizi analizi bir nükleik asit dizisinin bir diğer nükleik asit dizisine hibridizasyonuna dayanır. Hibridizasyon yapılırken radyoaktif veya radyoaktif olmayan boyalarla işaretleme yapılır. Genellikle gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) belirlenmesi yada rekombinant DNA oluşum yapılarının belirlenmesinde kullanılır. Ayrıca gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri, consensus dizileri, epistatik genler ve etkileri belirlenebilmektedir.

DNA dizilemede iki temel teknişk vardır;

1. Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi, [56]
2. Sanger ve Coulson'un zincir sonlanma yöntemi.[57]

### 2.5.1 Maxam ve Gilbert'in Kimyasal Kırılma Yöntemi

Bu yöntem çok yönlü dizileme veya çok yönlü sekans olarakta bilinmektedir. Bu teknişin temel prensibine göre, dizilenmek istenen DNA özgül baz dizilerinden kesilir ve farklı büyüklüklerde fragmentler elde edilmiş olur. Temeldeki mantık DNA üzerindeki bazların tahrip edilip hasar görmüş bölgelerden piperidin ile fosfodiester bağlarının yıkılmasıdır. Başlangıçta DNA parçası bir ucundan işaretlenir ve işaretleme sonrası DNA dört parçaya ayrılır. Her bir DNA parçasına bazlardan sadece birisini tahrip edecek kimyasallar eklenir. Bu yöntemde ki özgül bazlar ve onları kırmak için kullanılan kimyasallar tablo 1' de gösterilmiştir.[58]

**Tablo 1:** Kimyasal Kırılma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

<b>Özgül Baz</b>	<b>Baza Özgül Kimyasal</b>	<b>Baz Ayırmada Kullanılan Kimyasal</b>	<b>Zincir Kırmada Kullanılan Kimyasal</b>
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

### 2.5.2 Sanger ve Coulson'un Zincir Sonlanma Yöntemi

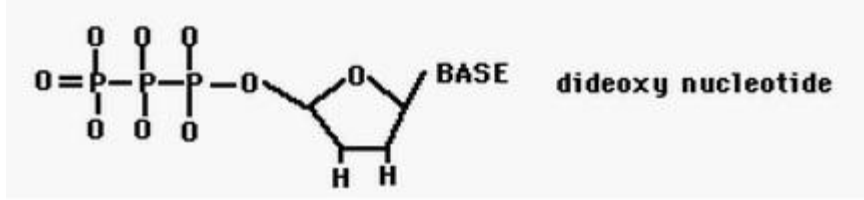
Dideoksi yada incir sonlanması reaksiyonları olarak bilinir. Toksik madde içermeyen ve hızlı bir yöntem olduğu için Maxam ve Gilbert' in kimyasal kırılma yöntemine göre daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntem için;

- Tek iplikli kalıp DNA' ya,

- dNTP' lere,
- ddNTP' lere,
- DNA Polimeraz' a,
- Serbest OH grubu içeren primere

ihtiyaç vardır.

ddNTP' ler dideoksinükleosittrifosfat OH grubu taşımayan modifiye nükleotid substratlarıdır. Bu modifiye nükleotidler riboz şekerinin ikinci karbon atomuna ek olarak üçüncü karbon atomunda da deoksi halde olduğundan fosfodiester bağlarının oluşumunu engeller. Bu sayede yeni nükleotidler yapıya katılmaz. Böylece DNA zincir uzaması sonlanır. (Bknz Şekil. 5 )



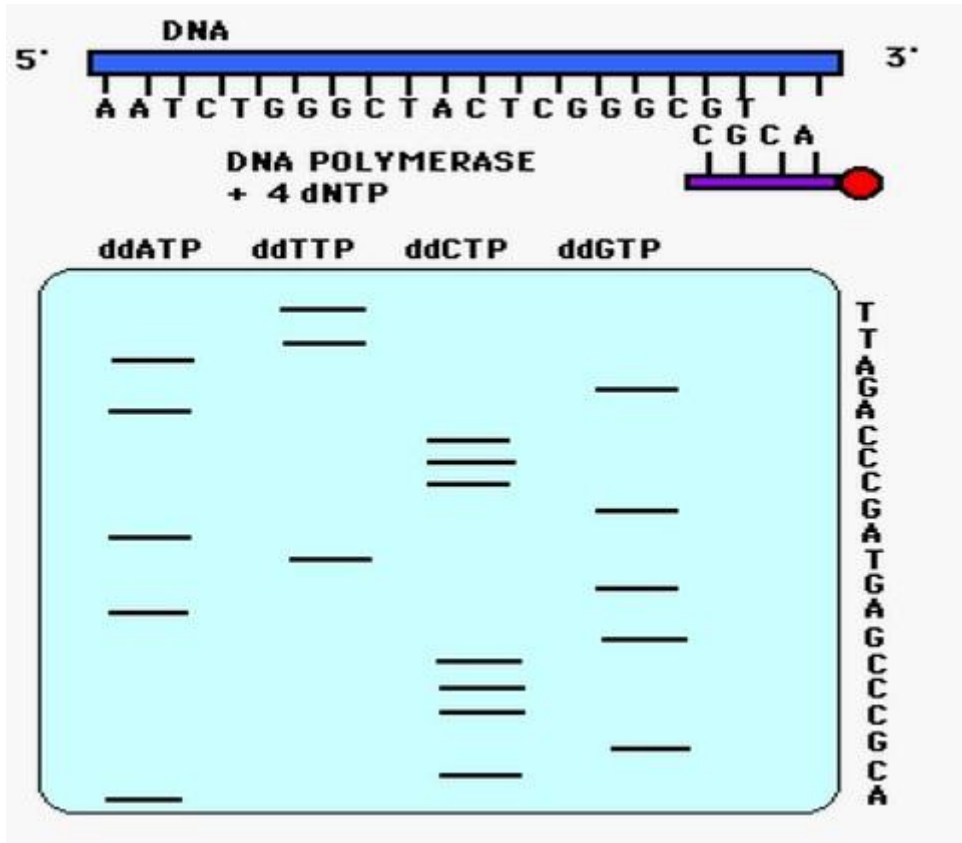
Şekil 10: Dideoxynükleotidlerin genel yapısı[59]

Analizde kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemi ile hazırlanır. Bu sayede çok daha fazla sayıda kalıp DNA elde edilmiş olur. Bu amaçla dizi analizinin yapılacağı kolun primer derişimi komplementer kolunkinden daha yüksek tutulur. Döngü ilerlediğinde sınırlayıcı primerin bittiği anda yalnızca uzama kolu çoğalır. Amplifikasyon bittiğinde ürün ortamdaki maddeler arındırılır. Bu aşamadan sonra tek zincirli kalıp DNA dizileme için kullanıma hazır hale gelmiştir.

Reaksiyon sonucunda oluşacak ürünlerin rahat görüntülenebilmesi için DNA molekülünün işaretlenmesi gerekir. İşaretleme için genelde S35, P33 ve P32 kullanılır. İşaretleme, gama pozisyonunda yapısında bulunan nükleotidleri kullanarak veya alfa pozisyonundaki işaretli dNTP'ler kullanılarak yapılır. DNA polimeraz, primer, kalıp DNA ve dNTP' ler ortama konulup, işaretli nükleotidlerin yapıya katılması sağlanır. Kullanılan ddNTP' lerin konsantrasyonu diğer maddelerden daha düşük olmalıdır. İşaretleme primere de yapılabilir. İşaretlemeden sonra zincir sonlanması reaksiyonlarına geçilir. Karışım dört kısma ayrılarak dört ayrı tüpe konulur. Her tüpe gerekli enzim faktörleriyle birlikte düşük derişimli farklı ddNTP' ler konulur ve inkübe edilir. ddNTP' ler ve dNTP' ler aynı karışıma konulduğunda aralarında bir yarışma olur. Substrat olarak dNTP' ler kullanıldığı sürece uzama devam eder. Sentezin her hangi bir aşamasında substrat olarak ddNTP kullanılırsa reaksiyon sonlanır ve zincir uzaması sonlanmış olur. Her tüpte aynı anda birbirinden bağımsız birçok reaksiyon olmuştur. Sonuçta primer sonundan başlayıp

sonlanmaların olduğu bölgelere kadar çeşitli uzunlukta DNA fragmentleri oluşmuş olur.

Oluşan ürünlerin ayırt edilebilmesi için denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Elektroforez sonunda jel kullanılarak otoradyografi ile fotoğrafı çekilir. Otoradyogramdan elde edilen en kısası en önde olmak üzere basamak şeklindeki bantlar, radyoaktif izotop taşıyan tek zincirli DNA moleküllerine aittir. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde tespit edilen parçacıklar, reaksiyon karışımına konulan ddNTP' lerin tipine göre okunur.[60] Böylece şekil. 6' daki gibi 5'-3' yönünde baz dizilimi saptanmış olur.[59]

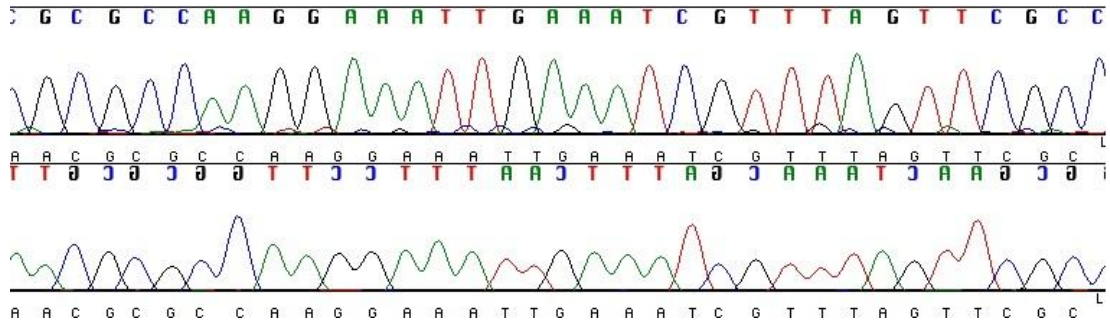


Şekil 11: Zincir sonlanma yöntemi sonucunda baz diziliminin saptanması[59]

### 2.5.3 Otomatik DNA Dizileme Yöntemi

İnsan genom projesi de dahil olmak üzere pek çok proje DNA dizi analizi içermektedir. artan analiz sayısı hem uzun zaman almaktadır hem de daha fazla iş gücü gerektirmektedir. Bütün bu sebepler bir araya gelince otomasyonun gerekliliği doğmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen fayda sonuçlarının değerlendirilmesinde de fayda sağlamıştır.

Otomatik DNA dizi analizi Sanger ve Coulson' un zincir sonlanma yönteminin prensiplerini baz alarak çalışmaktadır. Tek farkı radyoaktif boyalar yerine işaretleme sürecinde floresan boyalar kullanılmaktadır. Bu yöntemde dört farklı boya kullanılır dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkte pik oluşur. Her renk bir nükleotidi simgelemektedir. Guanin siyah, Adenin yeşil, Timin kırmızı ve Sitozin mavi renkle temsil edilir. Analiz sonucunda monitöre yansıyan pikler şekil. 7' de gösterilmiştir.



**Şekil 12:** Otomatik dizi analizi sonucu oluşan pikler

Otomatik DNA dizi analiz cihazları sabit olarak bilgisayara bağlı programlar ve bu programların yürüttüğü elektroforez sistemleri içerir. Elektroforez ünitesinde lazer ışık kaynağı sayesinde monokromatik bir ışık oluşturulur. Dizisi elde edilmek istenen DNA'nın bulunduğu jel bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez sürecinde DNA'ya bağlanan floresan boya monokromatik ışık kaynağı ile taranınca floresan boyanın cinsine göre kendisi için karakteristik dalga boyunda ışımaya verir. Bu yansıma sistemdeki bir dedektör tarafından kaydedilir ve monitöre aktarılır. Monitöre aktarılan sonuçlar grafiksel yada matematiksel sonuçlardır.[58]

#### 2.5.4 Dizilerin Hizalanması, CLUSTALW ve MULTALIN

Çoklu dizi hizalama, biyoinformatiğin temel araçlarından bir tanesidir. Özellikle dizi oluşturma, filogenetik ağaç oluşturma, moleküler modelleme gibi alanlarda sıklıkla kullanılır. Çoklu dizi hizalama ikili dizi hizalama yöntemine göre daha fazla bilgi sunar. Çoklu dizi hizalama yapılırken polinom zamanda optimum sonuç bulurken var olan çoklu hizalama teknikleri optimum hizalamayı ancak dizi sayısı ile üssel ilişkili bir sürede hesaplayabilmektedir. Bundan dolayı

