ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DEKİ BAZI *Weissia* sp. (POTTIACEAE) TAKSONLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ

Simge ÇİZGEN TAN

ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Simge ÇİZGEN TAN tarafından hazırlanan **"Türkiye'deki Bazı *Weissia* sp. (Pottiaceae) Taksonlarının Moleküler Sistematiği"** adlı tez çalışması 06.07.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ

Eş Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY

Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. Gökhan ABAY
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Güzel Sanatlar, Tasarım ve Mimarlık Fakültesi)

Üye: Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ
(Çankırı Karatekin Üniveristesi, Orman Fakültesi)

Üye: Doç. Dr. Üstüner BİRBEN
Çankırı Karatekin Üniveristesi, Orman Fakültesi)

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Türkiye'deki Bazı *Weissia* sp. (Pottiaceae) Taksonlarının Moleküler Sistematiği"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (06.07.2020).

Öğrencinin Adı Soyadı
Simge ÇİZGEN TAN
(İmza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DEKİ BAZI *Weissia* sp. (POTTIACEAE) TAKSONLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ

Simge ÇİZGEN TAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman**:** Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ
Eş Danışman: Doç. Dr. Sezer OKAY

Türkiye'de damarlı bitkiler üzerinde yapılmış birçok moleküler sistematik çalışması mevcuttur. Fakat damarsız bitki gruplarından olan briyofitler üzerine ülkemizde şimdiye kadar sonuçlanan moleküler sistematik konusunda çalışmalar bulunmamakla beraber, bu konuda bazı cinsler üzerine devam eden bir kaç araştırmanın da olduğu bilinmektedir. Bu çalışma *Weissia* sp. taksonları üzerine moleküler anlamda Türkiye'de gerçekleştirilmiş ilk çalışmadır. Türkiye'de şimdiye kadar kaydı verilen 14 *Weissia* sp. taksonu bulunmaktadır. Bu taksonlar sırasıyla şunlardır; *Weissia brachycarpa* (Nees & Hornsch) Jur., *W. breutelii* Müll. Hal., *W. squarrosa* (Nees & Hornsch) Müll. Hal., *W. controversa* Hedw., *W. controversa* var. *crispata* (Nees & Hornsch) Nyholm, *W. condensa* (Voit) Lindb., *W. condensa* var. *armata* (Thér. & Trab.) M.J. Cano, Ros & J. Guerra, *W. crispata* (Dicks.) Brid. ex Schumach, *W. leptocarpa* Schimp. ex Besch., *W. longifolia* Mitt., *W. rupestris* Hedw. C. Müll., *W. rutilans* (Hedw.) Lindb., *W. wimmeriana* var. *muralis* (Spruce) Breidl., *W. wilsonii D.A. Callaghan (Syn :W. multicapsularis (Sm.) Mitt.)* Türkiye'den kaydı verilen bu taksonlardan; *Weissia brachycarpa*, *W. controversa*, *W. controversa* var. *crispata W. condensa*, *W. longifolia*, *W. rutilans*, *W. squarrosa*, *W. wilsonii* olmak üzere 8 taksona ulaşılmış ve *rps4*, *atpB-rbcL* ve *psbA* gen bölgeleri ile analizler yapılmıştır. Bitkilerin gerek çok küçük olması, gerekse elde edilen örneklerin miktarlarının az olmasından dolayı en iyi dizileme sonucu *W. brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* türlerinden elde edilmiş ve bu taksonlara ilişkin filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

2020, 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Weissia* sp., Pottiaceae, Karayosunu, Filogenetik ağaç, Moleküler, Türkiye

ABSTRACT

Master Thesis

MOLECULAR SYSTEMATICS of SOME *Weissia* sp. (POTTIACEAE) in TURKEY

Simge ÇİZGEN TAN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Forest Engineering

Supervisor**:** Associate Professor Dr. Serhat URSAVAŞ
Co-Advisor: Associate Professor Dr. Sezer OKAY

Many molecular systematic studies performed on vascular plants in Turkey. However, although there are no studies on molecular systematics that have been concluded in our country on bryophytes, which are one of the vascular plant groups, it is known that there are also several studies on some species on this subject. This study is the first study was carried out in *Weissia* sp. taxa on Turkey in molecular terms. Turkey has so far given the *Weissia* sp. record 14 taxa. Working with the 14 *Weissia* sp. species were registered in Turkey is planned. These species are; *Weissia brachycarpa* (Nees & Hornsch) Jur., *W. breutelii* Müll. Hal., *W. squarrosa* (Nees & Hornsch) Müll. Hal., *W. controversa* Hedw., *W. controversa* var. *crispata* (Nees & Hornsch) Nyholm, *W. condensa* (Voit) Lindb., *W. condensa* var. *armata* (Thér. & Trab.) M.J. Cano, Ros & J. Guerra, *W. crispata* (Dicks.) Brid. ex Schumach, *W. leptocarpa* Schimp. ex Besch., *W. longifolia* Mitt., *W. rupestris* Hedw. C. Müll., *W. rutilans* (Hedw.) Lindb., *W. wimmeriana* var. *muralis* (Spruce) Breidl., *W. wilsonii D.A. Callaghan (Syn :W. multicapsularis (Sm.) Mitt.)*. Only 8 species have been reached from such species have spread in Turkey. These are *Weissia brachycarpa*, *W. controversa*, *W. controversa* var. *crispata*, *W. condensa*, *W. longifolia*, *W. rutilans*, *W. squarrosa*, *W. wilsonii*. Analysis was done with *rps4*, *atpB-rbcL* and *psbA* gene regions. The best sequencing results were obtained from *Weissia brachycarpa* and *W. controversa* var. *crispata* species. Therefore, phylogenetic tree was created with these species.

2020, 73 pages

Key Words: *Weissia* sp., Pottiaceae, Moss, Phylogenetic tree, Molecular, Turkey

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

"Türkiye'deki Bazı *Weissia* sp. (Pottiaceae) Taksonlarının Moleküler Sistematiği" adlı Yüksek Lisans Tez çalışması 2017-2020 yılları arasında hazırlanarak Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalında "Yüksek Lisans Tezi" olarak sunulmuştur.

Çalışmamın her safhasında, yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımı benden esirgemeyen, beni her zaman destekleyen, değerli danışman hocam; Sayın Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmamın değişik aşamalarında gelişmem ve ilerlemem için üzerimde emeği olan saygı değer hocam; Doç. Dr. Sezer OKAY'a teşekkür ederim.

Bazı *Weissia* taksonların temin edilmesinde, bizlere örnek gönderen; Prof. Dr. Tülay EZER, Prof. Dr. Mesut KIRMACI, Doç. Dr. Nevzat BATAN, Doç. Dr. Muhammet ÖREN'e çok teşekkür ederim.

Bu aşamaya gelmemde bana emeği geçen tüm hocalarıma, hakkı hiçbir zaman ödenemeyecek olan anneme ve babama, hiçbir desteği benden esirgemeyen sevgili eşim Fevzi TAN'a, adını burada sayamadığım ve katkısı olan herkese ayrıca şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, bu çalışma "Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından Lisansüstü Tez Projesi (Proje no: OF061218L03) kapsamında desteklenmiştir.

Simge ÇİZGEN TAN
Çankırı, 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiii**
1.GİRİŞ **1**
1.1 Briyofitler ve Yaşam Döngüsü **3**
1.2 Canlıların Sınıflandırılması ve Tarihsel Gelişimi **8**
1.3 Sistematik **8**
2. MOLEKÜLER SİSTEMATİK **14**
2.1 Dünya'da ve Ülkemizde Moleküler Sistematiğin Durumu **14**
2.2 Morfolojik Markörler **18**
2.3 Biyokimyasal Markörler **19**
2.4 Moleküler Markörler **21**
2.5 Moleküler Sistematikte Kullanılan Teknikler **24**
2.6 cpDNA, mtDNA, nDNA, rRNA, DNA Barkot Özellikleri ve Filogeni **28**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **32**
3.1 Materyal **32**
3.1.1 *Weissia* sp. örneklerinin temini **32**
3.1.2 *Weissia* sp. örneklerinin morfolojik yönden karşılaştırılması **32**
3.2 Yöntem **39**
3.2.1 Primer Dizayn **39**
3.2.2 Genomik DNA'nın Saflaştırılması **39**
3.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi **40**
3.2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) **40**
3.2.5 Jel Ekstraksiyon **41**
3.2.6 DNA dizilerinin elde edilmesi ve biyoinformatik analizler **41**
4. BULGULAR **43**

4.1 *rps4* geni örnekleri için jel ekstraksiyon ve dizi analizleri 43
4.2 *psbA* geni örnekleri için jel ekstraksiyon ve dizi analizleri 46
4.3 *atpB-rbcL* geni örnekleri için jel ekstraksiyon ve dizi analizleri..... 52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 56
KAYNAKLAR 59
EK 1 Tanımlar..... 65
EK 2 Solüsyon ve Tamponlar..... 67
EK 3 Kullanılan Kimyasallar..... 68
EK 4 Boyut Belirteçleri..... 69
ÖZGEÇMİŞ..... 70

SİMGELER DİZİNİ

A	:Adenin
AFLP	:Amplified Fragment Length (çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi)
BOLD System	:The Barcod of Life Database System
BLAST	:Basic Local Alignment Search Tool
C	:Sitozin
CBOL	:Consortium for the Barcode of Life
^{o}C	:Santigrat Derece
cpDNA	:Kloroplast DNA'sı
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asid
EST	:Expressed Sequence Tags (ifade edilmiş dizi etiketleri)
G	:Guanin
IGS	:Inter-Genetic Spacer (ara-genetik bölgeler)
ISSR	:Inter-SSR Amplification (ara-basit dizi tekrarı çoğaltımı)
ITS	:Internal Noncoding Transcribed Spacer Region (transkripsiyonu yapılan iç ara bölgeler)
M.Ö.	:Milattan Önce
M.S.	:Milattan Sonra
mRNA	:Mesajcı RNA
mtDNA	:Mitokondri DNA'sı
NTS	:Non-transcribed Spacer Region (transkripsiyonu yapılan bölgeler)
nDNA	:Nükleer (çekirdek) DNA'sı
PCR	:Polymerase Chain Reaction
PZR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	:Random Amplified Polymorphic DNA (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RFLP	:Restriction Fragment Length Polymorphism (kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)
rRNA	:Ribozomal RNA

SCAR	:Sequence Characterized Amplified Regions (karakterize dizi çoğaltılmış bölgeler)
SNPs	:Single Nucleotide Polymorphism (tek nükleotit polimorfizmi)
SRAP	:Sequence Related Amplified Polymorphism (dizi bağlantılı çoğaltılmış polimorfizm)
SSR	:Simple Sequence Repeats (basit dizi tekrarları)
STR	:Short Tandem Repeats (kısa tandem tekrarları)
T	:Timin
vd.	:ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Bir talluslu ciğerotu (*Riccia nigrella* DC.) 3
Şekil 1.2 Bir boynuzotu (*Phaeoceros laevis* (L.) Prosk.) 4
Şekil 1.3 Bir karayosunu (*Weissia brachycarpa*) 4
Şekil 1.4 Akrokarp karayosunu yapısı Ursavaş & Keçeli 6
Şekil 1.5 Karayosunu yaşam döngüsü 7
Şekil 2.1 *Cinclidotus asumaniae* 19
Şekil 2.2 PCR Çalışma Döngüsü 27
Şekil 3.1 *Weissia brachycarpa* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Yaprak taban hücresi, c. Spor, d. Yaprak orta hücresi, e. Yaprak ucu, f. Yaprak)..... 33
Şekil 3.2 *Weissia controversa* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Yaprak taban hücresi, c. Yaprak ucu, d. Yaprak, e. Yaprak orta hücresi ve yaprak kenarı, f. Spor) 33
Şekil 3.3 *Weissia longifolia* türünün mikroskobik görünümü (a. Bitki, b. Yaprak taban hücresi, c. Yaprak orta hücresi, d. Yaprak, e. Spor, f. Yaprak ucu) 34
Şekil 3.4 *Weissia controversa* var. *crispata* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Spor, c. Yaprak orta hücresi, d. Yaprak, e. Yaprak ucu) 34
Şekil 3.5 *Weissia condensa* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Yaprak, c. Yaprak taban hücresi, d. Spor, e. Yaprak ucu) 35
Şekil 3.6 *Weissia rutilans* türünün mikroskobik görünümü (a. Bitki, b. Yaprak ucu, c. Yaprak taban hücresi, d. Yaprak) 35
Şekil 3.7 *Weissia wilsonii* mikroskobik görünüşü (a. Bitki, b. Kapsül, c. Spor, d,e. Yaprak, f. Yaprak enine kesit, g. Yaprak kenar hücre, h. Kapsül kapağı, i, Kapsül hücresi) 36
Şekil 4.1 *rps4* geni gel extraction görünümü (M: 1kb gen marker, 1,2,3,4,5 PZR ürünü; sıra ile *Weissia rutilans, W. condensa, W. wilsonii, W. brachycarpa ve W. controversa* var. *crispata* örnekleri..... 43
Şekil 4.2 *rps4* geni *Weissia brachycarpa* türü DNA dizisi 44
Şekil 4.3 *rps4* geni *Weissia brachycarpa* türü nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları 44
Şekil 4.4 *rps4* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü DNA dizisi 45
Şekil 4.5 *rps4* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları 45
Şekil 4.6 *rps4* geninde *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri arasındaki filogenetik ilişki 46