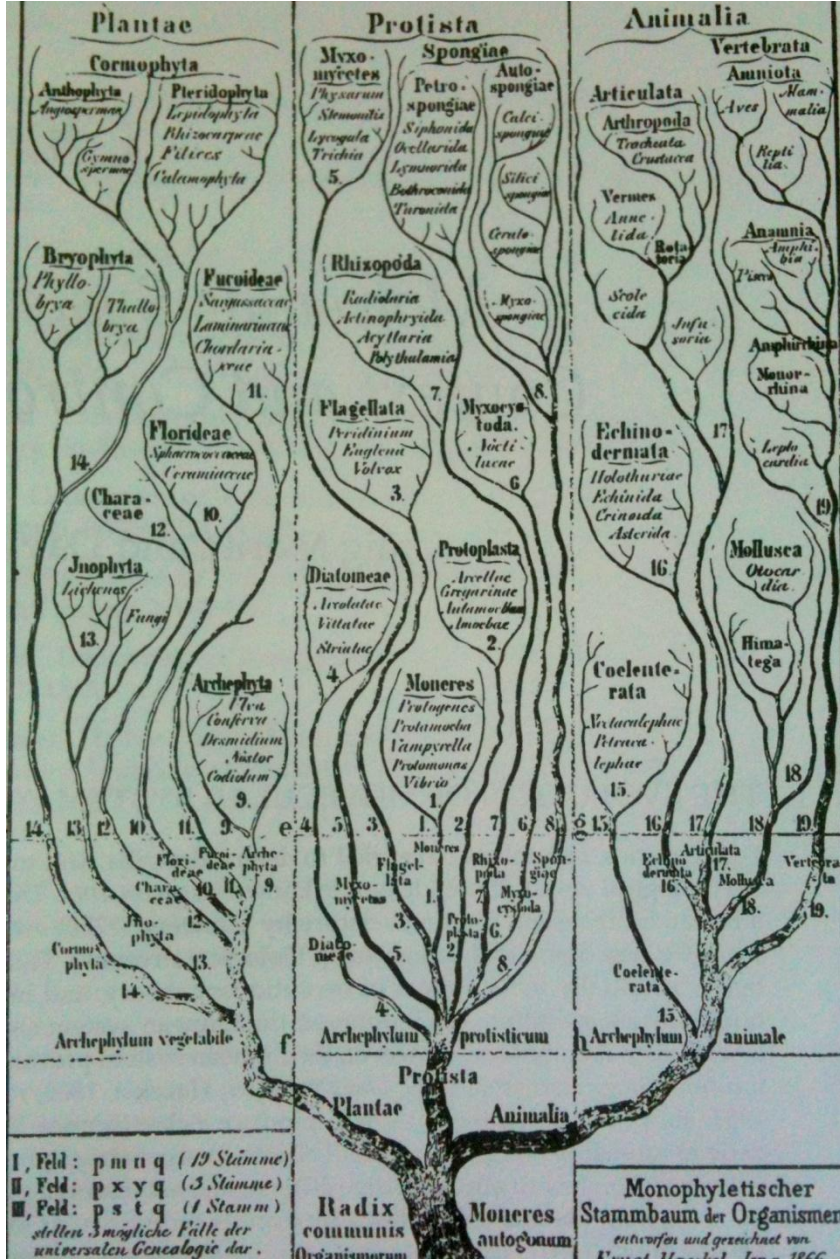
büyük boyutlu verilerde hesaplamayı, günümüz hesaplama teknikleri ile imkansız kılar. Bu nedenle farklı iyi hizalamalar verecek programlar oldukça önem kazanmıştır.

Çoklu hizalama yöntemlerinden en çok kullanılanı aşamalı hizalama yöntemidir. Bu yöntem ile çalışan çok sayıda yazılım mevcuttur. CLUSTALW bu yazılımlardan bir tanesidir.[61] Bu metodun temel prensibi ikili benzerliklerin kullanılarak tahmini filogenetik ağaçların oluşturulmasına dayanır. Daha sonra bu bilgiler kullanılarak diziler aşamalı olarak hizalanırlar. Bu yöntemin bilinen dezavantajlarından bir tanesi, yerel minimuma takılması ve problemi çözecek parametrelerin belirlenmesinin zor olmasıdır. Yavaş bir yöntemdir ve daha çok çözüme yakın noktalardan başlayarak iyileştirme yapmak amacıyla kullanılır.

Çoklu hizalama problemlerini çözmek için kullanılan diğer bir yaklaşım ise genetik algoritmalarıdır. Bu algoritmalarla geliştirilen yazılımlardan bir tanesi de MULTALIN' dir.[62] Multalin mikro bilgisayarlar da kolayca kullanılabilen, hem proteinleri hem de nükleik asitleri hizalamaya yaran bir algoritmadır. Yazılımın yaklaşımı aşamalı hizalamanın dinamik programlanması yöntemine bağlıdır. Başlangıçta diziler hiyerarşik olarak gruplara ayrılır. İkili hizalama puanları veri matrisi kullanılarak en yakın sekanslar hizalanmış diziler halinde gruplanır.[62]

## 2.6 Filogenetik Analiz

Yüz yıllar boyunca bilim adamları biyolojik dünyanın çeşitliliğini belirlemeye, tanımlamaya ve açıklamaya çalışmıştır. Bu amaç için göstermiş oldukları çalışmalar sistematik olarak bilinir.Linneus tarafından 1758 yılında yayınlanan hiyerarşik isimlendirme sistemi biyolojik çeşitliliği tanımlatan ve kategorize eden bir çerçeve görevi görmüştür. Bu teori başlangıçta evrimsel yaklaşımdan uzaktı ve pek çok evrim çalışan bilim adamı bu görüşe karşı çıkmıştı.( Buffon gibi, 1753) Ancak daha sonra bu teori bir çok araştırmacı tarafından benimsendi ve daha sonraki evrimciler tarafından (Lamarck, Darwin gibi) filogeniye dayanan ve Linne' nin bu sisteminide içeren basit bir sınıflandırma yapmıştır. (Bknz Şekil. 8)



Şekil 13: 1866'da Haeckel tarafından öne sürülen filogeniye dayalı sınıflandırma şeması[63]

Filogenetik, organizma soyları arasında veya onların gen bölgesi gibi parçaları arasındaki evrimsel ilişkiler demektir. Moleküler sistematik ve moleküler evrim arasında temel bir sinerji vardır. Moleküler sistematik sonuç elde etmek için genetik markırlar kullanır. Spesifik gen bölgeleri için veri tabanlarını karşılaştırır. Moleküler evrim ise zaman sürecini katarak bu datayı kullanır, moleküler değişiklik oranlarını değerlendirir.[63]



Moleküler evrim çalışmalarının sonuçları populasyon genetiği çalışmalarında ve filogenetik analiz çalışmalarında moleküler markırların kullanılmasıyla daha fazla bilgi sağlayabilir.[63]

Genomlar bir çok mutasyon sayesinde evrimleşir ve farklılaşır. Bu süreç sonunda organizmaların genomlarındaki nükleotid dizisi farklılıkları meydana gelir. Bu nükleotid dizisi farkı iki genomun birbirinden ayrılma zamanlamasını bize yansıtabilir. Farklı genomları karşılaştırarak aralarındaki evrimsel ilişki hakkında bilgi sahibi olunabilir.[64]

Organizmaların evrimsel tarihinin saptanmasında moleküler veriler kullanılırken bazı varsayımların varlığı söz konusudur;

- Kullanılan moleküler diziler homologdurlar. Yani ortak bir kaynakları vardır ve zaman içerisinde farklılaşmışlardır.
- Filogenetik farklılaşmanın iki kola ayrılarak farklılaştığı var sayılır. Filogenetik ağaçtaki bir dal belirli bir noktadan iki kola ayrılır.
- Bir dizideki her bir pozisyon birbirinden bağımsız olarak evrimleşir. Diziler arasındaki çeşitlilik kesin filogenetik ağaçların inşası için yeterli bilgi sağlamaktadır.[64]

### **2.6.1 Filogenetik Ağaç**

Filogenetik çalışmalarda evrimsel ilişkiyi göstermek için çeşitli şemalarla ve istatistiksel verilerle sonuçların filogenetik ağaçlara dönüştürülmesi gerekmektedir. Filogenetik ağaçlar dizileme çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin görsel olarak anlaşılabilmesini sağlar.[64]

Buna ek olarak;

- Genler arası etkileşim,
- İlaç tasarımları
- Aşı çalışmalarında patojen strain çeşitliliği
- Genetik hastalıklar ve bulaşıcı hastalıkların epidemiyolojisi

- Yeni genlerin görevlerinin tespiti
- Mikrobiyal ekoloji çalışmalarında da kullanılır.[64]

Filogenetik bir ağaçtaki dallanma olayların modellerini ve zamanlarını tanımlar. Türlerin akrabalık ilişkilerini, hangi türlerin yakın akraba hangi türlerin uzak akraba olduğu, türleşme sürelri hakkında bilgi verir. Filogenetik ağaç iki temel unsurdan oluşur. Ağacın kökü (node) ve dallar (branch) filogenetik ağacın iki temel bölümüdür. Dallar atasal populusyondaki zaman içerisindeki değişimleri gösterir. Kökler ise bir türün farklı türlere ayrıldığı noktayı gösterir.[65]

Köksüz ağaçlarda filogenetik ilişkileri göstermek amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır. Köksüz ağaçlar ortak ata bilgisi olmaksızın türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacı ile kullanılır.[66]

Filogenetik ağaçlardaki her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan bir taksona denk gelir. Ağaçta bulunan dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta bir birlerine yakın dallarda yer almaları ile ayırt edilirler. Ağaçtaki dalların uzunluğu ise dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını ifade eder.[66]

### **2.6.2 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler**

Evrimsel çalışmaların en önemli ve en ilginç problemlerinden bir tanesi filogenetik ağacın yeniden inşasıdır. Moleküler verilerden filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan pek çok yöntem vardır. En iyi ağacın bulunması için kullanılan stratejiye göre iki kategori içerisinde sınıflandırılabilirler. Birinci kategori, belirli bir kriter altında olası ağaçların tamamını veya geniş bir kısmını inceler ve en olası ağacı seçer. Bu metod 'Karakter Temelli Yöntemler' olarak adlandırılır. Diğer strateji ise bir ağacın bölgesel topolojik ilişkisini inceler ve adım adım en olası ağacı oluşturur. Bu stratejiye ise 'Mesafe Temelli Yöntemler' adı verilir.[67]

### **2.6.2.1 Karakter Temelli Yöntemler**

Dizilerde biriken mutasyonların sayılmasına dayanır. Farklı karakterlere dayanması gerekir, bu karakterler her bir taksondaki canlıya ait olan moleküler dizilerdir. Maximum Parsimoni, Maximum Likelihood ve Mr. Bayes gibi yöntemleri içerir.[67]

#### **2.6.2.1.1 Maximum Parsimoni (MP) Metodu**

Maximum Parsimonu metodu olası bir çok filogenetik ağaç arasından en az değişim geçirerek oluşmuş olan ağacı seçmeyi amaçlar.[64] Maksimum Parsimoni (MP), minimum evrimsel metod olarak da adlandırılabilir. Parsimoni tutumluluk demektir. Evrimsel biyolojide tutumluluk, evrimsel süreçte neler olduğuna dair sonuca varılırken, araştırmacının açığa çıkan evrimsel değişimin miktarını en aza indirgeyen veri yorumlarını seçmesi demektir. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, ağaçta çıkmış olan evrimsel değişimin en az olduğu ağaçtır.[65]

MP ağaçlarının oluşturulmasında ‘kesin’ ve ‘tahmini’ yaklaşımlar söz konusudur. Kesin yaklaşımda olası tüm ağaçlar gözden geçirilir ve optimalite ölçütüne en uygun ağaç belirlenir. Çok zaman alan bir süreçtir ve analiz edilmek istenen örnek sayısının yirmiden fazla olduğu durumlarda ‘tahmini’ yaklaşım daha çok tercih edilmektedir. En tutumlu ağaçların güvenilirlik derecesi istatistiksel olarak ta tespit edilebilir. Bu istatistiki tespit için kullanılan yöntem bootstrap (seç-bağla testi) kullanılır. Bootstrap analizi elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriteri kullanılarak, istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılır.[68]

Seç-bağla testinde bilgisayar mevcut veri setini kullanarak tekrarlı örnekleme yolu ile yeni bir veri seti oluşturur. Elde edilen yeni veri setinde bir dalın ortaya çıkma yüzdesi %50, %80 ve % 100 olarak belirlenir. Kress ve arkadaşlarının (2000) kriterlerine göre  $\geq$  %85 güçlü, %75-85 arası orta, % 50-70 arası zayıf ve  $<$ %50 çok zayıf şeklinde tanımlanmıştır. Eğer belli bir dal için bootstrap değeri %50 den küçük ise ağacın bu kısmındaki dallanma modelinin çözülemediği anlaşılır ve bu dal tek

düğünden çatallı olarak gösterilir. Bu durum moleküler sistematikte politomi olarak adlandırılır.[69]

### **2.6.2.2 *Maximum Olasılık (ML) Metodu***

Maximum Likelihood analizi nükleotid ve amino asit dizilerinin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi ve evrimsel hipotezlerin karşılaştırılması için oldukça güçlü bir yaklaşımdır.[70] Bu yöntem geleneksel parsimoni yöntemleri ile karşılaştırıldığı zaman bazı avantajlara sahiptir. Olasılık oranı ile evrimsel oranların sabitliği ile ilgili hipotezleri test edebilir. Testler ve olası ağacın tahmini hatası kabaca gösterilir.[71]

Bu yöntemde her olası ağaç topolojisi araştırılır. Dizi hizalamasında yalnızca bilgi verici bölgeler değil her pozisyon hesaba katılır. Nükleotid veya amino sit değişimlerine olasılık değerleri verilir ve bir değişim modeli elde edilir. Ata dizilerin ara boğum noktalarına ve sonrasında günümüzde yaşayan canlılara ait olan dizilere evrimleşme olasılığını hesaplar.[64]