Şekil 4.7 *psbA* geni gel extraction görünümü (M: 1kb gen marker, 1,2,3 PZR ürünü; sıra ile *Weissia rutilans, W. brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri 47
Şekil 4.8 *psbA* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü DNA dizisi 47
Şekil 4.9 *psbA* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları 48
Şekil 4.10 *psbA* geni *Weissia brachycarpa* türü DNA dizisi 49
Şekil 4.11 *psbA* geni *Weissia brachycarpa* türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları 50
Şekil 4.12 *psbA* geninde *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri arasındaki filogenetik ilişki 51
Şekil 4.13 *atpB-rbcL* geni gel extraction görünümü (M: 1kb gen marker, 1,2,3 PZR ürünü; sıra ile *Weissia condensa, W. brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri) 52
Şekil 4.14 *atpB-rbcL* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü DNA dizisi 53
Şekil 4.15 *atpB-rbcL* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları 53
Şekil 4. 16 *atpB-rbcL* geni *Weissia brachycarpa* türü DNA dizisi 54
Şekil 4.17 atpB-rbcL geni Weissia brachycarpa türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları 54
Şekil 4.18 *atpb-rbcL* geninde *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri arasındaki filogenetik ilişki 55
Şekil 4.19 GeneRuler 1 kb bp DNA marker (Thermo) 69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 *Weissia* taksonlarının morfolojik olarak karşılaştırılması……38
Çizelge 3.2 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri……39
Çizelge 3.3 Örnek bir PZR primer tablosu……..41

1.GİRİŞ

Canlıların belirli bir grup altında incelenip tanımlanması, bilim insanlarınca sık sık karşılaşılan ve çözülmesi gereken bir gereksinim olarak değerlendirilmiştir. Özellikle canlı sistematiği konularında önde gelen birçok isim, uzun yıllar klasik morfolojik ayırımı dikkate alarak çeşitli eserler ortaya koymuşlardır. Alternatif nitelik gösteren ve bir parça daha güvenilir bilgi sunma imkânı sağlayan moleküler sistemlerin keşfedilip geliştirilmesine, aktif biçimde uygulama alanlarına kazandırılmasına kadar morfolojik markörler kullanılarak yapılan sınıflandırmalar bilim camiasının bu konudaki çıktılarını oluşturmaktadır. Ancak doğanın sahip olduğu çeşitlilik ve canlıların taşıdığı pek çok özellik, doğru morfolojik ayırımın yapılması konusunda araştırmacıları çeşitli zorluklarla karşı karşıya bırakmıştır. Karşılaşılan bu sorunların en aza indirilmesi hedeflenerek uzun yıllar birçok araştırma yapılmış ve çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu bağlamda moleküler markör teknikleri teknolojinin gelişmesi ve yapılan araştırmalarda artan ihtiyaçlar doğrultusunda önemli ölçüde ilerleme kaydetmişlerdir.

Moleküler sistemlerin bilimsel çalışmalara sağladığı faydalar yalnızca sistematik altyapılı araştırmalarla sınırlı değildir. Bu sistemler özellikle bitki ıslah uygulamaları başta olmak üzere morfolojik markörlerin yarattığı birtakım eksiklikleri bertaraf ederek günümüzde geniş kullanım alanına sahiptirler. Aynı zamanda moleküler markör teknikleri sahip olduğu avantajlar sayesinde giderek önem kazanan filogenetik uygulamalar ve canlı popülasyon ilişkilerinin incelenmesi konularına yüksek oranda katkı sağlamaktadırlar. Özdemir ve Doğru (2007)'ya göre çeşitli moleküler genetik teknikler kullanılarak popülasyonlardaki genetik varyasyonlar DNA düzeyinde ortaya konabilmektedir. Geliştirilen tekniklerin yapılacak bilimsel araştırmaların amaçlarına göre uygulanacak kombinasyon imkanları ile etkin çalışmalar ve daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Yine klasik morfolojik ayırım ve moleküler markör tekniklerinin bir arada kullanılması, birbirlerinin eksikliklerini giderecek bir uygulama yaklaşımının benimsenmesi araştırmacılara verimli çıktılar elde etme imkânı sağlayacaktır. Bahsedilen bu nitelikler ve moleküler markör tekniklerinin önemi doğrultusunda literatür taraması yapılmış ve kullanım alanlarına ilişkin çeşitli örnekler incelenmiştir. Ülkemizde briyofitlerle ilgili moleküler sistematik kökenli herhangi bir araştırmanın

yapılmamış olması, özellikle morfolojik ayrımının zor olduğu briyofit taksonları üzerinde, bu taksonların birbirinden ayırmasında moleküler bir çalışma yapma gereğini doğurmuştur. Bu bağlamda; sahip olduğu morfolojik özellikleri nedeniyle teşhis etmekte zorluklar yaşandığı için Türkiye'den kaydı verilen 14 *Weissia* taksonu ile çalışılması planlanmıştır. Bu türler; *Weissia brachycarpa* (Nees & Hornsch) Jur. (Syn: *W. microstoma* Hornsch. ex Nees & Hornsch.), *W. breutelii* Müll. Hal., *W. squarrosa* (Nees & Hornsch) Müll. Hal., *W. controversa* Hedw., *W. controversa* var. *crispata* (Nees & Hornsch) Nyholm (Syn: *W. fallax* Sehlm.), *W. condensa* (Voit) Lindb., *W. condensa* var. *armata* (Thér. & Trab.) M.J. Cano, Ros & J. Guerra, *W. crispata* (Dicks.) Brid. ex Schumach, *W. leptocarpa* Schimp. ex Besch., *W. longifolia* Mitt., *W. rupestris* Hedw. C. Müll., *W. rutilans* (Hedw.) Lindb., *W. wimmeriana* var. *muralis* (Spruce) Breidl., *W. wilsonii* D.A. Callaghan (Syn *:W. multicapsularis* (Sm.) Mitt.) şeklindedir. Türkiye'de yayılışa sahip bahsedilen bu türlerden *Weissia brachycarpa*, *W. controversa*, *W. controversa* var. *crispata*, *W. condensa*, *W. longifolia*, *W. rutilans*, *W. squarrosa*, *W. wilsonii* olmak üzere yalnızca 8 türe ulaşılmıştır.

Weissia sp. türlerinin çalışma konusu seçilmesinde göz önünde bulundurulan bir diğer neden; Bir zamanlar İngiltere'nin endemik türü olan *Weissia wilsonii* türü Ursavaş ve Keçeli (2019) tarafından Türkiye ve Asya'dan ilk defa kaydedilmesi sonucu bu türün moleküler olarak sistemetiğinin yapılmak istenmesidir. Bu bağlamda moleküler olarak çalışılmak istenen diğer *Weissia* taksonlarının Türkiye'den ilk kayıt bilgileri aşağıdaki gibidir;

Weissia brachycarpa: Henderson and Prentice (1969)
W. breutelii: Kırmacı and Erdağ (2009)
W. squarrosa: Batan and Özdemir (2013)
W. controversa: Robinson and Godfrey (1960)
W. controversa var. *crispata*: Çetin ve Yurdakulol (1988)
W. condensa: Robinson and Godfrey (1960)
W. condensa var. *armata*: Canlı and Çetin (2014)
W. crispata: Robinson and Godfrey (1960)
W. leptocarpa: Henderson and Prentice (1969)

W. longifolia: Henderson and Muirhead (1955)

W. rupestris: Henderson (1961)

W. rutilans: Tonguç Yayıntaş (2001)

W. wimmeriana var. *muralis*: Henderson ve Prentice (1969)

W. wilsonii: Ursavaş and Keçeli (2019)

Bu doğrultuda briyofitlerin özelliklerinden başlayarak canlıların klasik sınıflandırılmasından bahsedilecek ve devam eden süreçte moleküler markörlerin gerekliliğine değinilecektir. Moleküler markör tekniklerinin bilimsel çalışmalar için önemini vurgulamak ve *Weissia* sp. türleri ile yapılan analizlerde elde edilen DNA dizilerinin filogenetik ilişkilerinin yorumlanması ile briyofitlerde moleküler sistematik kökenli bir kaynak oluşturulması ve bu konuyu geniş ölçekte ele almak amaçlanmıştır.

1.1 Briyofitler ve Yaşam Döngüsü

Briyofitler, doğanın ilk ve gerçek bitki yapıları olarak kabul edilmektedir. Tallussu ve yapraklı ciğerotları (Hepaticae), (Şekil 1.1), boynuzotları (Anthocerotae), (Şekil 1.2) ve karayosunlarını (Musci), (Şekil 1.3)'da içerisine alan geniş bir bitki grubu için kullanılmaktadır (Glime 2017).



Şekil 1.1 Bir talluslu ciğerotu (*Riccia nigrella* DC.)



Şekil 1.2 Bir boynuzotu (*Phaeoceros laevis* (L.) Prosk.)

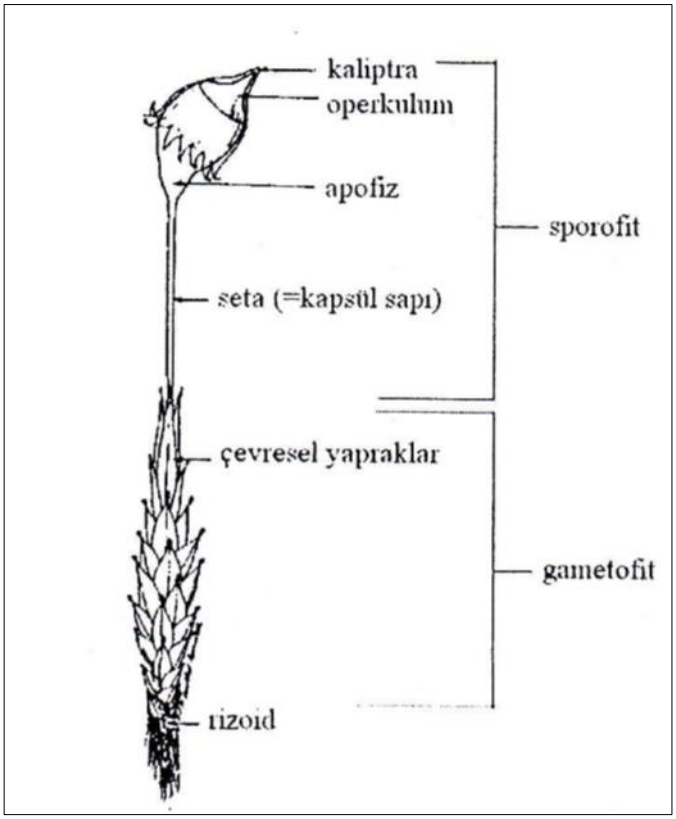


Şekil 1.3 Bir karayosunu (*Weissia brachycarpa*)

Bu grup, tohumlu bitkilerin aksine gametofitler üzerinde gelişim gösteren sporofitler ile yayılış göstermektedir (Şekil 1.4). Gametofit ve sporofit yapıları üretilen kromozomlar ile birbirinden ayrılmaktadır. Yaşamlarını sürdürebilmek için en büyük ihtiyaçları su olan briyofitler, aynı zamanda döllenme ve günlük döngülerinin devamı için yine suya ihtiyaç duymaktadırlar (Glime 2017).

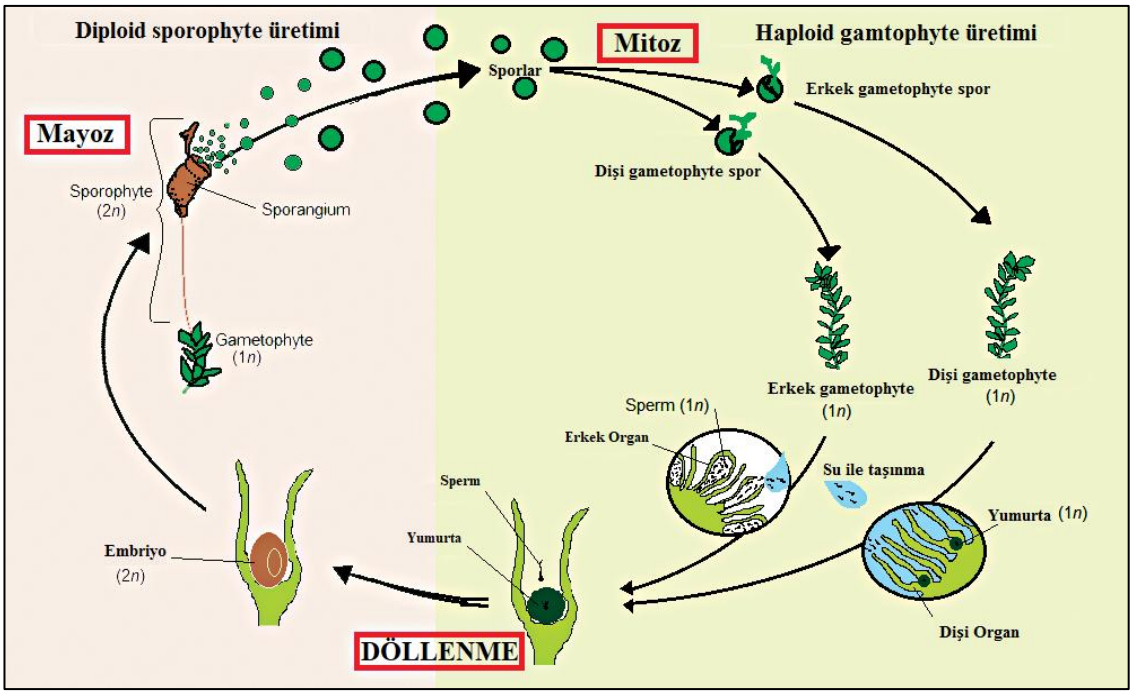
Damarlı bitkilerde bulunan gelişmiş bir su iletim sistemi onlara pek çok koşulda sürekli bir su kaynağı elde etme şansı yaratmaktadır. Ancak briyofitlerde bu durum biraz daha farklı evrimleşmiştir. Gametofitler, vasküler bitkilerdeki gibi organize bir sisteme sahip değildir. Bu nedenle briyofitler su bulunmadığı zamanlarda metabolizmalarını durdururlar (dormansiye geçerler) ve harici bir su kaynağı ile kontrol edilene dek yaşamlarını sürdürebilmek için yapraklarındaki kılcal boşluklarda, parafillerde ya da rizoidal boşluklarda bir miktar su muhafaza ederler (Glime 2017). Karayosunları, üremelerinin suya bağımlı olması fakat gelişmelerini farklı ortamlarda sürdürebilmelerinden dolayı bitkiler dünyasının amfibileri olarak adlandırılabilirler (Schofield 2001).

Karayosunları ne gerçek bir gövde, yaprak, kök ne de gerçek bir damar sistemine sahip bitkilerdir. Bu gurup bitkiler yüksek nem, bol yağış ve gölgeli alanları severler fakat kurak ve yağış almayan ortamlara uyum sağlamış türlerde mevcuttur. Karayosunları dik bir gövde sistemine ve bu gövdeye spiral bir şeklinde bağlanmış yaprak şeklinde yapılara sahiptirler. Kendi içlerinde iki gruba ayrılırlar birinci grup "Pleurocarpous" karayosunları (halı gibi, dallanmış) denilen dallanmış bir gövde yapısına sahip ve yan dallarından sporofit adı verilen üreme organlarını oluşturan gruptur. İkincisi ise "Acrocarpous" (dik, dallanmayan) karayosunlarıdır. Bu gruptaki karayosunları ise tek bir gövdeye sahip, dallanma yapmayan ve sporofit yapıları bu gövdenin uç kısmından çıkan karayosunlarıdır. Pleurocarpous karayosunları gölgeli ve nemli yerleri daha çok tercih ederken, acrocarpous karayosunları kuraklığa daha dayanıklı türlerden oluşmaktadır. Bu küçük yapılı bitkiler kendi mikro iklimini oluşturarak topraktaki nemi korumakta, yamaç ve engebeli arazilerde toprak erozyonunu önlemekte ve ormanlık alanlarda ise tohum yastığı olarak ekolojik bir görev yapmaktadırlar (Ursavaş vd. 2013).



Şekil 1.4 Akrokarp karayosunu yapısı (Schofield 2001)

Karayosunlarında genel olarak eşeyli bir üreme çeşidi olan "Oogami" şekli görülmektedir. Bu üreme biçiminde dişi gamet hareketsiz olup oldukça büyük bir formdadır. Yumurta hücresi olarak nitelendirilen bu yapı dişi gametangiyumda gelişmektedir ve "arkegoniyum" ya da "Oogoniyum" olarak adlandırılır. Plazmasında bol miktarda yedek besin maddesi bulundurur (Simpson 2012, Yıldız ve Aktoklu 2012). Bu bağlamda yaşam döngüleri incelendiğinde briyofitlerde gametofit ve sporofit kökenli döller arasında düzenli ve birbirini takip eden bir değişim görülmektedir. Döl almaşı olarak nitelendirilen bu üreme biçiminde n kromozomlu haploit yapıdaki gametofiti, diploit (2n) yapıdaki sporofit takip etmektedir (Şekil 1.5). Erkek ve dişi gametler, gametofit üzerinde bulunan gametangiumlarda üretilmektedir (Richardson 1981).



Şekil 1.5 Karayosunu yaşam döngüsü (https://www.iucnredlist.org, 2020)

Döllenme gerçekleşebilmesi için erkek gametlerin suya ihtiyacı vardır. Yağmur suları ya da üzerlerinden akan su içinde hareket edebilen kamçılı erkek gamet, hareketsiz haldeki dişi gameti dölleyebilir. Arkegoniyumda gerçekleşen döllenme sonucunda ise zigot gelişecek ve sporofit yapısını oluşturacaktır (Richardson 1981).

Karayosunları gamet üretemediklerinde genellikle farklı vejetatif üreme yöntemlerine başvurmaktadırlar. Bu yöntemler arasında en çok karşılaşılan; gemmae (gemma) denilen ve bir ya da birkaç hücreden oluşan üretken yapılardır. Bu yapılar genelde talluslu briyofitlerde özelleşmiş gemma çanaklarından üretilirken yapraklı karayosunlarında gametofitin herhangi bir yerinden üretilebilirler. Bunlar gametofitten düştükten sonra bazen yeni bir protonema üretebilir ve bazen de direkt olarak yeni gametofit bitkiyi oluşturabilmektedirler (Schofield 2001).

Briyofitlerin orman ekosistemi içerisindeki ekolojik görevlerinin yanı sıra, ekonomik olarak da değerlendirilmesi düşünülmelidir. Nüfus artışı ve endüstriyel gelişimden dolayı doğal kaynaklara duyulan ihtiyaç gün geçtikçe artmakta ve bu durum, odun dışı orman ürünlerine olan ilgiyi artırmaktadır. Briyofitler yiyecek temini, sağlık ve iş

imkânı gibi farklı olanaklar sağlayan odun dışı orman ürünleri ülke ekonomisinde, özellikle de kırsal kesimlerde orman köylüsüne önemli katkılar sağlamaktadır. Günümüzde ise briyofitler: bahçecilikte, yapı endüstrisinde, çeşitli evsel alanlarda, hava kirliliğinin tayininde, erozyon kontrol amaçlı olarak, ticari ürünlerin yapımında, tıpta, eczacılıkta ve gıda sektöründe kullanılmaktadır (Abay 2006, Ursavaş vd. 2013).

1.2 Canlıların Sınıflandırılması ve Tarihsel Gelişimi

Dünya üzerinde yaşayan canlıların sahip oldukları çeşitli özellikleri inceleyip benzerliklerini ya da farklı yönlerini ortaya koyarak bu canlıları gruplara ayırmak, sınıflandırmanın amacını oluşturmaktadır. Bitkiler de geçmişten beri sınıflandırılmaya, belirli bir sistematiğinin oluşturulmaya çalışılmasıyla pek çok araştırmaya konu edilmiştir. Bu bağlamda eski dönemlerde insanlar bitkileri ilk olarak yararı olanlar ve zararı olanlar diye kabaca gözlem ve deneyimlerine göre ayırmışlardır. Zaman ilerledikçe bitkileri tanıma gerekliliği artmış ve buna bağlı olarak bitkilerin bilimsel bir çerçevede sınıflandırılması ihtiyacı ortaya çıkmıştır (Efe 1994).

1.3 Sistematik

Sınıflandırmanın ilk dönemleri diyebileceğimiz M.Ö. 300'lü yıllarda, bitkilerin çeşitli özellikleri dikkate alınarak bir bitki sınıflandırılması yapılmıştır. Canlının hayat formuna göre yapılan bu sınıflandırma bitkileri ağaçlar ve otsu bitkiler diye ikiye ayırmaktadır. Daha sonra botaniğin babası olarak bilinen Theophrastus tarafından bitkiler; ağaç, ağaçsı, çalı ve otsu diye ayrılmıştır. Theophrastus bu ayrımın yanı sıra tek, iki ve çok yıllık bitkiler şeklinde bir gruplandırma daha yapmış ve aynı zamanda ovaryumun durumuna bağlı incelemelerde bulunup korollanın gamopetal ya da polipetal oluşuna göre de ayrımlar yapmıştır (Tanker vd. 2007).

Romalılar Döneminde Cato ve Virgil zirai alanda, M.S. I. yüzyılda yaşamış Galenius ve Dioscorides tıp alanında pek çok değerli eser meydana getirmişlerdir. Dioscorides tarafından yazılmış 'Materia Medica (Tıbbi Maddeler)' olarak adlandırılan beş ciltlik eserde, daha çok eczacılık yönünden ele alınmış yaklaşık 600 bitki hakkında değerli

bilgiler bulunmaktadır. Dioscorides verdiği bu eserde bitki sınıflandırılmasından çok bitkilerin morfolojik görünümü, kullanılan bitki kısımları ve bu kısımlardan elde edilen maddelerden bahsetmektedir. Devam eden süreçte (M.S. 23 ve 79 yılları arasında) Pliny ya da Plinius olarak bilinen bir Romalı doğa bilgini, bu çalışmalara çeşitli katkılar sağlamıştır. Yararlı bitkiler hakkında dokuz kitabı bulunan Plinius, M.S. 77 yılında yazdığı 'Historia Naturalis (Tabiat Tarihi)' adlı kitabında yaklaşık 1.000 bitkiyi incelemiş ve bu kez bitki kültürü hakkında bilgiler verilmiştir. 13. yüzyıla gelindiğinde ise bitkilerle ilgili araştırmalar yapan İslam bilgini İbnül Baytar dikkat çekmektedir (Çolakoğlu 1999). İbn-i Baytar olarak da bilinen Ortaçağ Dönemi'nin ünlü bilgini başta kendi ülkesi Mısır olmak üzere Makedonya, Anadolu ve Kuzey Afrika'yı gezerek tıbbi bitkiler hakkında bilgiler toplamıştır. Yazdığı Tercüme-i Müfredat-ı İbn-i Baytar adlı eserinde bitkilerin tüm özelliklerini tanıtarak bilimsel ve yöresel isimleri hakkında Latince, Arapça, Yunanca ve Farsça bilgi vermektedir (Bayat 2010). Yine devam eden Ortaçağ Döneminin 1193 ve 1280 yılları arasında Alman bilgin Albertus Magnus, bitkileri sahip oldukları gövde yapılarına göre inceleyerek ilk kez monokotil ve dikotil ayırımını ortaya koymuştur. Daha sonra 'Herbalistler Dönemi' olarak adlandırılan 1470-1670 yılları arasındaki dönemde İngiliz, Belçika, Alman, Hollanda, İtalyan ve Fransız pek çok botanikçi önemli araştırmaları sonucu büyük değer taşıyan eserler ortaya koymuşlardır. Döneme yaptığı çalışmalarla katkı sağlayan botanikçiler aşağıdaki gibidir;

Belçikalı, Otto Brunfels (1489-1534)
Fransız, Jerome Bock (1498-1554)
Alman, Leonhart Fuchs (1501-1566)
Hollandalı, Carolus Clusius (1526-1609)

1538-1616 yılları arasında Lobelius ve 1545-1612 yılları arasında ise İngiliz John Gerard önemli çalışmalarıyla pek çok katkı sağlamışlardır. Yine bu dönemde Almanya'nın dağ ve orman bitkileri üzerine incelemelerde bulunan Valerius Cordus dikkat çekmektedir (Çolakoğlu 1999).

1519-1603 yıllarında yaptığı çalışmalarla ilk bitki taksonomisti olarak kabul edilen İtalyan botanikçi Andrea Caesalpino, ilk olarak ağaç ve otlar diye ayırdığı bitkileri tohum ve meyve şekillerine göre de inceleyerek bir gruplandırma yapmıştır (Tanker vd. 2007). Aynı zamanda ilk kez morfolojik sınıflandırma yapan bilgin olarak kabul edilmektedir. Andrea, morfolojik ayırıma dayanarak tohum ve meyvelerin öneminden bahsetmiş, bitki organlarının özelliklerini inceleyerek on beş sınıfa ayırdığı bir gruplandırma yapmıştır (Çolakoğlu 1999). İlerleyen dönemde Theophrastus gibi bitkilerin ovaryum durumlarıyla da ilgilenmiştir. Andrea Caesalpino, farklı bir bakış açısı ile bitkilerin süt bulundurup bulundurmamaları ve soğanlı olup olmamaları gibi özellikleri de göz önünde bulundurmuştur (Tanker vd. 2007).

İsviçreli Gaspard Bauhin, ilk kez iki isimli nomenklatür sistemini kullandığı çalışmaları ile 1560-1624 yılları arasındaki dönemde dikkat çeken botanik bilginlerindendir. Gaspard, bitki sistematiği için büyük önem taşıyan bu sistemi botaniğe kazandırarak çiçek özelliklerini dikkate almadan sadece tür özelliklerini incelediği 6.000 kadar bitkiyi sınıflandırmıştır. Devam eden süreçte İngiliz botanikçi John Ray ile Herbalistler Dönemi kapanarak Modern Botanik Devri'ne bir giriş yapılmıştır (1628-1705). Ray yazdığı 'Historia Plantarum' adlı kitapta, monokotil ya da dikotil embriyonun belirlenip bir ayırım oluşturulmasının sistematik için öneminden bahsetmiştir. Bu açıklamasının yanı sıra, bitkilerde bulunan varyasyon nedenlerinin fenotip ve genotip ile ilişkili olduğunu vurgulamaktadır. Modern Botanik Devri'nde dikkat çeken Alman Rudolph Camerarius da 1665 ve 1721 yılları arasında bitkilerde cinsiyetin varlığı konusunda yaptığı araştırmalarla adından söz ettirmiştir (Çolakoğlu 1999).

Daha sonra Fransız Joseph Pitton de Tourneford (1656-1708) ot, yarı ağaççık, ağaççık ve ağaç diye yaptığı temel sınıflandırmanın yanı sıra, ayırdığı bitki gruplarının her birini çiçeklerine göre de incelemiştir ve çiçekleri simetrik (aktinomorf) ya da asimetrik, petal taşıyan ya da taşımayan şeklinde bir değerlendirme yapmıştır (Tanker vd. 2007). Andrea'nın yaptığı on beş sınıftan oluşmuş bitki gruplandırmasına ek olarak Tourneford, yirmi iki sınıftan oluşan bir ayırım ortaya koymuştur. 1-15 arası sınıf otsular, 16. sınıf çiçeksiz ve 17. sınıf meyvesiz bitkiler, 18-22 arası ise ağaççık ve ağaçlardan oluşan sınıfı temsil etmektedir. Aynı zamanda dönemindeki diğer

botanikçilerin aksine daha çok cins bazında incelemeler yapmak için çabalamıştır (Çolakoğlu 1999).