### **2.6.2.3 *Bayes Metodu***

Filogenetik analiz çalışmalarında sıklıkla kullanılan popüler metodlardan bşr tanesi. Temel olarak Maximum Likelihood yöntemine benzer. Prior (önceki) olasılık kullanımı ile bu yöntemden ayrılır. Var olan gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir şey hakkında sonuç çıkarmaya dayanır. Ağaç oluşturulmadan önce her bir topolojinin olasılığı bir birine eşittir. Aşağıdaki eşitliğin geçerli olduğu bu yöntem ML yönteminden daha hızlıdır ve daha geniş çapta veri setlerini kullanabilir.[72]

Sonraki olasılık= (Önceki olasılık x Şarta bağlı olasılık) / Toplam olasılık

#### **2.6.2.4 Mesafe Temelli Yöntemler**

Dizi hizalanması sonucunda elde edilen evrimsel mesafeler, her bir takson çifti arasındaki mesafelerin oluşturulmasında kullanılabilirler. Veri matrisindeki bu mesafe skorları kullanılarak tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturulabilir. Bu yöntemde kullanılan algoritmalar, kümelenme temelli veya en iyi durum temelli olarak ikiye ayrılır. Bu algoritmalar aritmetik ortalamayı kullanarak ağırlıklı olmayan çift grup yöntemini (UPGMA, unweighted pair group method algorithm) ve komşu birleştirme yöntemini (Neighbor-joining method) kullanırlar.[73]

##### **2.6.2.4.1 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means)**

Popüler bir uzaklık analiz metodudur. Filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılan en basit yöntemlerden bir tanesidir. UPGMA yönteminin en büyük dezavantajı, bütün soylar için evrimsel hızı aynı saymasıdır. Ağaçtaki tüm soylar için mutasyonların oranı zaman içinde sabittir. Bu durum moleküler saat hipotezi olarak adlandırılır. Bu tüm dalların, terminal düğüme olan mesafelerinin aynı olması anlamına gelir. Normalde bireysel şubelerin aynı mutasyon oranına sahip olması çok olası değildir. Dahası UPGMA yöntemi genellikle yanlış ağaç topolojileri üretir. Köklü ve ultrametrik ağaçlar oluşturur.[74]

##### **2.6.2.4.2 Neighbor-Joining Metodu**

Evrimsel uzaklık verisini kullanarak, filogenetik ağaç oluşturmak için önerilen, mesafe temelli yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntemin temel prensibi, starlike ağacı ile başlayan operasyonel taksonomik birimlerin (OTUs) her bir kümelenme aşamasında toplam dal uzunluğunu minimize eden operasyonel taksonomik ünitelerin parçalarını bulmaktır. Bu yöntem kullanılarak dal uzunluğu parsimonide olduğu kadar hızlı bir şekilde elde edilebilir.[73]

### 2.6.3 Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar

Filogenetik amaçlı kullanılan programlar hem Pc hem de MAC versiyonları için üretilmiş. Fakat bir çok araştırmacı MAC versiyonlarını kullanmayı tercih etmektedir. Çünkü filogenetik analiz için kullanılan programların MAC versiyonları daha ileri ve üst düzey sürümdedir. Filogenetik analizde en çok tercih edilen programlar PAUP\*, PHYLIP ve MRBYES' dir.[64] Bu programların önerdiği ağaçları bilgisayarda görüntüleyebilmek içinde Treeview kullanılır.[75]

#### 2.6.3.1 PAUP\* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods*)

Parsimoni dahil olmak üzere pek çok algoritmayı kullanarak filogenetik analiz yapmaya yarayan ücretli bilgisayar programıdır.[76] PAUP 4.0b10'un sahip olduğu bazı özellikler aşağıda belirtildiği gibidir:

- 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, yıldızbozulma 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 örneklendirme analizi yapılabilir.
- 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.

### **2.6.3.2 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 (posterior) olasılık dağılımlarını hesaplamaktır. [77]

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

### **2.6.3.3 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.[78]

### PHYLIP’de Kullanılan Programlar:

- DNA dizileri
- Protein dizileri
- Restrüksiyon bölgeleri
- Uzaklık matrisleri
- Gen frekansları
- Kantitatif (Nicel) özellikler
- Ayırıcı özellikler
- Ağaç çizimi, ortak karar (consensus) ağaçları, ağaç uzaklıkları ve ağaç işlemleri

PHYLIP büyük olasılıkla en geniş şekilde dağılmış filogeni paketidir. PAUP ve MrBayes’ten sonra üçüncü en çok kullanılan filogenetik paketidir. PHYLIP 1980 yılının Ekim ayından beri kullanımdadır ve 26 000’nin üzerinde kayıtlı kullanıcısı vardır.



### 3. MATERİYAL METOD

#### 3.1 Bitki Materyallerinin Toplanması ve Saklanması

Kullanılan bitki materyallerinden bazıları Balıkesir Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi ve akademik danışmanım Yard. Doç. Dr. Fatih Coşkun tarafından taksonların Türkiye Florası’nda belirtilen lokalitelerine göre toplanmıştır. *Lupinus albus* ise, Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Mustafa Yorgancılar tarafından tohum olarak çalışmamızda kullanılmak üzere sağlanmıştır. *Lupinus albus* tohumları, çimlendirilmiş ve taze materyal elde edilmiştir. Taze materyaller silika jelde saklanmıştır. Kullanılan materyallerin bir kısmı ise çeşitli herbaryumlardan elde edilmiştir. Bu çalışma içerisinde yer alan bitki materyallerine ait daha detaylı bilgi Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Kullanılan bitki materyalleri ve lokaliteleri

Takson Adı	Toplandığı Lokalite	Toplayan	Ek Bilgiler
<i>L. albus subsp. albus</i>	Konya Doğanhisar-Deşdiğin Kasabası	Mustafa YORGANCILAR	Bu örnek tohumdan çimlendirildi.
<i>L. angustifolius</i>	Kozak Yaylası, İzmir: Bergama, 630 m, 24.04.10	Fatih COŞKUN	Yol kenarında, hafif kumlu toprakta, mavi çiçekli.
<i>L. micranthus</i>	Germencik, Aydın  320 no’ lu yolda, Selçuk’ tan Germencik’ e doğru giderken toplandı. GPS’ e göre koordinatları: N37 52.806 E27 31.917 yolun sol tarafında. Ekim 2012 de	Fatih COŞKUN  Ali ÇELİK	Mor çiçekli

<i>L. varius</i>	Muğla-Faralya Köyü	Spitzenberger (Ege Üniversitesi Herbaryumu-23300)	Herbaryumdan DNA izolasyonu için yaprak parçası örneği alındı.
<i>L. luteus</i>		İtalya-Torino Herbaryumu	
<i>L. anatolicus</i>	Batal Köyü, Gaziantep: Nizip  700-800 m' de tarla kenarından toplandı. 18.06.2001 tarihinde.	Fatih YAYLA-Ergün Özuslu	Elman İskenderov tarafından tanımlandı.*
<i>Cytisus sp.</i>	Kozak yaylası, İzmir:Bergama  Yol kenarında 690 m' de toplandı	Fatih COŞKUN	Sarı çiçekli.
<i>L. hispanicus</i>	Örnek elde edilemedi		DNA dizileri gen bankasından temin edildi.
<i>L. albus subsp. graecus</i>	Örnek elde edilemedi		DNA dizileri gen bankasından temin edildi.
<i>L. angustifolius subsp. reticulatus</i>	Örnek elde edilemedi		DNA dizileri gen bankasından temin edildi.

Tablo 2' nin devamı.

(\*: Bu tür Elman İskenderov tarafından *Lupinus varius* olarak tanımlanmıştır. Yaptığımız dizi analizine göre bu tür Gen Bankası'nda *Lupinus anatolicus* ile eşleşmektedir. Daha detaylı bilgi sonuçlar kısmında verilmiştir.)

### 3.2 Dış Grup Seçimi

Yapılan literatür taramalarına göre, gerek ITS bölgesine dayalı gerekse *rbcL* bölgesine dayalı filogeni çalışmalarında *Lupinus* cinsine en yakın çıkan cinsler belirlenmiştir. *Cytisus* ve *Cercis* cinsleri dış grup olarak seçilmiştir.

### 3.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmaların bir kısmı, Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi moleküler biyoloji araştırma laboratuvarında, bir kısmı ise Carl von Ossietzky Üniversitesi (Almanya) Botanik Bölümü araştırma laboratuvarlarında yürütülmüştür. Türkiye’de yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasallar Merck, Sigma Aldrich, Applichem, Biolabs, Fermantas firmalarından satın alınmıştır.

Almanya’da yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasallar ise Merck, Fermentas, Machery-Nagel, Analytic-Jena, Kulzer firmalarından satın alınmıştır.

#### 3.3.1 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Genomik DNA izolasyonlarında bir den fazla yöntem takip edilmiştir. Bu yöntemler;

- Fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi
- 2XCTAB yöntemi
- Sigma DNA ekstraksiyon kiti
- Nücleospin DNA ekstraksiyon kiti
- Analytic Jena DNA ekstraksiyon kiti

DNA izolasyonunda kullanılan kitler için; kit içeriğinde yer alan kimyasal maddeler kit protokolüne göre uygulandı.

Fenol kloroform-izoamil alkol yönteminde kullanılan kimyasal maddeler tablo 3’ de gösterilmiştir.

**Tablo 3:** Fenol-kloroform izoamil alkol yönteminde kullanılan solüsyonlar ve bileşimleri

<b>Solüsyon</b>	<b>Bileşim</b>
İzolasyon tamponu (1L)	33.6 gr Üre 0.5 M EDTA (pH:8) 1 M Tris-HCl (pH:8) 5 M NaCl % 10 SDS
Fenol-kloroform-izoamil alkol	25:24:1
NaAc(Sodyum Asetat)	3 M, pH:5.2
İzopropil alkol	% 100
TE	10 mM
RNAz A	10 mg/mL
ETOH	% 70 ve % 90'lık

CTAB2X yönteminde kullanılan kimyasal maddeler tablo 4' te gösterilmiştir.

**Tablo 4:** CTAB yönteminde kullanılan kimyasal maddeler

<b>Solüsyon</b>	<b>Bileşim</b>
CTAB buffer	1 M Tris-HCl (pH:8)
$\beta$ -Mercaptoetanol	% 0.2
Proteinaz K	0.1 mg/mL
Kloroform-izoamil alkol	24:1
İzopropil alkol	% 100
TE	10 mM
RNAz A	10 mg/mL
NH <sub>4</sub> Ac (Amonyum Asetat)	7.5 M, 5.8 PH
ETOH	% 70 ve % 100

Sigma DNA ekstraksiyon kiti, Nükleospin DNA ekstraksiyon kiti ve Analytic Jena DNA ekstraksiyon kiti ile yapılan DNA izolasyonlarında kit içeriği ile birlikte verilen protokol takip edilmiştir.

### 3.3.2 Agaoroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz jel elektroforezi için ilk önce 5X' lik TBE tmponu hazırlanır. Daha sonra bu tampon stok olarak kullanılır. Stok tampondan seyreltme yapılarak 0.5X' lik TBE tamponu hazırlanır. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar tablo 4' de gösterilmiştir.

**Tablo 5:** 5X TBE Hazırlamak için kullanılan malzemeler ve miktarları

<b>Kullanılan Kimyasal</b>	<b>Miktarı</b>
Tris-Base	54 g
Borik Asit	27.5 g
0.5 M EDTA	20 ml
Saf Su	1 L' ye tamamlanır

### 3.3.3 PCR İçin Gerekli Kimyasal Malzemeler

Integrated DNA Technologies (IDT A.B.D.) firmasından temin edilen primerler, 15.000 rpm' de 15 sn santrifüj yapıldıktan sonra üzerine 1 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek stok hazırlandı. Daha sonra her primerin son konsantrasyonu 5 nmol/ml (5 µM) olacak şekilde seyreltme işlemleri gerçekleştirildi. PCR' da kullanılan kimyasal malzemeler ve miktarları Tablo 5' de gösterilmiştir.

**Tablo 6:** PCR' da kullanılan kimyasallar ve miktarları

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Miktarı</b>	<b>Konsantrasyonu</b>
dH <sub>2</sub> O	10.8 µl	-
Tampon	2.5 µl	10X
DMSO	2.5 µl	-
Reverse Primer (ITS 4)	2.5 µl	pmol / ml
Forward Primer (ITS 5A)	2.5 µl	pmol / ml
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µl	25 mM

dNTP	0.4 µl	10 mM
Taq DNA Polimeraz	0.3 µl	5 IU
gDNA	2 µl	-
Toplam	25 µl	-

**Tablo 7:** Kullanılan Primerler ve dizileri

Primer	Nükleotid Dizisi (5'-3')	Tm Sıcaklığı	Primer Dizaynını Yapan
Forward ITS 5A	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49.9 °C	Kenneth J. Wurdack tarafından (Alice M. Stanford, 2000)[79]
Reverse ITS 4	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	52.1 °C	Bruce G. Baldwin, 1992 - White et al.,1990[79]

### 3.3.4 DNA İzolasyonları

#### 3.3.4.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol DNA İzolasyon Yöntemi

Fenol kloroform izoamil alkol yöntemi 'Molecular Cloning A Laboratory Manuel' adlı kitaptaki DNA izolasyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır.[80]

- Her bitki örneğinden 100 gr tartılır ve havanda sıvı azot ile toz haline getirilene kadar öğütülür.
- Toz halindeki örnekler 2 µl' lik ependorf tüplere aktarılır. Her tüpe 600 µl izolasyon tamponu eklenir. Bir kaç defa tüpler alt-üst edilir ve vortex yapılır.
- Tüplerin her birine 500 µl fenol-kloroform-izoamil alkol eklenir. 12.000 rpm' de 5' santrifüj yapılır.
- Oluşan süpernatant yeni 2 µl' lik ependorf tüplere alınır. (Yaklaşık 500 µl)

- Süpernatant hacminin % 10' u kadar (50 µl) NaAc (3 M, 5.2 pH) eklenir ve alt-üst edilir.
- Süpernatant hacmi kadar (500 µl) izopropil alkol eklenir. Bir kaç defa alt-üst edilir. Bu aşamada DNA çıplak gözle küçük yumaklar halinde görülebilir.
- 12.000 rpm' de 2' santrifüj yapılır ve DNA' nın dibe çökmesi sağlanır.
- Süpernatant atılır ve oluşan pellet üzerine 500 µl (10 mM, 8 pH) eklenir. Pipetaj yapılarak pelletin çözülmesi sağlanır.
- Her tüpe 5 µl RNaz A (10 mg/mL) eklenir. Pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanır. 37 °C' de 30' inkübe edilir.
- RNA uzaklaştırıldıktan sonra 50 µl NaAc (3M) eklenir ve alt-üst edilir. % 90'lık ETOH eklenir ve -80 °C' de 10' beklemeğe bırakılır.
- 10' 13.000 rpm' de santrifüj yapılır. Santrifüj sonrasında ETOH uzaklaştırılır ve dipte pellet oluşur.
- Dipteki pellet üzerine % 70'lik ETOH eklenerek yıkanır. 12.000 rpm' de santrifüj yapılır. Santrifüj sonrasında sıvı kısım atılır. Dipte pellet kalır.
- Ependorf tüpler kurutma kağıdı üzerine yan yatırılır ve ETOH' nun iyice uçması sağlanır.
- Son olarak oluşan gDNA çökeltisi üzerine 50 µl TE veya 200 µl saf su eklenerek pipetaj ile çözülür.

#### **3.3.4.2 CTAB DNA İzolasyon Yöntemi**

Bu yöntem, Doyle & Doyle (1987)[81], Drábková ve ark. (2002)[82] ve Cota-Sánchez ve ark. (2006)[83] modifiye edilmiştir.

- İzolasyona başlamadan önce CTAB solüsyonu 60 °C' de inkübe edilir.
- Örnekler 100 mg tartılır ve sıvı azot ile toz haline gelene kadar öğütülür.

- Toz haline gelen örnekler 2 µl' lik ependorf tüplere aktarılır ve her tüpe 700 µl CTAB solüsyonu eklenir. Alt-üst edilerek iyice karışması sağlanır.
- Her tüpe 1.5 µl Proteinaz K ve β-Mercapto etanol eklenir. 60 °C' de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon çeker ocakta yapılmalıdır.
- Daha sonra örnekler 14.000 rpm' de 4 °C' de 5' santrifüj yapılır.
- Santrifüjden sonra oluşan süpernatant yeni ependorf tüplere aktarılır.
- Her tüpe 600 µl Kloroform-izoamil alkol (24:1) eklenir. 14.000 rpm' de 5' santrifüj yapılır.
- Süpernatant yeni ependorf tüplere aktarılır. Kloroform-izoamil alkol içeren tüpler atılır.
- Her tüpe 500 µl kloroform izoamil alkol (24:1) eklenir ve 14.000 rpm' de 5' santrifüj yapılır. Santrifüjden sonra oluşan süpernatant uzaklaştırılır.
- Her tüpe 500 µl izopropil alkol eklenir. Dikkatli bir şekilde alt-üst edilir. -20 °C' de 2 saat inkübasyona bırakılır. (Drábková ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu yöntemde inkübasyon süresi en az 3 gündür.)
- İnkübasyondan alınan tüpler 14.000 rpm' de 10' santrifüj edilirler. Santrifüjden sonra sıvı kısım atılır. DNA dipte pellet olarak gözlenir.
- Pellet üzerine % 70' lik ETOH eklenir ve 14.000 rpm' de 10' santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır ve pellet üzerine 100 µl TE eklenir. Pipetaj yapılarak pelletin çözülmesi sağlanır.
- Her tüpe 1 µl RNaz A eklenir ve 37 °C' de 30' inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyondan sonra 50 µl 75. M NH<sub>4</sub>Ac eklenir ve dikkatli bir şekilde alt-üst edilir.
- 300 µl % 100' lük ETOH eklenir ve -20 °C' de 2 saat inkübasyona bırakılır.
- 14.000 rpm' de 30' santrifüj yapılır. Süpernatant atılır. 200 µl % 70' lik ETOH eklenir.
- 14.000 rpm' de 10' santrifüj yapılır. Süpernatant atılır ve ETOH' nun iyice uçması için tüpler oda sıcaklığında 5' bekletilir.



- Son olarak pelletin çözülmesi için 100 µl TE eklenir ve pipetaj yapılarak çözülür.

### **3.4 Agaroz Jel Elektroforezi**

Sonuçların görsel hale getirilmesi için % 0.8 konsantrasyonda agaroz jel kullanıldı. Bunun için 0.8 g agaroz ve 100 mL 0.5 X' lik TBE tamponu kullanılır. Jelde görüntü elde edebilmek için 1 µl etidyum bromür eklenir.

Örnekler yüklenirken 3 µl örnek ve 3µl yükleme boyası (6X loading dye) kullanıldı. DNA merdiveni olarak 1 kb'lik DNA ladder kullanıldı. Örnekler 100 V'da 40' yürütüldü ve transilluminatör ile UV de görüntülenip fotoğraf haline dönüştürülür.

### **3.5 DNA Miktar Tayini**

DNA miktar tayinleri Almanya Carl von Ossietzky Üniversitesi laboratuvarlarındaki NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer cihazı ile gerçekleştirildi. Ölçümlere ait sayısal veriler bulgular kısmında detaylı olarak gösterilmiştir.

### **3.6 PCR Reaksiyonları**

DNA izolasyonlarından sonra, elde edilen dDNA' lar kalıp olarak kullanıldı ve ITS bölgesinin tamamı PCR ile çoğaltıldı. PCR total volume 25 µl olarak gerçekleştirildi. Her reaksiyon için pozitif ve negatif kontrol kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan kimyasal miktarları kullanılan kimyasal maddeler kısmında verilmiştir. Çalışmada kullanılan PCR programı tablo 8' da gösterilmiştir.

**Tablo 8:** PCR programının özellikleri

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Ön Denatürasyon	94°C	5dk	1 döngü
Denatürasyon	94°C	30sn	35 döngü
Primer Bağlanma (Annealing)	50°C	45sn	
Uzatma (Extension)	72°C	1dk	
Son Uzatma (Final Extension)	72°C	10dk	1 döngü
Son Sıcaklık (Final Hold)	4°C	25sa	

### **3.7 Verilerin Toplanması**

#### **3.7.1 DNA Dizilerinin Eldesi (Cycle Sequencing) ve Poliakrilamid Jelde ya da Kapiler Elektroforezle Görüntülenmesi**

Elde edilen ITS bölgesine ait PCR ürünleri, okulumuz bünyesinde Otomatik Cycle Sequencing cihazı olmadığı için hizmet alımı yapılarak REFGEN adlı firmaya gönderilmiştir. Cycle Sequencing sonucu elde edilen DNA dizileri ab1 uzantılı dosyalar olarak elde edildi. Hizmet alımı sonucu elde edilen veriler bulgular kısmında detaylı olarak verilmiştir.

#### **3.7.2 DNA Dizilerinin Görsel Olarak Sequencher ile Gözden Geçirilmesi**

REFGEN' den gelen DNA diziler, profesyonel ve ücretli bir program olan Sequencher 4.10.1 kullanılarak analiz edilmiştir. Bu programda DNA dizileri görsel olarak incelendi, oluşan kontiglerin durumuna göre konsensus dizileri elde edildi ve ClustalW ve Multalin adlı programlarda hizalanmak üzere bir word dosyasına kopyalandı.

### **3.7.3 DNA dizilerinin homoloji açısından CLUSTAL veya MULTALIN ile hizalanması**

Elde edilen konsensus dizileri internet üzerinden ücretsiz olarak da kullanılabilen ClustalW ve Multalin programları ile programların varsayılan ayarları kullanılarak hizalandı ve fasta formatına dönüştürüldü. Elde edilen dizilerin fasta formatı Ekler kısmında detaylı olarak verilmiştir.

### **3.7.4 Hizalanmış verilerin #NEXUS formatına çevirimi ve PAUP\*ta analize hazır hale getirilmesi**

ClustalW ve Multalin ile hizalanmış diziler PAUP\*'da analize hazır hale getirilmek için program formatına uygun hale getirildi. PAUP\*' programının kullandığı #NEXUS formatına dönüştürüldü. Bu format içerisine, takson sayısı, takson isimleri, karakter sayısı, kullanılan karakter çeşitleri (A, T, G, C) gibi veriler girildi ve PAUP\*'ta gerekli algoritmalar kullanılarak analiz edildi.

### **3.7.5 PAUP\*'ta Filogenetik Analiz Yapımı**

Elde edilen *Lupinus* cinsine ait diziler, filogenetik analiz yapmak amacı ile kullanılan, oldukça popüler olan PAUP\* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0b10 filogenetik analiz yazılımı kullanılarak analiz edildi.

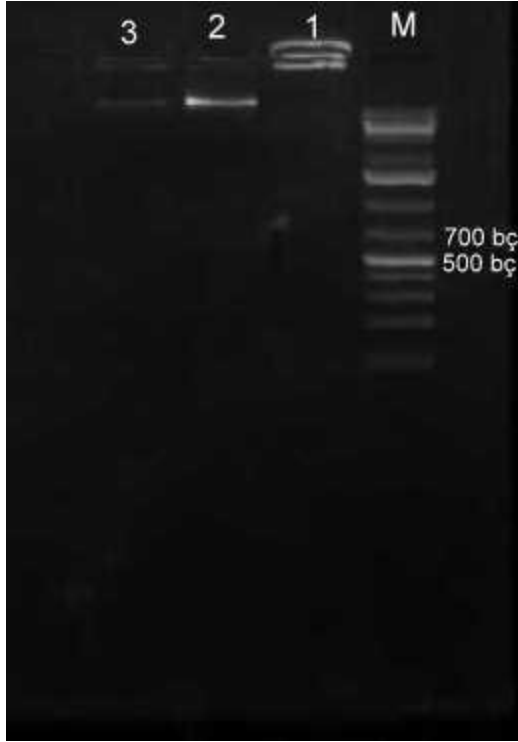
Analiz yapılırken karakter temelli çalışan parametreler tercih edildi ve 'Optimality Criterion' olarak Parsimoni seçildi. Arama parametresi olarak Heuristic Search ve BootStrap algoritmaları seçilmiştir. Mesafe temelli yöntemlerden ise UPGMA ne NJ kullanılarak fenetik sonuçlar elde edilmiştir.

Analiz yapılırken kullanılan kriterler, karakterler ve analiz sonuçları tartışma bölümünde detaylı olarak verilmiştir.

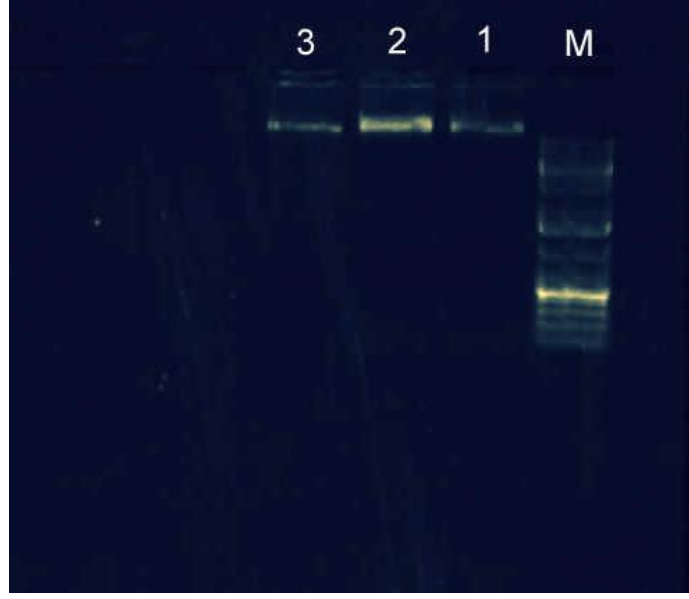
## 4. BULGULAR

### 4.1 Genomik DNA

Elde edilen gDNA'ların jel fotoğrafları sırası ile gösterilmiştir.