İsveçli botanikçi Carolus Linnaeus (Linne), Gaspard Bauhin'in bulduğu ikili isimlendirme sistemini (binomial ya da binel isimlendirme) benimseyerek bir parça daha geliştirmiş, tüm bilim dünyası için kalıcı hale getirmiş ve yaygın kullanımın önünü açmıştır. Bu sistemde bitkiler, Latince iki sözcükten oluşan bir kombinasyon ile isimlendirilmektedir. Hem zooloji hem botanik alanlarında çeşitli araştırmalar yapmış ünlü bilgin, 1737 yılında yazdığı Genera Plantarum ve 1753 yılında yazdığı Species Plantarum adlı kitaplarında binomial isimlendirmenin en güzel örneklerini vermiştir (Çolakoğlu 1999). Bu isimlendirme yaklaşımına göre bitki için kullanılan ilk isim cins (genus), ikinci isim ise tür (species) ismi olarak nitelendirilmektedir. Cins isimleri özel isim olup tekildir ve büyük harfle yazılmaktadır. Bu isimleri farklı kelime köklerine dayandırmak mümkündür. Örneğin; tanınmış bir şahıs ismi *Cinchona* ya da bitkinin yaygın kullanılan eski adı *Rosa* gibi adlandırmalar yapmak mümkündür. İkinci kelime olan tür epitetleri ise her zaman küçük harfle başlatılır. Türü tanımlayan ve tür için önem taşıyan bir sıfat ya da isim kullanılmaktadır. Bir sıfat kullanıldıysa cins isminin özelliklerinden de esinlenilebilir ve Latin kelimelerin çekim kurallarına uygun olarak adlandırılır. Bilimsel anlamda Latince cins ve tür isimleri italik yazılmaktadır. Bir cinse ait altcinsler ya da bir türe ait alttürler bazı bitkiler için bulunabilmektedir (Tanker vd. 2007).

Aynı zamanda Çolakoğlu (1999); Linne, Species Plantarum adlı eserinde yaklaşık 1.000 cinse ait 6.000 türü incelemiş ve bitki çiçeklerinde bulunan erkek organ sayılarına göre 24 sınıfa, dişi organ sayılarına göre ise 67 takıma ayırmıştır. Bu bağlamda diğer botanikçilerden farklı olarak Linne, pistil ve stamen sayılarını temel alan botanik bilgini olarak dönemin dikkat çekenleri arasında yer almıştır. Linne'den sonra doğal sınıflandırma olarak da nitelendirilen filogenik ve ontogenik ayırım yaklaşımları geliştirilmiştir. Bu sürecin kaynağını Darwin, Lamarck ve Hugo de Vries'in öne sürdükleri evrim teorileri oluşturmaktadır. Teorilerin anlaşılması ve geliştirilmesi, bitki popülasyonlarının akrabalık ilişkileri üzerine araştırmaların yapılmasını kolaylaştırmıştır. Özellikle Bernard de Jessieu (1699-1777) ve Antoine Laurent de

Jussieu (1748-1836) bu yaklaşımın önde gelen isimlerindendir. Devam eden süreçte yaşadıkları döneme katkıda bulunmuş ve bitki sistematiği çalışmalarına yenilikler getirmiş ünlü botanik bilginleri şöyledir;

- İletim doku sistemlerine göre bir sınıflandırma yapan İsviçreli Augustin Pyrame de Candolle (1778-1841),
- Bitkileri kök, gövde ve yaprak durumlarına göre iki grupta inceleyen Avusturyalı botanikçi Stephen Endlicher (1805-1849),
- Eğreltiotlarının yanı sıra Atkuyrukları ve Kibritotları'na da değinen Alman botanik bilgini Alexander Braun (1805-1877),
- 100.000 kadar bitkiyi incelemiş ve yalnızca tohumlu bitkilerin sınıflandırılması konusunu ele almış İngiliz botanikçiler George Bentham (1800-1884) ve Joseph Dalton (1817-1911),
- Hem tohumsuz hem tohumlu bitkileri inceleyerek sporlu çiçeksiz ve tohumlu çiçekli bitkiler şeklinde sınıflandırma yapan Alman botanikçi August Wilhelm Eichler (1839-1887),
- Tohumlu bitkilerin yanı sıra tohumsuz bitkilerden yosunları ayrıntılı bir şekilde incelemiş ve sınıflandırmış Alman botanikçiler Adolf Engler (1844-1930) ve Karl Prantl (1849-1893),
- Filogenetik açıdan bitkileri 9 kola ayıran Avusturyalı Richard Von Wettstein (1862-1931),
- Bitkileri Gymnospermae, Angiospermae ve günümüzde yaşayan örneği olmayan Tohumlu Eğreltiler olarak sınıflara ayıran Amerikalı Charles Edwin Bessey (1845-1915) ve İngiliz botanikçi John Hutchinson Angiospermae bitkileri incelemiş ve otsu-odunsu şeklinde iki sınıfta toplamıştır. Bu ayırım, günümüzde de baz alınmaktadır.

Yapılan tüm bu sınıflandırma çalışmaları doğrultusunda günümüzde temel anlamda kabul gören bitki sistematiği aşağıdaki gibi örneklendirilmektedir (Çolakoğlu 1999);

Alem: Plantae (Bitkiler Alemi)

Altalem: Embryophyta (Embriyolu Bitkiler)

Şube: Tracheophyta (İletim Borululer)

Altşube: Pteropsida (Yapraklılar)

Sınıf: Angiospermae (Kapalı Tohumlular)

Altsınıf: Monocotyledoneae (Tek çenekliler)

Takım: Graminales (Buğdaylar)

Familya: Gramineae (Buğdaygiller)

Altfamilya: Festucoideae (Yumak otları)

Cins: *Triticum* (Buğday)

Tür: *Triticum aestivum*

Alttür: -*vulgare*

Varyete: -*erythroleucon*

2. MOLEKÜLER SİSTEMATİK

Genetik ve biyoçeşitlilik arasındaki ilişkileri belirlemek için genelde arkeoloji başta olmak üzere botanik, tarih ve linguistik (dil) gibi bilgi kaynaklarından yararlanılmaktadır. Özellikle arkeoloji ve botanik bilgi kaynakları bu konuda büyük önem kazanmaktadırlar (Harlan and De Wet 1973). Ancak bu bilgileri değerlendirme aşamalarında çeşitli sorunlarla karşılaşılmaktadır. Yeryüzünde bulunan ve bilimsel açıdan önemli nitelikteki eski tarım merkezleri, sıcaklık ve nemin yüksek olduğu bölgelerde yer almaktadır. Bu yüksek sıcaklık ve nem, organik çürümeye neden olarak özellikle arkeolojik çalışmalar sonucu elde edilen bilgilerin doğruluğu hakkında bilim insanlarında şüphe oluşturmaktadırlar. Bu bağlamda moleküler teknikler yapılacak çalışmaları büyük ölçüde aydınlatmakta ve aynı zamanda botaniksel kanıtlar olarak kabul edilmektedirler. Moleküler tekniklerin kaynağını, kendilerinin üretildiği bitki hücrelerinde bulunan DNA oluşturmaktadır. Kloroplast (cpDNA), mitokondri (mtDNA) ve çekirdek (nükleer DNA, nDNA) kendine özgü DNA'ya sahip oldukları için çalışmalarda kullanılmaktadır. Hangi hücre DNA'sının kullanılacağı, yapılacak çalışma amaçlarına göre şekillenmektedir. DNA zincirlerinde canlıların genetik niteliği ve yapısı hakkında bilgileri taşıyan pek çok şifre bulunduğu için moleküler markörler oldukça büyük önem taşımaktadır. Özellikle bitki popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik ya da o popülasyon içinde bulunan bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin belirlenip değerlendirilmesinde, güvenilirliği %100'e yakın bilgi edinme imkânı sunmaktadır ve günümüzde pek çok alanda bu yöntemler kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu 2005).

2.1 Dünya'da ve Ülkemizde Moleküler Sistematiğin Durumu

Moleküler anlamda yapılan çalışmalar mikroskobun keşfi ile farklı açılardan ilerlemeler kaydetmiştir. Gözle görülemeyen ya da ayırt edilemeyen canlılar bilim insanlarının hep merak konusu olmuştur. Bu nedenle yaptıkları çalışmalarda tamamlayıcı unsurlar ve daha verimli sonuçların ortaya etkin bir biçimde konulabilmesi adına için mikroskobun geliştirilmesi moleküler araştırmalara büyük yarar sağlamıştır. 1600'lerde gerçekleştirilen bu buluş 1800'lerde DNA tanımlamasının yapılabilmesi için önemli bir adım olmuştur (http://www.mikrobiyoloji.org, 2020).

İsviçreli Doktor Friedrich Miescher, 1860'lı yılların sonunda hücrelerin işlevlerini ve kimyasal yapılarını anlayabilmek için çeşitli araştırmalar yapmıştır. Yapacağı çalışmalarda beyaz kan hücrelerini kullanmak isteyen Friedrich Miescher, kullanılmış sargı bezlerinde bulunan iltihaplı sıvılardan beyaz kan hücrelerini ayırmış ve ilk etapta proteinleri incelemiştir. Çalışmaları devam ederken yaptığı deneylerde bulduğu bir maddenin protein özelliği göstermediğini fark etmiş ve hücre çekirdeği içinde bulunan bu maddeye çekirdek özü anlamına gelen "nüklein" adını vermiştir. Bu maddenin asit özelliği taşıdığının keşfedilmesi ile ismi "nükleik asit" olmuş ve daha sonra günümüzde kullanılan ve bilinen hali ile "deoksiribonükleik asit" (DNA) olarak isimlendirilmiştir. Devam eden araştırmalar neticesinde DNA'nın şeker, fosfat ve baz (adenin, guanin, sitozin ve timin) gruplarının bir araya gelmesiyle oluştuğu anlaşılmıştır. Ayrıca, Erwin Chargaff, adenin bazları ile timin bazlarının, sitozin bazları ile de guanin bazlarının eşit sayıda olduğunu göstermiştir. 25 Nisan 1953 yılında ise James Watson ve Francis Crick tarafından DNA'nın birbirlerine sarmal şekilde bağlı iki zincirden meydana geldiği ortaya konmuştur. Daha sonra 1980'lerde PCR keşfi (Yorgancılar vd. 2015) ile moleküler çalışmalar hızla artarken DNA'nın çift sarmal yapısı açıklandıktan sonra DNA'nın kimyasal yapısını oluşturan baz sıralarını belirleme araştırmaları başlamış ve 1990'lı yıllarda gen projeleri, klonlama gibi konular önem kazanmıştır. 1990 yılında başlatılan bir proje ile insan genomundaki yaklaşık üç milyar baz sıralanmıştır ve bu insan genomu DNA dizileme çalışmaları 2003 yılı Nisan ayında tamamlanmıştır (Kandemir, 2019).

Son yirmi yıldır gelişen teknoloji ile birlikte pek çok alanda olduğu gibi moleküler çalışmalarda da ilerleme kaydedilmiştir. Yapay kromozomlu ilk canlının oluşturulması, genetik kökenli hastalıkların önceden belirlenip tedavi edilebilmesi gibi gelişmeler bu ilerlemeler arasında sayılabilir (https://www.sciencenews.org, 2020).

Moleküler çalışmalara bakıldığında ise briyofitlerle ilgili Türkiye'de tamamlanmış bir araştırma olmamakla birlikte dünya literatüründe yapılmış çalışmalara rastlamak mümkündür. Bu bağlamda Troitsky *et al.* (1984); *Mnium rugicum* Laurer türü, kolroplast 4.5S rRNA ile yaptıkları çalışmada karayosunları için bu moleküler belirtecin yetersiz kaldığını, gelişmiş bitki türlerinde daha etkin sonuç elde edebildiklerini

açıklamışlardır. Zander, 1989 ve 1993 yıllarında *Syntrichia-Tortula* benzer cinsler algısı üzerine yaptığı çalışmalarda *Crossidium, Pterygoneurum, Stegonia, Desmatodon* ve bazı *Pottia* türleri ile *Tortula muralis* Hedw. türünün daha yüksek oranda benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir. Benzer bir araştırma da 2002 yılında Werner *et al.* tarafından rps4 geni ile yaptığı bir çalışmada *Desmatodon-Pottia-Syntrichia-Tortula* cinslerini incelemiştir. Spor karakterlerinin, peristom yapıları ve taban hücre formlarının morfolojik yönden analiz edildiği bu çalışmada *Totula'*ların *Pottia'*lar ile daha benzer yapıda olduğunu savunmuşlardır. Sato *et al.* (2004); Japonya için endemik tür olan ve Pottiaceae familyasına ait *Uleobryum naganoi* Kugichi *et al.* türünün *rbcL* geni kullanılarak yapılan değerlendirmeler sonucu oluşturulmuş filogenetik analizde *Ephemerum* sp. (Funariaceae) taksonları ile uyumluluk göstermesi üzerine *Uleobryum naganoi* Kugichi *et al.* türünün, Funariaceae familyası adı altında kaydedilmesi gerektiği öne sürülmüştür.

Başka bir çalışmada ise Werner *et al.* (2004a), bazı Pottiaceae familyası türleri ile *rps4* geninde değerlendirmeler yapılmıştır. *Ephemerum spinulosum* Bruch & Schimp., *Splachnobryum obtusum* (Brid.) Müll. Hal., *Goniomitrium acuminatum* Hook. & Wilson and *Cinclidotus fontinaloides* (Hedw.) P. Beauv. türlerinin Pottiaceae familyasına ait türler olduğunu kanıtlarken *Hypodontium dregei* (Hornsch.) Müll. Hal. türünün ise Pottiaceae familyasına ait olmadığını savunmuşlardır. Werner *et al.* (2004b); ISSR moleküler markörleri kullanılarak *Weissia wimmeriana* (Sendtn.) Bruch & Schimp. ile *Weissia controversa* türleri karşılaştırılmış ve akrabalık dereceleri incelenmiştir.

Werner *et al.* (2005); Pottiaceae familyası üyelerinden bazı *Tortella* sp. ve *Weissia* sp. taksonlarını incelemiştir. nrITS moleküler markörü kullanılarak yapılan bu çalışmada *Weissia* sp. taksonlarının tür ayırımlarının zor olması üzerine bu çalışmanın yapıldığı açıklanmıştır. Çalışmada *Trichostomum* sp. taksonları da uyumluluk analizlerinde kullanılmış ancak *Weissia* sp. taksonları ile etkin bir sonuç elde edilememiştir.

Grundmann *et al.* (2006) Pottiaceae familyası *Pleurochaete* Lindb. türleri ile *atpB-abcL*, *rps4+rps4-trnS* IGS, *trnL-trnF* ve ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgeleri ile çalışarak kloroplast

ve nükleer ribozomal DNA dizilerini kullanmıştır. Farklı ülkelerden elde edilen türlerle yapılan bu çalışmada kıtalar arası gen akışının kanıtı net biçimde ortaya konulamasa da birbirine çok benzer ve morfolojik olarak ayırmakta güçlük çekilen *Pleurochaete* sp. türlerinin kılavuz olarak değerlendirilebileceği savunulmuştur.

2008 yılında Hernández-Maqueda *et al.* tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Grimmiaceae/Ptychomitriaceae familyası *trnS, trnT, trnL, trnF* ve rps4 gen bölgeleri ile incelenmiş ve *Coscinodon* türleri, Grimmia'da aynı gametofit morfolojisini paylaşan türlerin yanında dağılmış gibi görünerek sinonimi olarak belirtilmiştir. Diğer bir araştırmada ise bazı *Sphagnum* sp. türleri ile Avrupa ve Amerika kökenli örnekler üzerinde çalışılmıştır (Shaw *et al.* 2008). Plastid ve nükleer genom analizleri ile incelenen örneklerin, filogenetik yönden akrabalık dereceleri ortaya konmuştur.

Sawicki *et al.* (2009); ITS1 ve ITS2 moleküler markörleri ile *Orthotrichum* sp. taksonları ile yapılan çalışmada morfolojik yönden benzer olan *Ulota crispa* (Hedw.) Brid. ve *Orthotrichum lyellii* Hook. & Taylor türlerinin moleküler yönden birbirine uzak akraba oldukları ortaya konmuştur. Tür ayırımları ITS1 ve ITS2 moleküler markörleri ile yapılmıştır.

Morfolojik yönden ayırt etmekte zorluk yaşanan *Scleropodium californicum* (Lesq.) Kindb., *S. cespitans* (Müll.) Koch, *S. julaceum* Lawton, *S. obtusifolium* (Mitt.) Kindb. ve *S. touretii* Brid. (Koch). türleri, ITS ve cpDNA *rps4, psbA2* ve *trnG* bölgeleri ile yapılan araştırma sonucu birbirinden ayırt edilmiştir (Carter 2012).

Stech *et al.* (2013); *rps4-trnT, trnT-trnL,* ITS1, ITS2 bölgeleri ile yapılan çalışmada özellikle ITS1 tür ayırımını sağlamada, özellikle yakın akraba ilişkisi bulunan taksonlar için daha etkin sonuç verdiğini açıklamışlardır. Lang *et al.* (2014); *Dicranum* türleri ile yapılan araştırmada *rps4-trn*T_{UGU}, *trn*L_{UAA}*-trn*F_{GAA}, *trn*H_{GUG}*-psbA, rps19-rpl2, rpoB,* and nrITS1-5.8S-ITS2 bölgeleri tercih edilmiştir. Bu çalışmada daha çok DNA barkotlarının türleri ayırt edebilme oranları incelenmiş ve bunun için tür zengini ve taksonomik yönden karmaşık olan *Dicranum* türleri seçilmiştir. ITS1, *trnL-F* ve *rps4-*

trnT bölgeleri ile yapılacak araştırmalarda daha verimli sonuç elde edileceği savunulmuştur.

Suzuki *et al.* (2018); *rbcL* ve *rps4* gen bölgelerini baz alarak *Fissidens* sp. taksonları ile yapılan çalışmada hem morfolojik hem moleküler değerlendirmeler sunulmuştur. Filogenetik analizler doğrultusunda *Fissidens* sp. taksonlarına ait akrabalık ilişkileri açıklanmıştır. Briyofitler sadece karayosunları ile sınırlı değildir. Ciğerotları ve boynuzotları da moleküler çalışmalara konu edilmektedir (Goffinet *et al.* 2004).

Ülkemizde ise 1840'lı yıllarda çiçek aşısı çalışmaları ile laboratuvar ve deneysel araştırmalara rastlanmaktadır. Devam eden yıllarda kuduz, veba ve kolera gibi hastalıklar incelenmiştir (1880, 1890, 1950, 1970) ve bakteriyoloji dersleri açılarak eğitimler bu alanda ilerletilmiştir. Devam eden yıllarda viroloji konusunda araştırmalar yapılmıştır ve hayvan hastalıkları, hayvanlardan insanlara bulaşabilen hastalıklar ya da salgına yol açabilen bakteriler-virüsler gibi konularda çalışmalar yapan bilim insanları yurt dışına gönderilmiştir. Buradaki amaç; tedavi yollarını öğrenebilmek, aşı ve serum geliştirebilmektir (http://www.mikrobiyoloji.org, 2020).

2.2 Morfolojik Markörler

Bitki ya da hayvan popülasyonlarında tek bir bireyi ya da grubu diğerlerinden ayırt etmeye yarayan seçici, belirgin özelliklerin genel adı markör'dür. Bu ayrım fenotipik açıdan yapıldığında morfolojik markörler değerlendirilmiştir anlamına gelmektedir. Bir bitki popülasyonu için yaprak formu, ağaç habitus özellikleri, meyve biçimleri ya da kabuk yapıları, çiçek renkleri-şekilleri gibi nitel anlamda ayırt edilebilen bitkiye ait özellikler morfolojik markörleri oluşturmaktadır. Bu tür markörlerden güvenilir bilgi elde edebilmek için genetik açıdan uzak akraba kabul edilen bitki ya da hayvan toplulukları ile çalışılması gerekmektedir. Çünkü yakın akraba olan bireylerde tanımlanan markörler hakkında yanılma olasılığı oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra ekolojilerin farklı olduğu alanlar için de markörlerin üretilebiliyor olması en önemli koşuldur. Ama her zaman bu koşulu sağlamak mümkün değildir. Örneğin salatalık (*Cucumus sativus* L.) için bazı ayırt edici karakterlerin oluşumu, çevre şartlarına göre

değişim göstermektedir (Staub and Crubaugh 1995). Yine tohumsuz bitkilere örnek olarak; *Cinclidotus asumaniae* Ursavaş & Çetin (Şekil 2.1) karayosunu cinsi yetiştiği ortam koşullarına bağlı olarak farklı karakteristik özellikler geliştirebilmektedir.



Şekil 2.1 *Cinclidotus asumaniae* Ursavaş & Çetin

Yetişme koşullarının bitkiler üzerinde oluşturduğu çeşitli etkilerden kaynaklanan farklılıklarının yanı sıra; gerek bitki gerek hayvan popülasyonlarında her bir canlının yaşam evreleri bulunmaktadır. Canlıların bu evrelerde de çeşitli morfolojik özellikleri farklılıklar gösterebilmektedir. Bu nedenle pek çok alanda (tarım, ıslah, sistematik vb.) dönem dönem tercih edilse de morfolojik markörlerin tekrarlanabilirliğinin sınırlı olması baş sebep olmak üzere, yanlış çalışmaların ortaya konulmasına sebep olabilmektedir (Staub and Sequen 1996, Gülşen ve Mutlu 2005).

2.3 Biyokimyasal Markörler

İzoenzimler, yaprak ya da çeşitli bitki organlarında bulunan kimyasal bileşikler, tohum kabuğu proteinleri, sekonder metabolitler vb. biyokimyasal markörleri oluşturmaktadır. Bu markörler arasında tohum proteinleri ve izoenzimler diğerlerine göre daha az maliyet ve iş gücü ile elde edilebilir nitelikte oldukları için sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak bitki popülasyonlarında kullanmak için çeşitli sınırlamalarla karşılaşılmaktadır. Özellikle markörlerde meydana gelen varyasyonlar, translasyon sonrası oluşan modifikasyonlar ve kodlayıcı DNA bölgelerindeki değişimler sonucu yapılacak çalışmaların güvenilirliği azalmaktadır. Bu nedenle biyokimyasal markörleri kullanabilmek için araştırma yapılacak popülasyonların niteliği büyük önem

taşımaktadır. Bu bağlamda izoenzimler, nispeten uzak akraba bitkiler ya da türler arası varyasyonlar hakkında bilgi edinmek için uygun bir markör iken yakın akraba bitkiler arası ilişkileri belirlemede tercih edilmemektedir (Staub and Sequen 1996).

Biyokimyasal markörlerin başka bir dezavantajı da nicel olarak az bulunmalarıdır. En çok tercih edilen protein ve izoenzim markörlerinde bu sorun ile sık sık karşılaşılmaktadır. Test edilen ya da kullanılan izoenzimlerin bitkilerde, sürekli ve fazla oranda sentezlenmesi gerekmektedir (Gülşen ve Mutlu 2005).

Bu bağlamda; bilimsel araştırmalara konu edilen tohum kabuk proteinleri ve izoenzimlerle ilgili bilgiler şu şekildedir;

Tohum proteinleri, polimorfizmi yüksek ve tekrarlanabilen markörler oluşturmaktadır. Kromozomların herhangi bir bölümünün kaybı, yer değiştirmeleri ya da DNA baz değişiklikleri gibi sebeplere bağlı olarak protein polimorfizmi oluşmaktadır. Ancak çalışılabilecek lokus sayısının az olması en büyük dezavantajıdır (Gepts 1990). Aynı zamanda translasyon sonrası görülen yapısal enzim değişiklikleri de bu markör için başka bir dezavantaj olarak görülmektedir (Staub *et al.* 1982). Bunun sebebi ise; o enzimi kodlayan DNA'lar aynı olmasına rağmen bilinmeyen bir lokus enzimin yapısını değiştireceği için jel analiz yorumlamalarında hatalara neden olacaktır (Gülşen ve Mutlu 2005).

Bir enzimin alternatif formları olan izoenzimler, elektrik yüklü ortamlarda farklı yönlerde ve hızda hareket etmektedirler (Markert and Moller 1959). Nişastadan oluşturulmuş jeller üzerinde bulunan kaba enzim ekstraktları öncelikle jelde ayrılır ve daha sonra biyokimyasal tespitler yapılmaktadır (Hunter and Markert 1959).

Bir enzim sisteminde belirlenen bu bantların sayısı;

1) Enzimi oluşturan alt ünite (subunit) sayılarına,
2) Bitkide çalışılan enzimin homozigot ya da heterozigot olmasına,
3) Çalışılan enzimi kodlayan lokus sayısına bağlı olarak tespit edilmektedir.

İzoenzimler belirli bir lokus adına, heterozigot ve homozigot bireylerin ayırt edilebildiği kodominant markörler oluşturmakta ve genom haritalama başta olmak üzere sistematik çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Bu konuda turunçgillerde yapılan ıslah çalışmaları dikkat çekmektedir. *Citrus* sp. bitkisi ıslah çalışmalarında zigotik bireyleri (fidanları), nuseller olanlardan (nuseller embriyolardan) ayırt etmek amacı ile yaygın biçimde izoenzimlerden yararlanılmaktadır (Roose 1988).

İzoenzimler günümüzde de pek çok çalışmaya konu edilmektedir. Taşpınar ve Tosun (2002) tarafından yapılan bir araştırmaya göre; başta bitki ıslahı olmak üzere genetik akrabalık düzeyinin belirlenmesi, tür ayırımı, sitogenetik ve sistematik analizler, popülasyon genetiği gibi birçok konuda izoenzimlerden yararlanılmaktadır. Biyokimyasal markörleri, bazı kaynaklar 'protein markörleri' başlığı altında incelemektedir. Özşensoy ve Kurar (2012) tarafından yapılan bir çalışmada protein markörleri olarak ele alınan bu konunun, diğer çalışmalardan farklı olarak bu kez hayvan toplulukları üzerinde yapılan araştırmalardaki önemi vurgulanmıştır.

Bilimsel araştırmalarda, herhangi bir canlı için DNA temelli bulgularda gözlenen polimorfizm, biyokimyasal ve morfolojik markör yöntemlerinde elde edilen polimorfizm düzeylerine göre çok daha yüksektir. Aynı zamanda moleküler markörler az miktarda DNA ile etkin çalışma imkânı sunduğu için bir kat daha önem kazanmaktadır. İzoenzim tekniğinin aksine, tüm genom bölgesinde çalışabilme imkânı sunmaktadır (Gözel vd. 2016). Bu nedenle moleküler markörlere duyulan ihtiyaç bir kat daha artarak geliştirmek için yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır. Böylece pek çok bilimsel araştırmanın çözümlenmesinde yarar sağlayacaktır.

2.4 Moleküler Markörler

Moleküler markörler, genomda yer alan herhangi bir gen bölgesi veya gen bölgesi ile ilişkili bir DNA parçasıdır. Genetik nitelik taşıyan markörlerin, DNA tabanlı formlarını oluşturdukları için DNA markörleri (DNA markırları) olarak da bilinmektedir. Bu markör sistemi, farklı genotiplere ait DNA dizilerini ortaya koymaktadır. Özellikle ıslah

çalışmalarına konu edilen moleküler markörler, nükleik asit temeline dayalı tekniklerden yararlanılarak genom analizlerinde kullanılmaktadır. Bu markörler sayesinde morfolojik açıdan birbirleriyle oldukça benzer canlı gruplarının, ayrımı ve teşhisi bir kat daha kolaylaşmıştır (Yorgancılar vd. 2015).