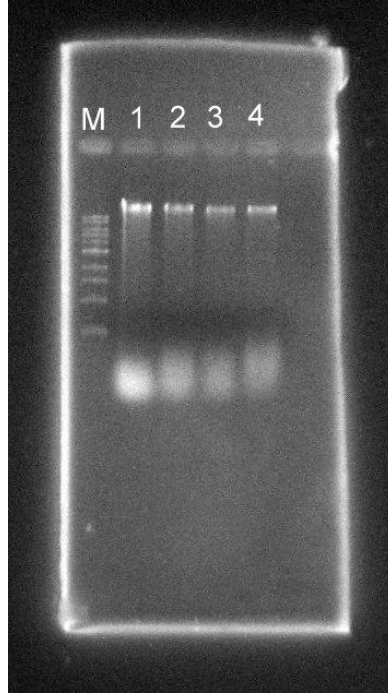


**Şekil 14:** Fenol Kloroform izoamil alkol yöntemi ile elde edilen gDNA'ların jel görüntüsü  
M: DNA merdiveni, 1: *Lupinus albus*, 2: *Lupinus angustifolius*, 3: *Lupinus varius*



Şekil 15: CTAB yöntemi ile elde edilen gDNA'ların jel görüntüsü

M: DNA merdiveni, 1: *Lupinus albus*, *Lupinus micranthus*, *Lupinus anatolicus*



Şekil 16: Analytik Jena Kit ile elde edilen gDNA'ların jel görüntüsü

M: DNA merdiveni, 1: *Lupinus luteus*, 2: *Lupinus angustifolius*, 3: *Cytisus sp.*, 4: *Cercis siliquastrum*

#### 4.1.1 DNA Miktar Tayinleri

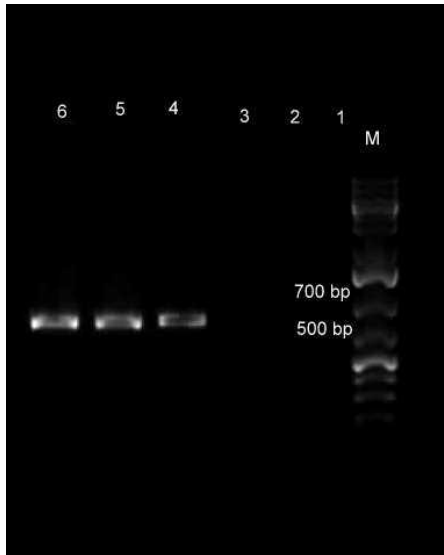
gDNA' ların Nanodrop spektrofotometre ölçüm sonuçları tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 9:** gDNA' ların spektrofotometre ölçümleri

Tür Adı	Miktarı (ng/μl)
<i>Lupinus albus</i>	801.20
<i>Lupinus angustifolius</i>	183.28
<i>Lupinus varius</i>	82.05
<i>Lupinus micranthus</i>	31.04
<i>Lupinus luteus</i>	47.42
<i>Lupinus anatolicus</i>	30.15
<i>Cytisus sp.</i>	79.13

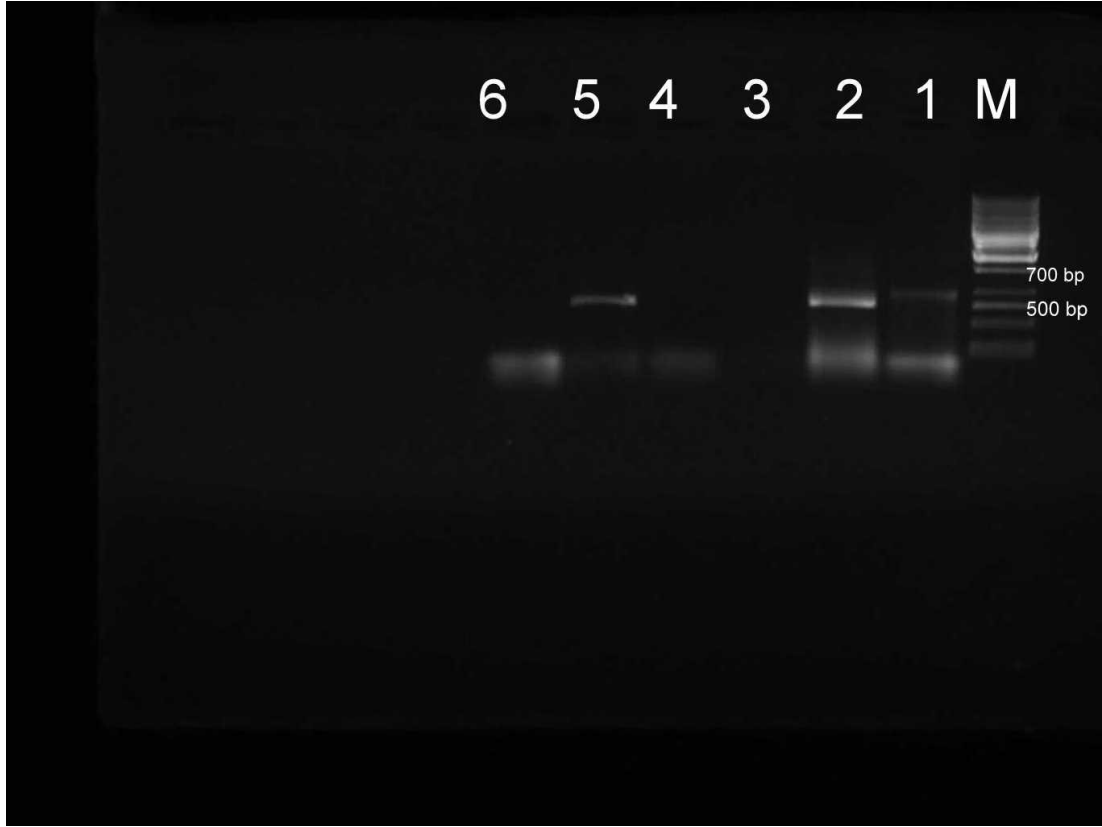
#### 4.2 PCR Ürünleri

PCR sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi jel fotoğrafları şekil 17 ve şekil 18 de gösterilmiştir.



**Şekil 17:** Bazı *Lupinus* türlerinin ITS ile elde edilen PCR görüntüsü

M: DNA merdiveni, 3: *Lupinus angustifolius*, 4: *Cytisus spinescens*, 5: *Lupinus anatolicus*



Şekil 18: Bazı *Lupinus* Türlerine ait ITS PCR jel görüntüsü

M: DNA merdiveni, 1: *Lupinus albus*, 2: *Lupinus micranthus*, 5: *Cercis siliquastrum*

**Branch-and-Bound parametreleri:**

Branch-and-bound search settings:

Optimality criterion = parsimony

Character-status summary:

Of 784 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

273 characters are constant

264 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 247

Gaps are treated as "missing"

Initial upper bound: unknown (compute heuristically)

Addition sequence: furthest

Initial 'MaxTrees' setting = 100

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero

'MulTrees' option in effect

Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

Branch-and-bound search completed:

Score of best tree found = 613

Number of trees retained = 2

Time used = 0.00 sec

**Bootstrap parametreleri:**

Bootstrap method with heuristic search:

Number of bootstrap replicates = 100

Starting seed = 983477546

Optimality criterion = parsimony

Character-status summary:

Of 784 total characters:

All characters are of type 'unord'

All characters have equal weight

273 characters are constant

264 variable characters are parsimony-uninformative

Number of parsimony-informative characters = 247

Gaps are treated as "missing"



Starting tree(s) obtained via stepwise addition

Addition sequence: simple (reference taxon = GC9)

Number of trees held at each step during stepwise addition = 1

Branch-swapping algorithm: tree-bisection-reconnection (TBR)

Steepest descent option not in effect

Initial 'MaxTrees' setting = 100

Branches collapsed (creating polytomies) if maximum branch length is zero

'MulTrees' option in effect

Topological constraints not enforced

Trees are unrooted

100 bootstrap replicates completed

Time used = 0.43 sec

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan araştırma ve analiz sonuçlarına göre, Türkiye’ de yetişen 9 *Lupinus* (Fabaceae) taksonu için filogenetik analiz yapılmış ve ITS bölgesi baz alınarak filogenetik ağaçlar elde edilmiştir.

Öncelikle *Cercis siliquastrum* ve *Cytisus sp.* türleri dış grup olarak atanmıştır. Dış gruplardan biri olan *Cytisus sp.* Yard. Doç. Dr. Fatih Coşkun tarafından toplanmıştır ve Davis’ in Türkiye Florası’ na göre teşhis yapılmıştır. Yapılan morfolojik teşhis sonucunda elde edilen örneğin *Argyrolobium crotalarioides* (Fabaceae) olduğuna karar verilmiştir. Daha sonra bu türün ITS bölgesine ait DNA dizisi elde edilmiştir. Elde edilen dizi Genbank’tan blast yapıldığı zaman elde edilen dizinin *Cytisus* cinsine ait türlerle yakın eşleşme gösterdiği görülmüştür. En yakın eşleşme gösterdiği tür *Cytisus spinescens*’ dir. Fakat bu türle elde edilen eşleşme de 17 nükleotidlik bir fark vardır. Filogenetik analiz çalışmalarında 17 nükleotidlik fark çok büyük anlam taşıdığı için bu dış grup örneği *Cytisus sp.* olarak kabul edilmiştir. Tezin yayına dönüştürülme aşamasında tam tür teşhisi yapılacaktır. Yeni bir tür olup olmadığı, en azından Türkiye Florası için yeni bir kayıt olup olmadığı tesbit edilecektir.

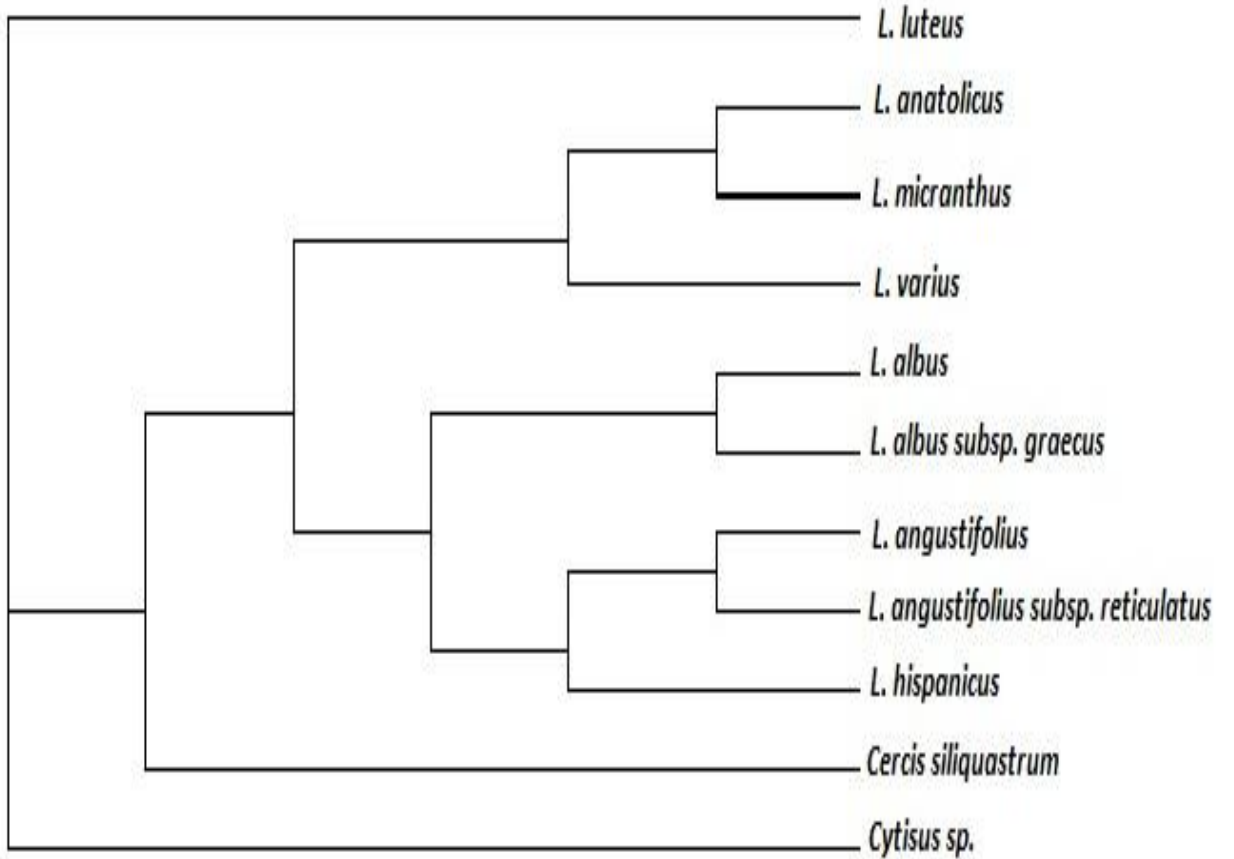
İç grup taksonlarından olan *Lupinus anatolicus*, Gaziantep Üniversitesi Herbaryumu’ ndan temin edilmiştir. Gaziantep Üniversitesi Öğretim elemanlarından Araş. Gör. Fatih Yayla tarafından bu örneğin teşhisi *Lupinus varius* olarak yapılmıştır. Bu örnekten elde edilen ITS bölgesine ait DNA dizileri Gen Bank’ ta Blast’lanmıştır. Yapılan işlem sonucunda elde ettiğimiz DNA dizilerinin % 99 oranında sadece 1 nükleotid farkla *Lupinus anatolicus* ile eşleştiği görülmüştür. Bu örnekten elde edilen diziler analizlerde *Lupinus anatolicus* olarak kullanılmıştır.

Yapılan analizlerde maksimum parsimoni kriteri kullanılarak Heuristic search analizi yapılmıştır. Oluşan dalların değerlendirilmesinde TBR (Tree-bisection-reconnection) algoritması seçilmiştir.

Analiz için seçilen parametrelere göre;

- Tüm karakter tipleri düzensizdir (unordered),
- Tüm karakter tipleri eşit ağırlıktadır.