Moleküler markör tekniklerinde monomorfizm ve polimorfizm kavramları önem taşımaktadır. Monomorfik markörler, genotipler arasında herhangi bir farklılık göstermemektedir. Polimorfik markörler ise; aynı ya da farklı türler arasındaki genotipik farklılıkları ortaya koyan markörler anlamına gelmektedir ve bu nedenle monomorfik markörlere göre daha yararlı olup önem taşımaktadır. Moleküler markör yöntemleri de DNA molekülündeki bu polimorfik bölgeleri tespit etmeyi baz alarak çalışmaktadır. Polimorfizm ile fenotipik özellik varyantları, DNA dizisi, kromozom yapıları ya da aminoasit dizisi gibi niteliklere bağlı olarak karşılaşmak mümkündür (Yorgancılar vd. 2015). Bu bağlamda; moleküler markör sistemlerinde özellikle polimorfizm düzeyi başta olmak üzere lokus sayısı, analiz maliyeti, popülasyon özellikleri gibi faktörler göz önünde bulundurulmaktadır (Gülşen ve Mutlu 2005).

Gelişen teknoloji ile birlikte son yıllarda özellikle canlıların sistematik olarak ele alınması konularında sıklıkla kullanılan moleküler markörler, sahip oldukları pek çok avantajlarla oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu avantajlar Gülşen ve Mutlu (2005)'e göre;

1) Ortam koşullarından etkilenmemesi,
2) Çekirdek ya da kendilerine ait DNA bulunduran kloroplast ve mitokondri organelleriyle çalışma imkânı sunması,
3) Genetik açıdan oluşan değişiklikleri diğer markörlere oranla daha fazla yansıtmaktadır, bu nedenle bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesini sınırlandırması,
4) Her bir ebeveynden gelen farklı genetik karakterler ayrı ayrı belirlenebildiği için bireyin genetik orijinini tespit etme imkânı sunması,
5) Moleküler markörlerin sonsuz sayıda elde edilebilir nitelikte olması şeklinde sıralanabilir.

DNA markörlarında yani moleküler markörlerde temel amaç, bireylerin (cins, tür, hat vb.) DNA dizilerindeki farklılıkları belirlemek ve sonraki süreçte aralarındaki ilişkileri yorumlayabilmek için bilimsel anlamda kaynak oluşturmaktır. DNA seviyelerindeki bu farklılıklar bulunduğu genomda tek bir bölgeyi gösteriyor ise; bu durum 'allel' olarak adlandırılmaktadır. Moleküler markörlerce sağlanan bu avantajın çalışmalar için önemi; konu edilen DNA dizisinin herhangi bir proteini kodlayıp kodlamadığının bilinmesine gerek kalmadan çalışmada araştırılan iki birey arasındaki allellik derecesini belirleme imkânı sunmasıdır (Gülşen ve Mutlu 2005). Böylece araştırmacılar zaman, maliyet ve emek tasarrufunu sağlayarak daha etkin çalışmalar oluşturabileceklerdir.

Araştırmalarda kullanılacak moleküler markörlerde olması gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Araştırmacı bu özelliklerin olup olmamasına göre yapacağı çalışmalarda hangi markör sistemini kullanacağına karar vermektedir. Yapılan literatür taramasında Filiz ve Koç (2011); Yorgancılar vd., (2015); Eker ve Kolören (2017) tarafından ele alınmıştır. Bu bağlamda Filiz ve Koç (2011)'e göre moleküler markörlerde bulunması istenen özellikler; hızlı, ucuz ve basit olması, genetik farklılıkları belirlemede yetkin olması, farklı fenotiplerle bağ oluşturabilmesi, bağımsız, çok sayıda ve güvenilir markörler üretebilmesi, az miktarda kullanılacak doku ya da DNA ile verimli sonuçlar elde etme ve polimorfik yapıda olup tüm genomlarda kullanılabilme imkânı sunmasıdır.

Yorgancılar vd. (2015) yaptıkları çalışmada bu konu hakkında sıraladıkları nitelikler ise şöyledir;

-Polimorfizm düzeyi yüksek olup farklı genotipleri ayırt edebilmesi,
-Eşbaskın (kodominant) kalıtım göstermesi,
-Tüm dokular için kullanım olanağı sağlaması,
-Heterozigot bireyleri, homozigot dominant özellikteki bireylerden ayırt edebilmesi,
-Seçici ve nötr davranış niteliği taşıması,
-Genom üzerinde sık bulunması ve düzgün dağılım göstermesi,
-Tekrarlanabilirlik düzeyinin yüksek olması,
-Otomasyon imkânı sunan, kolay ve hızlı değerlendirme olanağına sahip olması,

-Genetik materyaller üzerinde (özellikle aynı genetik materyallerde) yapılacak çalışmaların (markör analizlerinin) her zaman aynı sonucu vermesi,
-Erişimin kolay ve maliyetin düşük olması.

Eker ve Kolören (2017) tarafından yapılan bilimsel araştırmada da benzer özelliklerin sıralandığı görülmektedir. Dolayısı ile yapılan bu çalışmalar dikkate alınarak moleküler markör yöntemlerinde genel anlamda olması istenen özellikleri; polimorfizm düzeyi yüksek olup farklı genotipleri ayırt edebilmesi, erişimin kolay ve maliyetin düşük olması, tekrarlanabilirlik düzeyinin yüksek olması ve az miktarda kullanılacak doku ya da DNA ile verimli sonuçlar elde etme imkânı sunması şeklinde özetlemek mümkündür.

2.5 Moleküler Sistematikte Kullanılan Teknikler

Gelişen teknoloji ile birlikte moleküler tanımlama yöntemleri, mikrobiyoloji alanına kazandırılan ve oldukça büyük öneme sahip yeniliklerin başında gelmektedir. Günümüzde bu teknikleri geliştirmeye yönelik yapılan pek çok araştırma ile moleküler tanımlama yöntemlerine yeni özellik ve nitelikler kazandırılmaktadır. Böylece çeşitli amaçlar doğrultusunda yürütülen ya da yürütülecek bilimsel çalışmalara önemli ölçüde yarar sağlamaktadır. Ancak moleküler tanımlama tekniklerinin kullanımını ve araştırmacının karar vermesini etkileyen bazı unsurlar bulunmaktadır. Özellikle deneyimli personel ve maliyet bu unsurların temelini oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra bahsedilen tekniklerin kendi içlerinde barındırdıkları avantaj ve dezavantajlar da kullanım ve karar verme mekanizmasını etkilemektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak; moleküler tanımlama yöntemleri tüm dünyada ve son yıllarda ülkemizde de pek çok bilimsel araştırmaya ışık tutmaktadır (Çetinkaya ve Ayhan 2012).

Bu bağlamda, esas olarak iki farklı moleküler markör tekniği bulunmaktadır. Birincisi DNA hibridizasyonuna dayalı RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi), diğeri ise PCR (Polymerase Chain Reaction, polimeraz zincir reaksiyonu)'ye dayalı SSR (Simple Sequence Repeats, basit dizi tekrarları), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, çoğaltılmış parça

uzunluğu polimorfizmi) ve SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism, dizi bağlantılı çoğaltılmış polimorfizm) teknikleridir. Yeni yaygınlaşmaya başlayan ve sağlık bilimlerindeki araştırmaların öncülük ettiği SNP (Single Nucleotide Polymorphism, tek nükleotit polimorfizmi), DNA zincirindeki tek nükleotit farklılığını kullanmaktadır. Bu teknik bitki genomuna ait DNA zincir bilgisini gerektirdiği için bitki bilimlerinde kullanımı diğer tekniklere oranla nispeten gecikmiştir. Ancak günümüzde devam eden EST (Expressed Sequence Tags, ifade edilmiş dizi etiketleri) projeleri SNP markörlerinin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir (Gülşen ve Mutlu 2005).

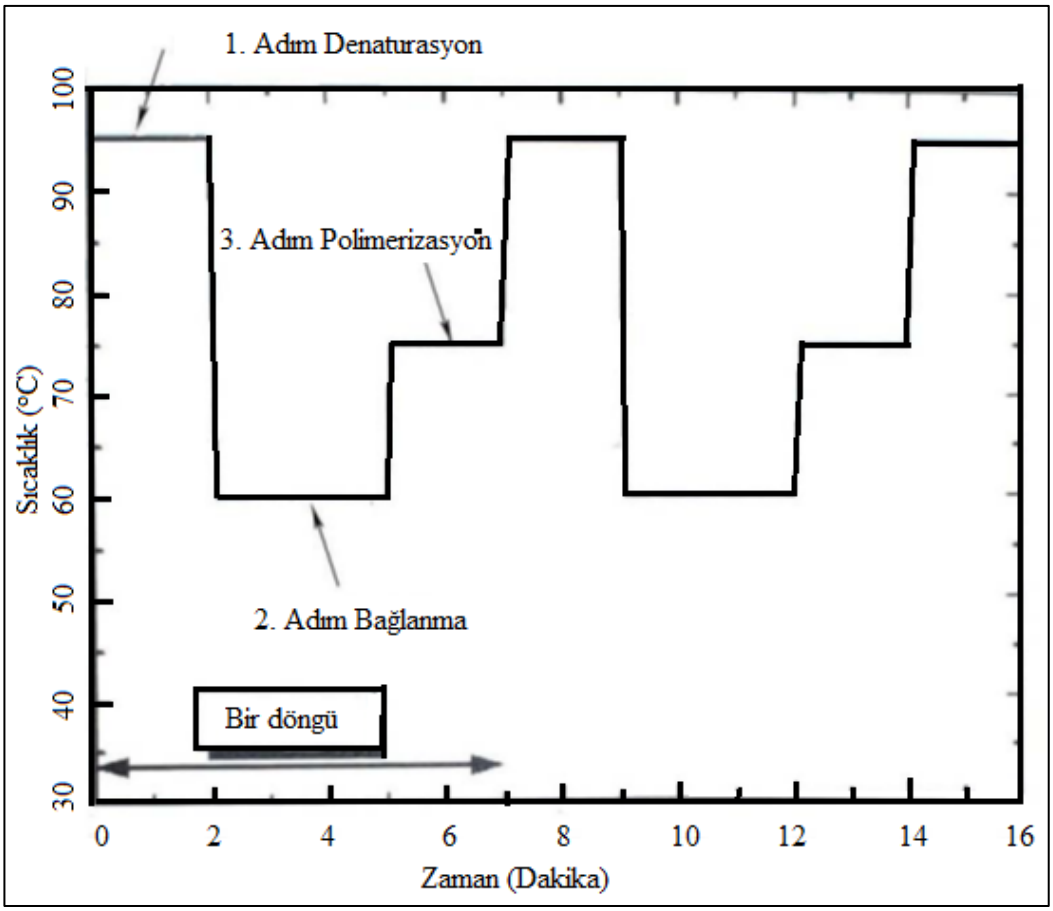
Literatürde bu iki temele dayandırılarak birçok yöntem açıklanmaktadır. Örneğin Gülşen ve Mutlu (2005) SSR markör sistemini yalın halde ele alırken Gözel vd. (2016) mikrosatellitler olarak nitelendirmiş ve STR, ISSR markör sistemlerini de eklemiştir. Altun (2006)' ya göre ISSR, SCAR, CAP (CAPS) ve SRAP gibi PCR (PZR) temeline dayalı bu DNA markörleri çok sık kullanılmayanlar olarak nitelendirilirken Filiz ve Koç (2011) yaptıkları bir araştırmada bu markörlerin yanı sıra EST'yi de ayrıntılı olarak açıklamışlardır ve mikrosatellitlere ek olarak minisatellit niteliklerinden de bahsetmişlerdir. Vardar-Kanlıtepe vd. (2010) ise bitki ıslahı konusunda MAS'ın öneminden uzunca bahsetmiş ve kullanım alanlarını sıralamıştır. Güz ve Kılınçer (2012) böcek sistematiği ile ilgili yaptıkları bir araştırmada farklı yaklaşımlara dikkat çekmektedirler. Sıkça kullanılan PCR, RFLP, RAPD, AFLP, SSR tekniklerinin yanı sıra DNA analizinde kullanılan bölgeleri açıklamışlardır.

Polimeraz zincir reaksiyonu: PCR'yi temel anlamda 'DNA'nın *in vitro* koşullarda enzimatik olarak sentezletilmesi' şeklinde tanımlamak mümkündür. 1980'li yıllarda keşfedilen bu teknik kaynağını *Thermus aquaticus* adlı bakteriden almaktadır. Bakteri, sıcaklığa dayanıklı bir enzim üretmektedir ve tekniğe adını veren bu polimeraz enzimi (*Taq* DNA polymerase) PCR çalışma prensibinin temelini oluşturmaktadır. Hücre için doğal şartlar altında gerçekleşen DNA replikasyonu, Taq DNA polymerase ile bu kez laboratuvar şartlarında ve 'thermocycler' denilen özel cihazlar yardımı ile gerçekleştirilmektedir (Yorgancılar vd. 2015). Böylece PCR, pek çok araştırmanın etkin biçimde sonuçlanmasını sağlamaktadır.

Canlı organizma kullanmadan az miktarda DNA, tampon çözelti ya da dNTP gibi kimyasallar ve enzimler yardımı ile DNA çoğaltımı anlamına gelen PCR keşfinden sonra, moleküler biyoloji çalışmalarında artış giderek hızlanmış ve PCR'ye dayalı markörlerin geliştirilmesine büyük ölçüde ağırlık verilerek birçok yeni yaklaşım ortaya konmuştur (Filiz ve Koç 2011). Aynı zamanda bu polimeraz zincir reaksiyonu virüs, parazit, bakteri, protozoon ve fungus gibi hastalık yapma potansiyeline sahip canlılara ait hedef nükleik asit zincirlerinin primerleri (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimler kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün bir yöntemdir. Üzerinde çalışılan örnek genetik materyal, çok az sayıda ya da ilişkisi olmayan birçok DNA molekülü arasında bulunsa da PCR, çoğaltıma olanak sağlamaktadır. Böylece homojen bir DNA materyali haline getirilen örnek tanımı ve yorumu kolayca yapılabilmektedir (Schochetman and Jones 1988, Arda 1995).

PCR, pek çok avantaja sahip ve oldukça önemli bir teknik olarak günümüzde de yaygın kullanıma sahiptir. Bu avantajların en başında, uygulamaları hızlı biçimde gerçekleştirebilme imkânı sunması yer alır. Yapılacak genetik tespitlerde büyük önem taşıyan DNA, nitelik olarak kuru, az miktarda ya da eski bir örnek olsa da PCR ile verimli sonuçlar elde etme olasılığı yüksektir. Aynı zamanda belirlenmesi zor toksinlerin ve antibakteriyel dirence sahip bakterilerin tespitinde etkin biçimde kullanılmaktadır. PCR'ın uygulama olanaklarını belirli ölçüde kısıtlayan pahalı cihaz ve malzemeler, deneyimli personel ihtiyacı ve ortamdaki istenmeyen DNA'nın primer ile ortak dizilime sahip olup çalışmaları geciktirme risklerine rağmen; popülasyon genetiğinin analizlerinden, babalık testine ve epidemiyolojik çalışmalara kadar geniş alanda tercih edildiği görülmektedir (Schochetman and Jones 1988, Walker and Dounan 1989, Erlich *et al.* 1991, Persing 1991, Wolcott 1992, Çevik 1994, Tuchili *et al.* 1996, Diallo *et al.* 1998, Çetinkaya ve Ayhan 2012).

Temel anlamda PCR, üç adımdan oluşmaktadır. Bir döngü halinde devam eden çalışma prensibine sahiptir. Bu döngüyü DNA ipliklerinin birbirinden ayrılarak açılması (Denatürasyon), daha sonra primer dizinin bağlanması (Annealing) ve uzama (Extention) olarak özetlemek mümkündür (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 PCR Çalışma Döngüsü (Yorgancılar vd. 2015)

PCR çalışma döngüsü, ilk etapta çift zincirli bir DNA molekülünün tek zincire ayrıştırılması daha sonra hedef dizilere oligonükleotid primerin bağlanması ve bağlanan primerlerin uzaması esasına dayanmaktadır. Denatürasyon denilen aşamada önce yaklaşık 95 ^{o}C sıcaklık kullanılarak kalıp DNA'nın çift sarmal yapısının açılıp DNA'nın tek iplik haline getirilmesi hedeflenmektedir. Daha sonra primerin içerdiği nükleotid oranına bağlı olarak 30 ile 60 ^{o}C arasında değişen sıcaklık ile başlatıcı DNA'nın kalıp DNA'ya yapışması istenmektedir (Annealing). Son aşama olan Extention'da ise bu kez 72 ^{o}C sıcaklık kullanılarak *Taq* DNA polimeraz enzimi ortama eklenir ve böylece A,T,G,C nükleotidlerini kullanarak elde edilmek istenen uygun DNA bölgesi çoğaltılır. Oldukça hızlı gerçekleştirilen bu aşamalar, çalışmaların amaçlarına ya da isteğe göre 30-45 kez tekrarlanabilir. Botstein *et al.* (1980)'na göre, DNA'nın istenilen ya da rastgele sentezlenen bazı bölgelerini milyonlarca kez çoğaltılabilme imkânı sunan PCR

yönteminin geliştirilmesi ile RAPD, AFLP, SSR gibi birçok yeni markör yaklaşımları da bilimsel çalışma ortamına kazandırılmıştır (Yorgancılar vd. 2015).

2.6 cpDNA, mtDNA, nDNA, rRNA, DNA Barkot Özellikleri ve Filogeni

DNA barkotları denildiğinde akla gelen DNA bölgeleri, çalışılacak canlı grubuna göre şekillenmektedir. Bitkiler için kloroplast DNA'sı (cpDNA) tercih edilirken hayvan popülasyonlarında ya da adli bilimlerde daha çok mitokondriyal DNA (mtDNA) ve kısmen çekirdek ya da nükleer DNA (nDNA) tercih edilmektedir. Gerek kloroplast gerek mitokondri ya da çekirdek DNA'sı, her gen bölgesi her canlı türü için verimli sonuçlar elde etmeyi garantilememektedir. Bu nedenle bilimsel çalışmalara konu edilecek DNA barkotları ya da çalışılacak gen bölgeleri seçilirken literatürde yer alan daha önce denenmiş ve başarı sağlanmış barkotlar değerlendirilmektedir. Bu bağlamda; barkot seçimini kolaylaştırmak için Consortium for the Barcod of Life (CBOL) (Hollingsworth *et al.* 2011), The Barcod of Life Database System (BOLD System) (Filiz ve Koç 2012), GenBank ve BLAST gibi bilgisayar programlarından yararlanılmaktadır.

DNA barkot seçiminde olduğu gibi kendine özgü genetik kod barındıran bu organel seçimlerini de etkileyen çeşitli sebepler bulunmaktadır. Özellikle mtDNA sahip olduğu birçok avantaj sayesinde sıklıkla tercih edilmektedir. Nükleer DNA'ya göre mutasyon hızının yüksek olması, çok sayıda polimorfizm elde etmeyi sağlamaktadır (Upholt and David 1977, Brown *et al.* 1979, Poulton *et al.* 1998, Rokas *et al.* 2003, Başaran 2004). Aynı zamanda nükleer DNA'dan bağımsız replikasyon yaparak hücre bölünmesi sırasında heteroplazmik nitelik kazanmaktadır. Böylece çok sayıda bulunması ile avantaj sağlayan mtDNA, bağımsız şekilde kalıtım göstermektedir (Wallace 1994, Wallace 1995). Kolay elde edilmesi ve küçük boyutlu olması PCR, DNA dizileme, RFLP, SNP ve SSCP gibi birçok moleküler markör yönteminde kullanıma uygundur (Uphold and David 1977, Hecht 1990).

Mitokondriyal DNA gen bölgeleri kullanılarak birçok hayvan ırkı çalışması yapılmıştır. Özellikle filogenetik yorumlamalar adına oldukça yarar sağlayan mtDNA, ırklar arası

ilişkileri ortaya koymada büyük önem taşımaktadır (Meghen *et al.* 2002). Bunun yanı sıra kanser araştırmaları, canlı orijinlerinin belirlenmesi, adli tıp vakalar, rekombinasyon eksikliğinin belirlenmesi, göç haritalarının oluşturulması, dejeneratif hastalık nedenlerinin araştırılması, klonlama çalışmalarında kalıtım tespiti gibi oldukça geniş alanda tercih edilmektedir (Rokas *et al.* 2003). Ancak nükleotid değişiminin düşük oranda olması nedeni ile bitkisel kaynaklı çalışmalarda kullanım alanı sınırlanmaktadır (Mower *et al.* 2007). Bu nedenle bitki barkot kaynağı olarak kloroplast ya da plastid genomu da denen cpDNA ya da çekirdek genomu (nDNA) daha uygun görülmektedir (Hollingsworth *et al.* 2011).

Bitkiler için plastid genomunda yer alan *rbcL, trnL, ycf5, rpoB, rpoC1, atpF-atpH, psbA-trnH* ve *psbK-psbI* gibi birkaç bölge ITS yani 'Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgeler' şeklinde tanımlanan DNA barkod adayları olarak dikkat çekmektedir (Kress *et al.* 2005, Kress *et al.* 2007, Ford *et al.* 2009). Yapılacak çalışmalar için belirli bir standart uygulama biçimine dönüştürülmek istenmiş ve ilk etapta bu bölgeler denenmiştir. CBOL (2009)'a göre ise; *rbcL, rpoC, matK* ve *rpoB* kodlama yapan bu bölgeler ile kodlama yapmayan *trnH–psbA, psbK–psbI* ve *atpF–atpH* bölgeleri etkin çalışmalar ortaya koymak adına, kullanılması öngörülen bölgeler olarak nitelendirmiştir (Filiz ve Koç 2012). Ancak ilerleyen yıllarda yapılan pek çok laboratuvar çalışmaları sayesinde, gen bölgelerine ait belirli bir standart uygulama imkânının olmadığı anlaşılmıştır. Kullanılacak bölgelerin seçimi, araştırma konusuna ve hedeflerine göre şekillenmektedir.

Sistematik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan diğer bir bölge ise ribozomal RNA yani rRNA'dır. Hücrenin temel organellerinden olan ribozomlar, mesajcı RNA'yı (mRNA) proteinlere dönüştürmekle görevlidir. Ribozomal RNA ve proteinlerden oluşmaktadır ve tüm ribozomlar büyük ve küçük olmak üzere iki alt birim altında incelenmektedir. Ökaryot canlılarda büyük alt birimi 28S, 5S ve 5.8S; küçük alt birimi ise 18S ribozomal RNA oluşturmaktadır. Değişken ve korunmuş bölgelere sahip olmaları nedeniyle canlı türleri arasındaki ilişkileri açıklamak, ribozomal RNA ile mümkün olmaktadır (Hillis and Dixon 1991).

Ribozomal RNA üzerinde tekrarlanan transkripsiyon birimleri de denen ETS (external transcribed spacer, transkribe olan dış ara bölge), ITS (internal noncoding transcribed spacer region, kodlama yapmayan transkribe olan iç ara bölge) ve NTS (non transcribed spacer region, transkribe olmayan ara bölge) tekrar dizileri bulunmaktadır. Bu sayede spacer yani aralayıcı DNA dizilerinde ayırt edilmektedir. Bu bölgelerde bulunan polimorfizm oranı yüksek düzeyde olduğu için sistematik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hoy 2003). Özellikle böcek sistematiğinde ITS 1, ITS 2 ve 28S ribozomal RNA bölgeleri sıklıkla tercih edilmiştir (Caterino *et al.* 2000). ITS bölgeleri ilk çalışmalarda sadece cins ayrımlarında kullanılırken şimdiki uygulamalarda tür içi analizlerin yapıldığı görülmektedir. 18S ve 28S rRNA arasında bulunan arasında IGS (Inter-Genic Spacer, genler arası bölge) bölgeleri ise kök-ur nematod türlerinin teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Petersen and Vrain 1996). IGS ve ITS bölgeleri diğer rRNA bölgelerine oranla daha değişken bir yapı sergiledikleri için daha çok tür ve alttür analizlerinde tercih edilmektedir (Gözel vd. 2016).

Çalışmanın bu bölümüne kadar cpDNA, mtDNA, nDNA ve rRNA özellikleri sıralanmış, birtakım karşılaştırmalar yapılmıştır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda elde edilen avantaj ya da eksikliklere göre seçilecek DNA barkotlarında bulunması gereken özellikler ise Taberlet *et al.* (2007)'ye göre aşağıdaki gibidir;

-Güvenilir ve korunaklı olması,
-Farklı canlı taksonları için kullanıma uygun standart DNA bölgesi olması,
-Taksonomik grupları (takım, aile, cins vb. düzeyde) ayırt edebilecek filogenetik bilgiyi taşıması,
-Degrade DNA çoğaltımını mümkün kılacak uzunlukta olması,
-DNA'nın çoğaltılması ve dizilenmesi için uygun olması,
-Türleri ayırt edebilecek yetkinlikte olması.

Bahsedilen bu özellikleri bulunduran ve yapacağı çalışmaya uygun olduğuna karar vermiş araştırmacı, DNA barkot seçimini yaparak kullanacağı uygun gen bölgesine karar vermektedir. Daha sonra araştırma için belirlenmiş hedefler doğrultusunda elde

edilecek sonuçlar yorumlanmaktadır. Bu bağlamda en çok karşılaşılan çalışma prensibi, filogenetik analizlerdir.

DNA barkotları kullanılarak dizi analizleri yapılmaktadır ve özellikle sistematik uygulamalar için yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu amaç doğrultusunda ilk etapta sistematik açıdan problemli türler tespit edilerek bu türleri ayırt etmek için kullanılacak hedef gen belirlenmektedir. Belirlenen bu genlere özgü (spesifik) primerler dizayn edilir. Daha sonra örneklerden DNA ekstraksiyonu ve spesifik primerler ile PCR amplifikasyonu (çoğaltım) yapılmaktadır. Gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra DNA dizi analizi işlemleri uygulanır ve elde edilen diziler birbirleriyle karşılaştırılıp yapılan yorumlamalar doğrultusunda filogenetik ağaç oluşturulmaktadır. Bu bağlamda Maximum Likelihood (Harris and Stocker 1998), Neighbor-joining (Saitou and Nei 1987), UPGMA (Sokal and Michener 1958, Murtagh 1984) ve Maximum Parsimony (Sober 1983) gibi metodların çalışma amacına göre uygun olanı seçilip MEGA-X ya da Paup Version 4 (Swofford 2003) gibi bilgisayar programlarından yararlanılmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 *Weissia* sp. örneklerinin temini