Yapılan analiz sonucuna göre toplamda 787 karakterden 245 tanesi parsimoni açısından bilgi verici bulunmuştur. 312 karakter sabit (constant) ve 230 karakter değişken karakter olarak bulunmuştur. En iyi parsimoni ağaçlarının basamak sayısı 654 olarak bulunmuştur. Analiz sonunda sadece bir tane en iyi ağaç elde edilmiştir. Elde edilen ağaç şekil 20' de gösterilmiştir.

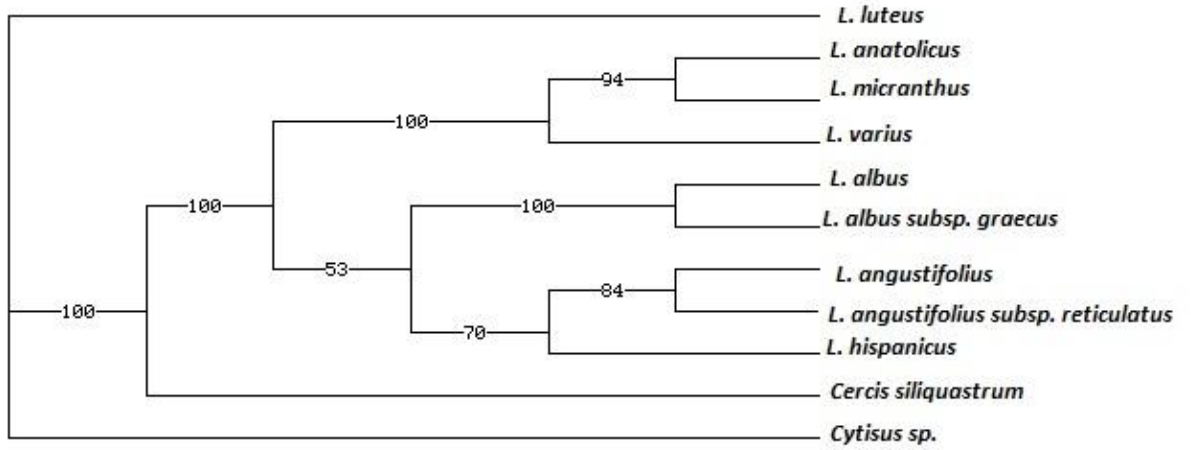


Şekil 19: Parsimoni kriteri kullanılarak elde edilen 1 nolu Heuristic Search ağacı

Analizde kullanılan 11 taksondan *Cytisus sp.* ve *Cercis siliquastrum* dış grup, diğer taksonlar iç grup olarak atanmıştır. Elde edilen ağaca göre *Lupinus albus* ve *Lupinus albus* subsp. *graecus* ile *Lupinus angustifolius* ve *Lupinus angustifolius* subsp. *reticulatus* birer monifiletik grup oluşturmuşlardır. Diğer taraftan *Lupinus micranthus* ve *Lupinus anatolicus* da kendi arasında bir monofiletik grup oluşturmuşlardır. Bu guruba en yakın olarak ta *L. varius* bulunmuştur. *Lupinus luteus* ise ağacın en üst kısmında ayrı olarak yer almaktadır. *Lupinus luteus* bitkisine ait herbaryum örneği çok eski ve miktar olarak az olduğu için bu türün sadece ITS2 bölgesi elde edilebildi ve analize sadece ITS2 bölgesi dahil edildi. *Lupinus luteus*' un soyağacında diğer *Lupinus* türlerinden bu şekilde ayrı yer alması bundan kaynaklanıyor olabilir.

Aynı zamanda maksimum parsimoni kriteri kullanılarak Bootstrap analizi de yapılmıştır. Böylece oluşan dalların parsimoni kriterine göre istatistiki açıdan güvenilirlikleri sayısal olarak gösterilmiştir. Analiz yapılırken program elde edilen dala %' lik bir değer verir. Eğer Oluşan dal %50' nin altında bir değere sahip ise o dal zayıf olarak nitelendirilir ve o dal program tarafından çökertilir. Çöken dal sonucu oluşan basamaklanmamış dallanma politomi olarak adlandırılır.

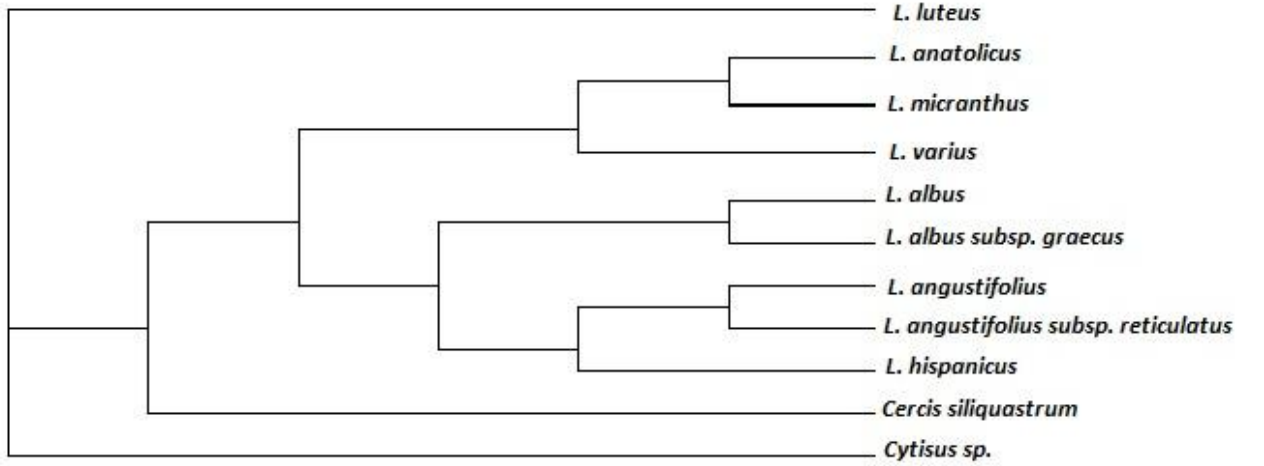
Bootstrap analizi yapılırken maksimum ağaç sayısı, takson sayısı çok fazla olmadığı için 100 olarak seçildi. Tekrar (replicate) sayısı 100 olarak belirlenmiştir. Maksimum ağaç sayısı ve tekrar sayısı arttırıldığı zaman analiz daha uzun sürebilmektedir. Bootstrap analizi sonucu elde edilen ağacın dallarına %' lik değerler eklenmiştir. Oluşan bootstrap ağacı şekil 21' de gösterilmiştir.



**Şekil 20:** Parsimoni kriterine göre elde edilen Bootstrap ağacı

Bootstrap analizine göre elde edilen dalların %' lik değerleri ağaç üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 20). Bootstrap desteğine göre *L. albus* ve *L. albus subsp. graecus*' un oluşturduğu dala verilen güvenilirlik % 100'dür. *L. anatolicus* ve *L. micranthus*' un oluşturduğu monofiletik grubun bulunduğu dalın Bootstrap değeri %94' iken bu monofiletik grupla *L. varius*' un bağlanmış olduğu dalın bootstrap değeri %100' dür. Dış gruplar ise beklenildiği gibi bu gruplardan tamamen ayrı çıkmıştır.

Kullanılan diğer bir karakter temelli yöntem de Branch-and-Bound yöntemidir. Parsimoni kriteri kullanılarak Branch-and-Bound algoritması kullanılarak analiz yapılmıştır. Yapılan analizde 787 karakterden 245 tanesi parsimoni açısından bilgi verici olarak bulunmuştur. 312 karakter sabit (constant) ve 230 karakter değişken olarak bulunmuştur. Parsimoni açısından en iyi parsimoni ağacındaki basamak sayısı 564 tür, yalnızca bir tane parsimonik açıdan en iyi ağaç elde edilmiştir. Ağaç sayısının sınırlı bulunması takson sayısının azlığından kaynaklanmaktadır. Branch-and-Bound algoritması sonucu elde edilen filogenetik ağaç şekil 22' de gösterilmiştir.

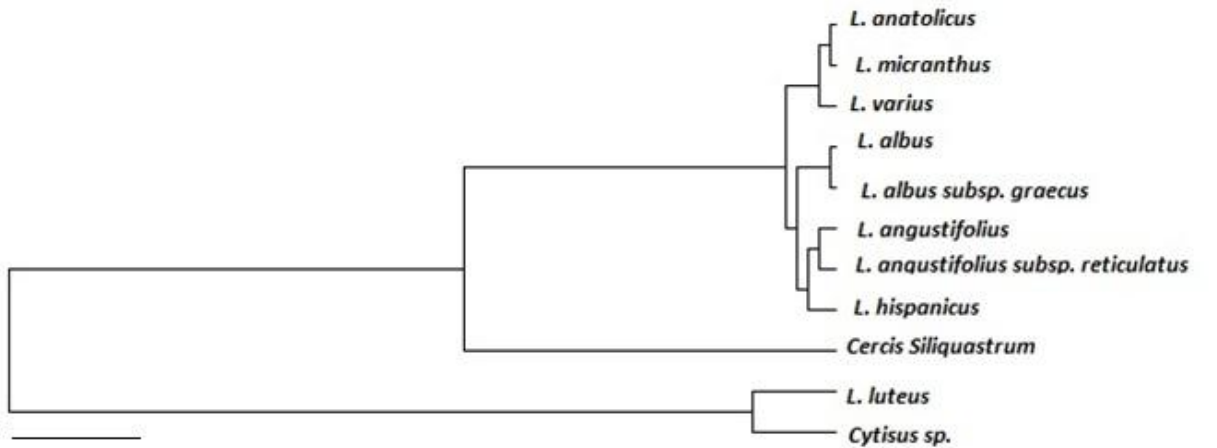


Şekil 21: Parsimonu kriterine göre elde edilen Branch-and-Bound ağacı

Branch-and-Bound algoritması ile elde edilen tek ağaç Heuristic Search algoritması ile elde edilen ağaç ile aynıdır.

Karakter temelli yöntemlerle birlikte mesafe temelli (fenetik) yöntemlerden UPGMA ve NJ algoritmalarına göre de analiz yapılmıştır.

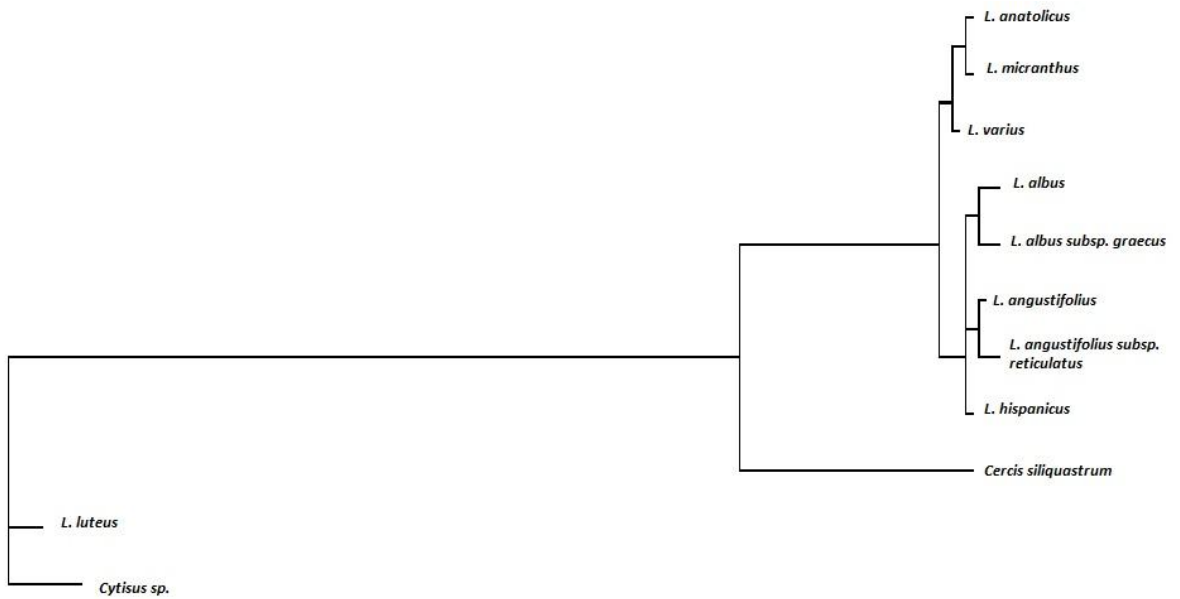
UPGMA yönteminde dizi çiftleri arasındaki farkın uzaklığına göre analiz yapılır. Bu uzaklıklar taksonlar arası uzaklık matrisi oluşturmak için kullanılır. Uzaklık metodunda temel olarak küme temelli ve optimalite temelli algoritmalar kullanılır. UPGMA analizinde tarihsel zaman hakkında tam bir bilgi söz konusu değildir. Elde edilen UPGMA ağacı Şekil 23’ de gösterilmiştir.



Şekil 22: UPGMA ağacı

UPGMA algoritmasına göre elde edilen ağaçta, *Lupinus anatolicus* ve *Lupinus micranthus* bir monofiletik grup oluşturmuş, *Lupinus albus* ve *Lupinus albus* subsp. *graecus* bir monofiletik grup oluşturmuştur. *Lupinus angustifolius* ve *Lupinus angustifolius* subsp. *reticulatus* da bir monofiletik grup oluşturmuştur.

Diğer mesefa temelli yöntem ise Neighbour Joining algoritmasıdır. NJ algoritması kullanılarak elde edilen ağaçlarda dal uzunlukları bir birinden farklıdır. Bu şekilde dallarda uzunluk farkının meydana gelmesi taksonlarda meydana gelen değişim miktarını gösterir. Elde edilen ağaçta en solda eski tarihli(en eski ata)'den başlayarak sağa doğru günümüze en yakın taksona/örneğe doğru ağaç dalları devam eder. NJ algoritması ile elde edilen ağaç şekil 23' de gösterilmiştir.



Şekil 23: NJ algoritması ile elde edilen filogenetik ağaç

Sonuç olarak, Türkiye’de yayılış gösteren *Lupinus* türlerinin filogenisine göre *L. albus* ve *L. angustifolius* alt türlerinin taksonomik isimlendirilmelerinin ve teşhislerinin doğru olduğu ve bunların diğer taksonlara göre gerçekten yakın akraba oldukları, hem filogenetik hem de fenetik kriterlere göre söylenebilir.

*Lupinus angustifolius* ve *Lupinus* subsp. *reticulatus*’ un oluşturduğu monofiletik gruba kardeş olan *Lupinus hispanicus* morfolojik açıdan karşılaştırıldığı zaman, Üç tür de birbirine yakın boylanma göstermektedir. Üç türde yaklaşık 28-80 cm kadar boylanabilen ve her üç türde hafif kumlu topraklarda yetişebilen türlerdir. Bu verilere

bakarak da bu üç türün birbirine yakın akraba olarak filogenetik ağaçlarda yer alması beklenen bir sonuçtur.

*Lupinus micranthus* ve *Lupinus anatolicus*' un da oluşturduğu monofiletik grup morfolojik ve ekolojik verilerce desteklenmektedir. Her iki türde kaliks ve korolla büyüklüğü açısından birbirine yakındır. Yaşadığı toprak biçimi açısından benzer türlerdir. Her iki türde kumlu topraklarda, deniz seviyesinden yaklaşık olarak 100 m yükseklikte yetişen Mediternean bölge bitkileridir. Bu nedenle bu iki türün monofiletik bir grup oluşturması beklenen bir sonuçtur.



## 6. KAYNAKLAR

1. Seçmen, Ö., *Tohumlubittkiler Sistematığı*, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, (1995).
2. Davis, P.H., *Flora of Turkey and East Aegean Island.*, vol 3, Edinburg: Edinburg University Press, 38-39, (1970).
3. Işık, F.E., 'Edirne Bölgesinde Yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi', Yüksek lisans tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne, (2005).
4. Small, E., Lassen, P. And Brookes B.S., *An expanded circumscription of *Medicago* (Leguminosae, Tnifoliae) based on explosive flowe*, *Willdenowia*, 415-437, (1987).
5. Kurlovich, B.S., *Lupins (Geography, classification, genetic resources and breeding)*, Petersburg: Russia. Intan St. , (2002)
6. Palibin, I.V., *Flora SSSR.*, Moskova: Leningrand., 430-442, (1945).
7. Özen, F., and Aka, G. E., 'A New Record for the Flora of Turkey: *Lupinus angustifolius* L. subsp. *reticulatus* (Desv.) Coutinho (Fabaceae)'. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1, 33-35, (2007).
8. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K. H. C., *Flora of Turkey and East Aegean Island (Supplement 2, volume 10*, Edinburg: Edinbur University Press, 113-114, (2000).
9. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K. H. C., 'Flora of Turkey and East Aegean Island (Supplement 2)', Edinburg: Edinburg University Press., 113-114, (2000).
10. Lessico, L., 'Lupino', (15.10.2012), <http://www.summagallicana.it/lessico/l/lupino.htm>
11. Davis, P.H., 'Flora of Turkey and East Aegean Island', Edinburg: Edinburg Univesity Press., 39-40, (1970).
12. Davis, P.H., 'Flora of Turkey and East Aegean Island', Edinburg: Edinburg Univesity Press, 40, (1970).
13. <http://yabanicicek.com/lupinus-varius.php>. (16.10.2012)
14. <http://www.eweb.unex.es/eweb/botanica/herbarium/html/luphis.htm>. (16.10.2012)
15. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration\\_Lupinus\\_luteus1.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration_Lupinus_luteus1.jpg). (16.10.2012)
16. Golovchenko, O.F., *Lupin: An Ecologically Clean Mediterranean Crop.*, *Montenegrina*, 7(2): 423-427, (2008).
17. Çömlekçioğlu, N., Karaman, Ş., 'Kahramanmaraş Şehir Merkezindeki Aktar'larda Bulunan Tıbbi Bitkiler', *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 11(1), (2008).
18. Okuyucu, F., Kır, B., Akdemir, H., Okuyucu, B.R. ve Baygın, M. , 'Ödemiş Koşullarında Bazı Ak Acı (*Lupinus albus* L.), Sarı Tatlı (*Lupinus luteus* L.) ve Mavi Tatlı (*Lupinus Angustifolius* L.) Lüpen Çeşitlerinin Verim ve Yem İçerikleri Üzerine bir Araştırm', *Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 41(3), 89-98, (2004).

19. Mohamed, A.A.and Duarte P.R., 'Composition of Lupinus albus', *American Association of Cereal Chemists.*,72 (6), 63-64, (1995).
20. Hakkı, E.Ş., Yorgancılar, M., Atalay, E., Uyar, S., ve Babaoğlu, M. , 'Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (BTDAP=ISSR) tekniği ile yerli lüpen genotiplerinde (Lupinus albus L.) genetik varyasyonun belirlenmesi', *Bitkisel Araştırma Dergisi*,2, 1-5, (2007).
21. Karagüzel, O., 'Farklı Tuz Kaynak ve Konsantrasyonlarının Güney Anadolu Doğal Lupinus varius Tohumlarının Çimlenme Özelliklerine Etkisi', *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*,16(2),211-220, (2003).
22. Aïnouche, A. and M.-T. Misset, 'Molecular phylogeny, diversification and character evolution in Lupinus (Fabaceae) with special attention to Mediterranean and African lupines', *Plant Syst. Evol.*, 246, 211-222, (2004).
23. Wiktor, S.I., Wojciech K. S., and Wolko, B., 'Lupinus anatolicus - a new lupin species of the Old World', *Genetic Resources and Crop Evolution*,43, 109-117, (1996).
24. Camillo, T. M., Pozzobon, M. F., T. M., and Wittmann, M. T., 'Chromosome Numbers in South American Andean Species of Lupinus (Leguminosaea)', *Bonplandia*, 15(3-4), 113-119, (2006)
25. Conterato, I.F. and Wittman, M. T. S., 'New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of Lupinus (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150, 229-240, (2006).
26. Käss, E., and Wink, M., 'Molecular phylogeny and phylogeography of Lupinus (Leguminosae) inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene and ITS 1 + 2 regions of rDNA' *Plant Syst. Evol.*, 208, 139-167, (2008).
27. Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B. K., *Molecular Systematics*, Massachusetts: USA: Sunderland, (1996).
28. Coyne, J.A., *Isozymes: Current Topics in Biological Medicine Research*, Vol 6, (1982)
29. Khan, S. and.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).
30. Buth, D.G., 'The Application of Electrophoretic Data in Systematic Studies', *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 15, 501-522, (1984).
31. Tamam, A., 'Bazı Avokado (Persea americana Mill.) Çeşitlerinin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu', Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana, (2008).
32. Gülşen, O. ve .Mutlu, N., 'Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları', *Alatarım*,4 (2), 27-37, (2005).
33. Saiki, R.K., Stoffel, S., Scharf, S.J., Hiquchi, R., Horm, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. , 'Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase', *Science*, 239, 487-491, (1998).
34. Owen, J.L. and Michelmores, R.W., 'Single Primer Amplification of Avian Genomic DNA Detects Polymorphic Loci', *Ann. Biotechnol.*, 2, 107-122, (1991).
35. Yu, E., Park, S.J. and Poysa, V., 'Marker-assisted Selection of Common Beans for Resistance to Common Bacterial Blight: Efficacy and Economics', *Plant Breeding*, 119 411-415, (2000)
36. Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 'Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs' *Microsatellites and Machines*, 9, 275-279, (1993).

37. Tautz, D., 'Hypervariability of Simple Sequences as General Source for Polymorphic DNA Markers', *Nucleic Acid Research*, 463-6471, 17, (1989).
38. Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. and Creagan, P.B., 'Length Polymorphism of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean', *Genetics*, 132, 1131-1139, (1992).
39. Cregan, P.B., 'Simple Sequence Repeat DNA Length Polymorphism', *Probe*, 2, 18-22, (1992).
40. Schlotterer, C. and Tautz, D., 'Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA', *Nucleic Acid Research*, 20, 211-215, (1993).
41. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 'Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification', *Genomics*, 1994. 20, 176-183, (1993).
42. Fang, C.T., Roose, M.L., Krueger, R.R. and Federici, C.T., 'Fingerprinting trifoliolate Orange Germplasm Accessions with Isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeats', *Theor. Appl. Genet.*, 95, 211-219, (1997).
43. Paran, I.A. and Michelmore, R.W., 'Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce', *Theor. Appl. Genet.*, 85, 985-993, (1993).
44. Konieczyn, A. and Asubel, F.M., 'A Procedure for Mapping Arabidopsis Mutations Using Co-dominant Ecotype-specific PCR-based Markers', *Plant J.*, 4, 403-410, (1993).
45. Zabeau, M and Vos, P., 'Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method for DNA Fingerprints', *European Patent Application. Publ.*, (1993)
46. Ergül, A., 'Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon', Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2000).
48. Friedrich, M. and Tautz, D., 'Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods', *Nature*, 376, 165-167, (1995).
49. Hwang, M.Y., Yu, H S., Kim, T O., Yun, H C., Kim, T H., Kong, H H. and Chung, D., 'Phylogenetic Relationships Among *Acanthamoeba* spp. Based on PCR-RFLP Analyses of Mitochondrial Small Subunit rRNA Gene', *The Korean Society for Parasitology*, 37(3), 181-188, (1999).
50. Baldwin, B.G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. and 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).
51. White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, W.J. and Diego., 'Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications', *Academic Press*, 315-22, (1990).
52. Baldwin, B.G., 'Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae', *Molec. Phylogenetics Evol.*, 1, 3-16, (1992).
53. Baldwin, B.G., and Markos, S., '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).

54. Ozad, A., 'Bazı Scorzonera L. (Asteraceae) Taksonlarının nrDNA ITS Bölgelerinin Karşılaştırılması', Yüksek lisans tezi, Rize Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Rize, (2000).
55. Maxam A., G.W., 'A new method of sequencing DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-564, (1977).
56. Sanger F. and Coulson A.R., 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*,. 74, 5463-5467, (1977).
57. Sambrook, J.F. and Maniatis, T. , *Molecular Cloning, a laboratory manual*, New York.: Cold spring harbor laboratory Press, (1989).
58. <http://www.bio.davidson.edu/courses/bio111/seq.html>.15.09.2012
59. Klug, S.W., Cummings, W.R., *Concept of Genetics*, New Jersey: Prentice Hall. 745, (1989).
60. Thompson, J.D., Higgins, D.G, and Gibson, T.J., 'CLUSTALW: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choic', *Nucleic Acid Research*, 22, 4673, (1994).
61. Corpet, F., 'Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering', *Nucleic Acids Res.*, 16, 10881-10890, (1988).
62. Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B. K., *Molecular Systematics*, Massachusetts: USA: Sunderland, (1996).
63. Tez, C., 'Türkiye' de Yayılış Gösteren Sideritis L. (Lamiaceae) Cinsinin Empedoclia Seksiyonuna ait Taksonların ITS Çekirdek Ribozomal DNA Dizilerine Dayalı Filogenetik Analizi', Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Balıkesir, (2011).
64. Freeman S. and Herron, J.C., *Evrimsel Analiz*, ed. B. Çıplak, Basıbüyük. H. H., Karayug. S. ve Gündüz. İ., Palme Yayıncılık, (1999)
65. Mount, D., *Chapter 7 Phylogenetic prediction*, in *Bioinformatics 2001*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, (1975).
66. Saitou N. and İmanishi, 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*, 6, 514-525, (1989).
68. Bradley, E., 5. 'The Bootstrap, in The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans', *Journal of Molecular Evolution*, 27-36, (1982).
69. Wolf, M.J., et al., 'TrExML: a maximum-likelihood approach for extensive tree-space exploration', *Bioinformatics*, 16(4), 383-394, (2000).
70. Felsenstein, J., 'Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach', *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368-376, (1981).
71. Mark, E. and David, A., *Basic Bayesian Methods*. Topics in Biostatistics, ed. W.T. Ambrosius, Humana Press Inc: Totowa, (2007).
72. Saitou, N. and M. Nei, 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees', *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425, (1987).
73. Michener, C.D. and Sokal, R.R., 'A quantitative approach to a problem of classification', *Evolution*,. 11, 490-499, (1957).
74. Treeview, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.(06.10.2012)
75. PAUP, [online]<http://paup.csit.fsu.edu/>.(09.10.2012)

76. MR.Bayes, [online] <http://mrbayes.csit.fsu.edu/>. (09.10.2012)
77. Washington,[online] <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.(13.11.2012)
78. Alice M., Stanford, R.H. and Clifford R. Parks, 'Phylogeny and Biogeography of Juglans (Juglandaceae) Based on mATK and ITS Sequence Data', *American Journal of Botany*, 87/6, 872, (2000).
80. Doyle, J.J.and Doyle J.L., 'A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue', *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15, (1987).
81. Drábková L, and Kirschner,V.C., 'Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae', *Plant Mol. Biol. Rep*, 20, 161-175, (2002).
82. Sanchez-Cota, H.J., Remarchuk, K. and Ubayasena, K. , 'Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue', *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 161-167, (2006).

# **EKLER**

## 7. EKLER

ClustalW' da hizalanmış Türkiye' de yetişen *Lupinus türlerinin* ve Dış grup olarak kullanılan *Cercis siliquastrum* ve *Cytisus sp.*' nin ITS5A nrDNA dizilerinin veri matrisi

>*Lupinus albus*

```
AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAAGCCTCACAAAGCAGTGCACCCCGTGAATTTGTTTTACTACTCAGGGGTGGCTA
GAGGTGTTTTGGCACCTCGGCCCCCTCGTGTGTCAGGAGGCGCCACACCCCTGTGCGGTCTCCTCCTGGCCTAATAACAAAACCCCGGCGCGAACGCGC
CAAGGAAATTGAAATCGTTTAGTTTCGCCCCCGTTCGCCCGGAGACGGTGTCTGTCGCGGGCGGCGTTGCGACACGCTTATCCTAAAGACTCTCGGCAA
CGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAAGCTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA
GTTGCGCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCAGCCCTGCCTGGGTGTTGCACATCGTTGCCCGTGCCTTGGCCACGTGCTAGGCACCAAGCGGGCG
AATGTTGGCTTCCCGTGAAGCAATGTCTACGGTTGGTTGAAAACCTGAGTCCGCGGTGGAGGGCGCCGTGATGGATGGTGGCTGAGTTAATGCTCGAG
ACCGATCGTGCCTGTTACCCCAACAGCTTTGCGACTCTTTGACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGGTCAGGCGGGGCTA
CCCGCTG
```

>*Lupinus albus* subsp. *graecus*

```
TCGAAGCCTCACAAAGCAGTGCACCCCGTGAATTTGTTTTACTACTCAGGGGTGGCTAGAGGTGTTTTGGC
ACCTCGGCCCCCTCGTGTGTCAGGAGGCGCCACACCCCTGTGCGGTCTCCTCCTGGCCTAATAACAAAACCC
CGGCGCGGAACGCGCAAGGAAATTGAAATCGTTTAGTTTCGCCCCCGTTCGCCCGGAGACGGTGTCTGTCG
CGGGCGGCGTTGCGACACGCTTATCCATCGTTGCCCGTGCCTTGGCCACGTGCTAGGCACCAAGCGGG
GCGAATGTTGGCTTCCCGTGAAGCAATGTCTACGGTTGGTTGAAAACCTGAGTCCGCGGTGGAGGGCGCCG
TGATGGATGGTGGCTGAGTTAATGCTCGAGACCGATCGTGCCTGTTACCCCAACAGCTTTGCGACTCTT
TGACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGG
```

>*Lupinus anatolicus*

```
CGTAACAAGTTCCTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAAGCCTCACAAAGCAGAGCGACCCCGTGAATTTGTTTTACTACTCAGGGGTG
GGCAGAGGTGTTTTGCACCTCGGCCCCCTCGTGTGTCAGGAGGCGCGCAGCCTCTGTGGTCTCCTCCTGGCCTAATAACAAAACCCCGGCGCGGAAC
GCGCAAGGAAATTGAAATCGTTTAGTTTCGCCCCCGTTCGCCCGGAGACGGTGTCTGTCGCGGGCGGCGTTGCGACACGCTTATCCTAAAGACTCTCG
GCAACGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAAGCTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAC
GCAAGTTGCGCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCAGCCCTGCCTGGGTGTTGCACATCGTTGCCCGTGCCTTGGCCACGTCTTGGCACCAAGCGG
GGCGAATGTTGGCTTCCCGCGAGCAATGTCTACCGTTGGTTGAAAACCTGAGTCCGCGGTGGAGGGCGCCGTGATGGATGGTGGCTGAGTTAAAGC
TCTAGACCGAACGTCGCTGTACCCCAACCGGCTCTGCGACTCTTTGACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGGTCAGGCGG
GCTACCCG
```

>*Lupinus angustifolius*

```
AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAAGCCTCACAAAGCAGTGCACCCCGTGAATCTGTTTTACTCCTCAGGGGTGGCTAGAGG
TGTTTTGGCACCTCGGTCCCCCTCGTGTGTCAGGAGGCGCCACACCCCTGTGCGGTGTCCTCCTGGCCTAATAACAAAACCCCGGCGCGGAACGCGCAAG
GAAATTGAAATCGTTTAGTTTCGCCCCCGTTCGCCCGGAGACGGTGTCTGTCGCGGGCGGCGTTGCGACACGCTTATCCTAAAGACTCTCGGCAACGGA
TATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAAGCTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTG
CGCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCAGCCCTGCCTGGGTGTTGCACATCGTTGCCCGTGCCTTGGCCACGTGCTAGGCACCAAGCGGGCGAATGT
TGGCTTCCCGCGAGCAATGTCTACCGTTGGTTGAAAACCTGACTCCGCGGTGGAGGGCGCCGTGATGGATGGTGGCTGAGCTAAAGCTCGAGACCGA
TCGTGCGTGTACCCCAACAGCTTTGCGACTCTTTGACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGGTCAGGCGGGGCTAC
```

>*Lupinus angustifolius* subsp. *reticulatus*

```
TCGAAGCCTCACAAAGCAGTGCACCCCGTGAATCTGTTTTACTCCTCAGGGGTGGCTAGAGGTGTTCCGC
ACCTCGGTCCCCCTCGTGTGTCAGGAGGCGCCACACCCCTGTGCGGTGTCCTCCTGGCCTAATAACAAAACCC
CGGCGCGGAACGCGCAAGGAAATTGAAATCGTTTAGTTTCGCCCCCGTTCGCCCGGAGACGGTGTCTGTCG
CGGGCGGCGTTGCGACACGCTTATCCATCGTTGCCCGTGCCTTGGCCACGTGCTAGGCACCAAGCGGGG
CGAATGTTGGCTTCCCGCGAGCAATGTCTACCGTTGGTTGAAAACCTGAGTCCGCGGTGGAGGGCGCCGT
GATGGATGGTGGCTGAGCTAAAGCTCGAGACCGATCGTGCCTGTTACCCCAACAGCTTTGCGACTCTTT
GACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGG
```

>*Lupinus varius*

```
CAAGTTCCTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCAAGCCTCACAAAGCAGAGCGACCCCGTGAATTTGTTTTACTACTCAGGGGTGGCAGA
GGTGTGTTTTGCACCTCGGCCCCCTCGTGTGTCAGGAGGCGCGCAGCCTCTGTGGTCTCCTCCTGGCCTAATAACAAAACCCCGGCGCGGAACGCGCCA
AGGAAATTGAAATCGTTTAGTTTCGCCCCCGTTCGCCCGGAGACGGTGTCTGTCGCGGGCGGCGTTGCGACACGCTTATCCTAAAGACTCTCGGCAACG
GATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAAGCTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGT
```

TGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCTGCCTGGGTGTTGCACATCGTTGCCCCCGTGCCTTGGCCACGTGCTAGGCACCAAGCGGGGCGAA  
TGTTGGCTTCCCGCGAGCAATGTCTACGGTTGGTTGAAAAGTGTAGTCCGCGGTGGAGGGGCGCGTGTGATGGATGGTGGCTGAGTTAAAGCTCTAGA  
CCGAACGTGCGTGCACCCACCAGCTCTGCGACTCTTTGACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGGTCAGGCGGGGCTAC  
CCGCTGA

>*Lupinus luteus*

ACTGAGGTTTCATTAGGAGGCCAACAGACCCCATGGGTCAAAGAGTCGCAAAGCTGGTGGGGGTGACACGCACGACCCGGTCTCGAGCTTTAGCTCAG  
CCACCATCCATCAGGGCGCCTCCACCGGGACTCAGTTTTCAACCAACCGTGAGACATTTGCTCCCGGAAGCCAACATTCGCCCCGCTTCGTGCCT  
GGCAGCTGGCCAAAGCACGGGGGCAACGATGTGCAACCCAGGAGCGTGCCTCGGCCAATGGCTTCGGGCGCAACTTGCCTTCAAAGACTCG  
ATGTTTACGGGATTTCTCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGTACGTTCTTTCATCGATGCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGA

>*Lupinus micranthus*

AGGTGAACCTCGCGAAGGATCATTGTGGAAGCCTCACAGCAGAGCGACCCCGTGAATTTGTTTTACTACTCAGGGGTGGGAGAGGTGTTTTGCAC  
CTCGGCCCCCTCGTGTGAGGAGCGCCGACCCCTCTGTGGTCTCCTCTGGCGTAATAACAAAACCCCGCGCGGAACCGCCAAGGAAATGAAA  
TCGTTTAGTTCGCCCCGTCGCCCCGAGACGGTCTCGTGCGGGCGCGTTCGACACGCTTATCCTAAAGACTCTCGCAACGGATATCTCGGCT  
CTTGCATCGATGAAGAAGTACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCCCGGAAGC  
CATTAGGCCGAGGGCACGCTGCCTGGGTGTTGCACATCGTTGCCCCCGTGCCTTGGCCACGTTCTTGGCACCAAGCGGGGCGAATGTTGGCTTCCC  
CGGAGCAATGTCTCAGGGTTGGTTGAAAAGTGTAGTCCGCGGTGGAGGGGCGCGTGTGATGGATGGTGGCTGAGTTAAAGCTCTAGACCGAAGCTGCCT  
GTCACCCCCACCGGCTCTGCGACTCTTTGACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGGTCAGG

>*Lupinus Hispanicus*

TCGAAGCCTCACAAAGCAGTGCAGCCCGTGAATCTGTTTTACTACTCAGGGGTGGCTAGAGGTGTTTGGC  
ACCGCGTCCCGCTCGTGTGAGGAGCGCCACACCCCTCTGCGGTGTCTCCTGGCCTAATAACAAAACCC  
CGGCGCCGAACCGCCAAGGAAATGAAATCGTTTAGTTCGCCCCCGCGCGCCGAGACGGTGTCTGTG  
CGGGCGCGTTCGACACGCTTATCCTAAAGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAA  
GAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG  
TTGCGCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCTGCCTGGGTGTTGCACATCGTCCCGCTGCCTTGG  
CCAGTGCAGGCACCAAGCGGGGCGAATGTTGGCTTCCCGGAGCAATGTCTCAGGGTTGGTTGAAAAC  
TGAGTCCGCGGTGGAGGGCGCGTGTGATGGATGGTGGCTGAGCTAAAGCTCGAGACCGATCGTGCCTGTC  
CCCCACAGCTTTGCGACTCTTTGACCCATGGGGGTCTGTTGGCCTCCTAATACGGGAACCTCAGG

>*Cercis siliquastrum*

AGGTTCCGTAGGTGAACCTCGCGAAGGATCATTGTGAGACCTCACAAAACAGCAGCAGCCCGGAATCTGTTTTATGATATGGGTGGCGGAGGGCAC  
ATTCTGTCCGAGCCCCCAGTCTGGATGGGACACAGCAGGCTTGGCTGTGCGTGTCTGTCGCGGCAACAACGAAACCCCGGCGCCAGTGCAGC  
CAAGGAACCTAACATAACAGCGTGCCTTGTGCGCCCGGGAACGGTGCCTTACAGGGTGCCTCGCGACATTTGTATCCAAAACGACTCTCGGCAAC  
GGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGTACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAG  
TTGCGCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCTGCCTGGGTGTTCAAACATCGTTGCCCAAACACAATGCTCTTCCGGGCATCATGTGAAGGGCG  
GATGCTGGCTTCCCGTGCAGGCGCTCGCGGTTGGCCAAATGCGAGTCCAGGTTGGCGAGCACCAGCAGCAGGTTGGTGAAGTACGCTCGAAGC  
CAGTCTCGCTGTCTCGTCCCAATACAGGCTCCTTACCCCTTTGCATCCCACGGATGCTCCAACGCGACCCAGGTCAGGGGGCTACCGCTGA

>*Cytisus sp*

TTTTCTTACACAGCTAAGTGATACGGCGAGTACTGAGGTTCCGGTCTTGGCGGCCAACGACCCCATGGGTACAGAGTTCGCAAATCTGGTGGG  
GGTGACACGCACGATCGGCTCTGAGCTTTAACTCAGCCACCATCCATCAGGCGCCCTCCACCAGGACTCACTTTTCAACCAACCGTGAGACGCTG  
CTCGCGGAAGCCAACATTCGCCCCACTTGGTGCCTAACCGTGGCCAGGGCACTGGGGCAACGATGTGCAACACCCAGGCAAGGCTGCCCTCAGCC  
TAATGGCTTTGGGCGCAACTTGGTTCAAAGACTCGATGGTTCAGGGATTTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTTCATCGAT  
GCAAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCTTTCCGATACGCGTGTGCAACCGCCCGTACGGTCAACGCTCTCGGGCCGACGAGGGGCGACTA  
AACGATTTCAATTTCCCTTGGCGCTTCGCGCCCGGGGTTTTGTTATTGGGCCAGGAGACACACAAGGTTGGCGCTCCCGACACGAGGGGGAC  
CAGGGTCCGAACACCTCTGGCCACCCCGAGTAGTCAAACATATTACAGGGTGCAGTCTTGTGAGGCTTCGACAATGATCTTCCGCGAGTT  
CACCTACGGAAACCTTGTACGACTTCTCCTACCCTCAAATGATAAGGCTTAAAAATTAATATGAGGAAAGATGGTTGTT