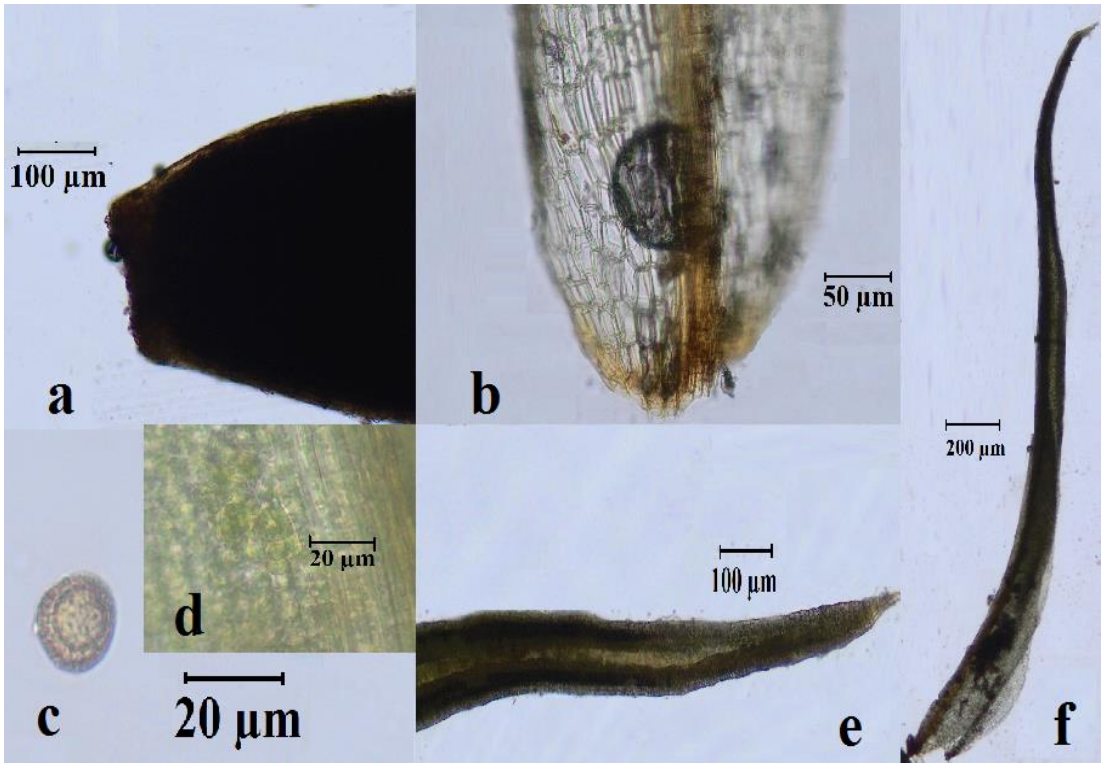
Toplam sekiz adet örnek ile çalışılmıştır. Bu bitki türleri; *Weissia rutilans, W. condensa, W. wilsonii, W. brachycarpa, W. fallax, W. longifolia, W. squarrosa, W. controversa* şeklindedir.

Weissia rutilans, W. condensa, W. wilsonii, W. brachycarpa, W. fallax, W. longifolia bu türler Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ kişisel koleksiyonundan temin edilmiştir. *Weissia controversa* Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ kişisel koleksiyonunda mevcut olmasına rağmen yetersiz kaldığı için Prof. Dr. Mesut KIRMACI kişisel koleksiyonundan temin edilmiştir. Analizler devam ederken *Weissia rutilans* ve *Weissia longifolia* türlerinin yeterli gelmemesi üzerine çalışmanın devam edebilmesi adına *Weissia rutilans* türü Prof. Dr. Mesut KIRMACI, *Weissia longifolia* türü ise Doç. Dr. Nevzat BATAN kişisel koleksiyonlarından temin edilmiştir. *Weissia squarrosa* Doç. Dr. Serhat URSAVAŞ kişisel koleksiyonundan temin edilerek yalnızca bir kez analiz edilebilmiştir. Sonuç alınamamış ve bu tür tekrar temin edilememiştir.

3.1.2 *Weissia* sp. örneklerinin morfolojik yönden karşılaştırılması

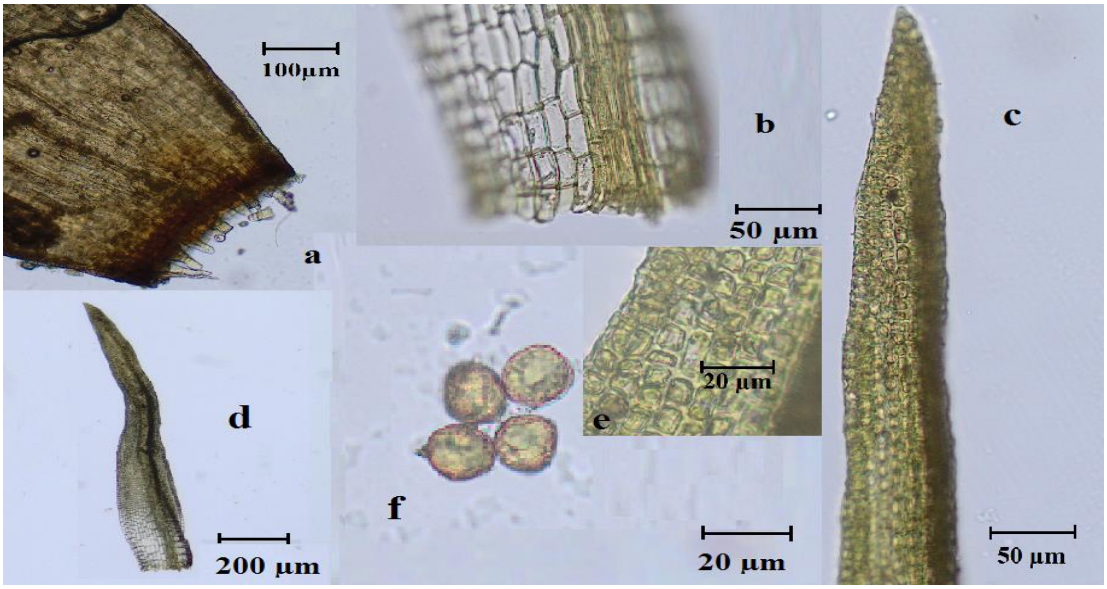
Canlıların morfolojik yönden benzerlik ya da farklılık gösterdiği özellikleri incelenerek yapılan sınıflandırmalar ile teknolojinin gelişmesine bağlı olarak keşfedilen çeşitli yöntemler doğrultusunda yapılan analizlerle elde edilen sınıflandırmalar pek çok yönden birbirini tamamlar nitelikte olmalıdır. Her iki yolun da kendine özgü nitelikleri göz önünde bulundurularak birbirinden bağımsız değerlendirilmeden, çalışmaların daha etkin gerçekleştirilmesi araştırmacıların hedefleri arasındadır. Bu nedenle, *Weissia* sp. örnekleri ile yapılan laboratuvar analizlerinin yanı sıra, morfolojik yönden de sahip oldukları özelliklerin yorumlanması yerinde olacaktır.

Weissia brachycarpa (Nees & Hornsch) Jur. (Şekil 3.1)



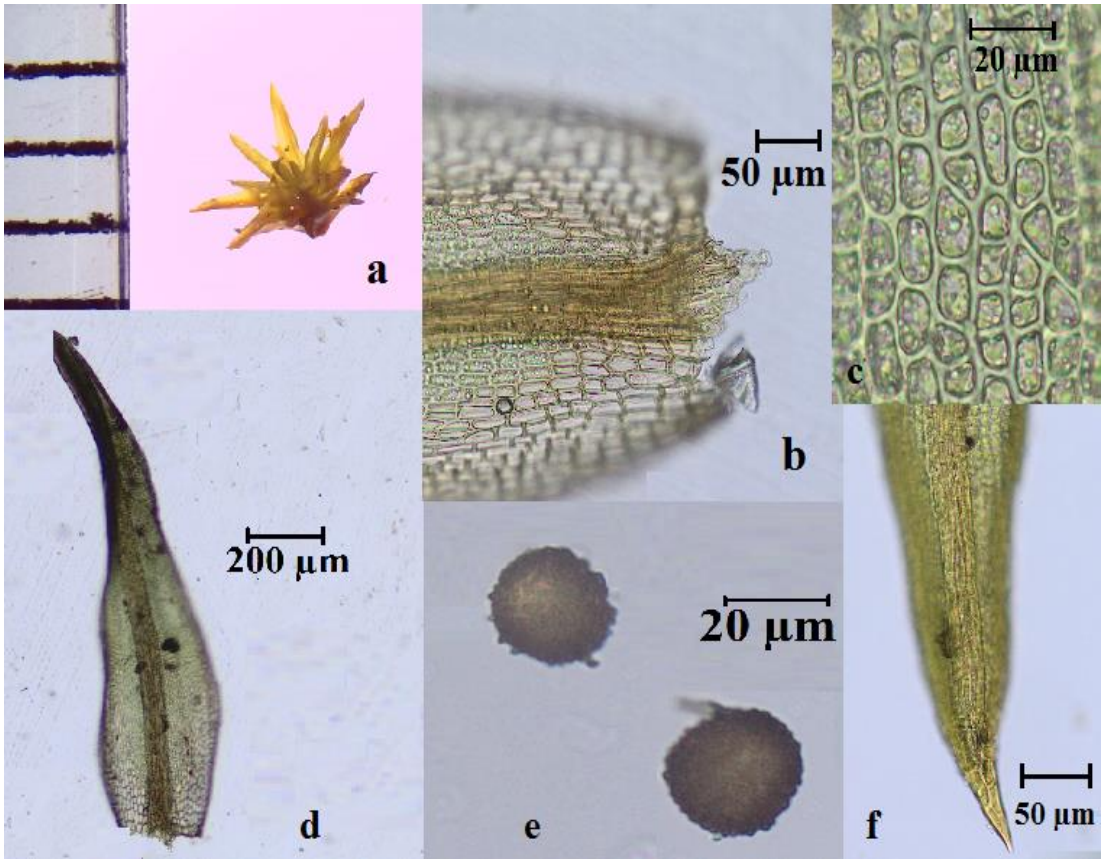
Şekil 3.1 *Weissia brachycarpa* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Yaprak taban hücresi, c. Spor, d. Yaprak orta hücresi, e. Yaprak ucu, f. Yaprak)

Weissia controversa Hedw. (Şekil 3.2)



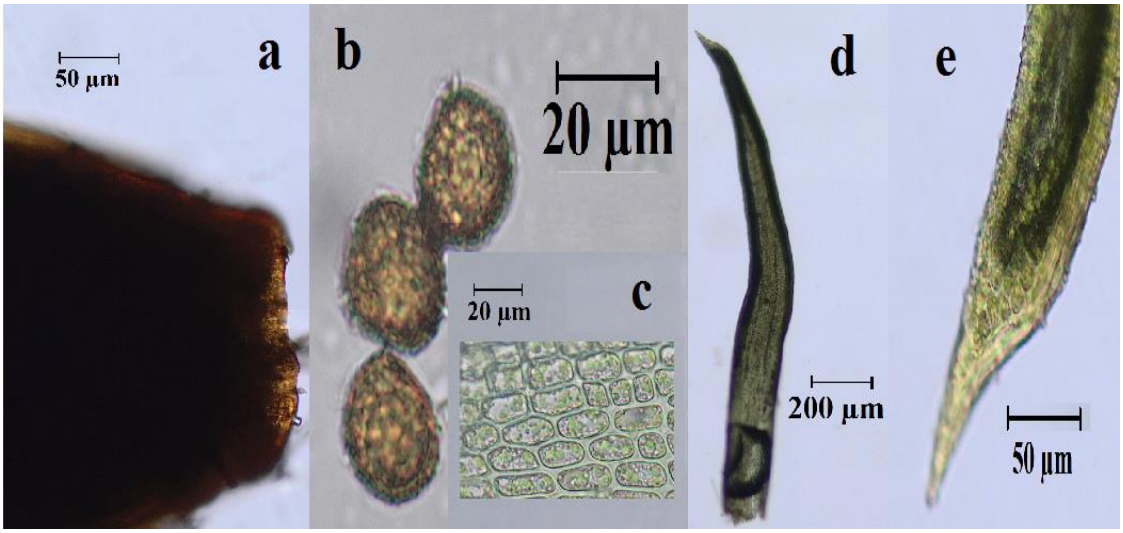
Şekil 3.2 *Weissia controversa* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Yaprak taban hücresi, c. Yaprak ucu, d. Yaprak, e. Yaprak orta hücresi ve yaprak kenarı, f. Spor)

Weissia longifolia Mitt. (Şekil 3.3)



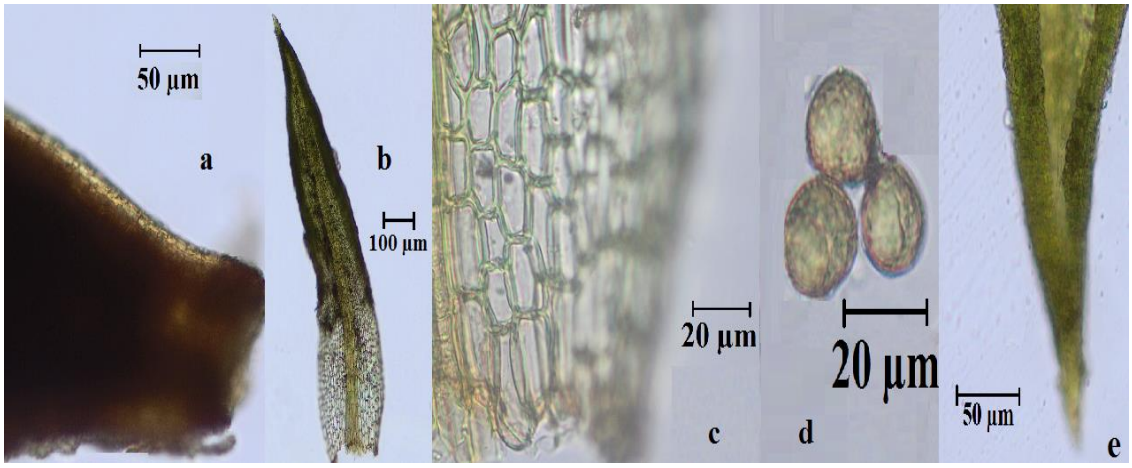
Şekil 3.3 *Weissia longifolia* türünün mikroskobik görünümü (a. Bitki, b. Yaprak taban hücresi, c. Yaprak orta hücresi, d. Yaprak, e. Spor, f. Yaprak ucu)

Weissia controversa* var. *crispata (Nees & Hornsch.) Nyholm (Şekil 3.4)



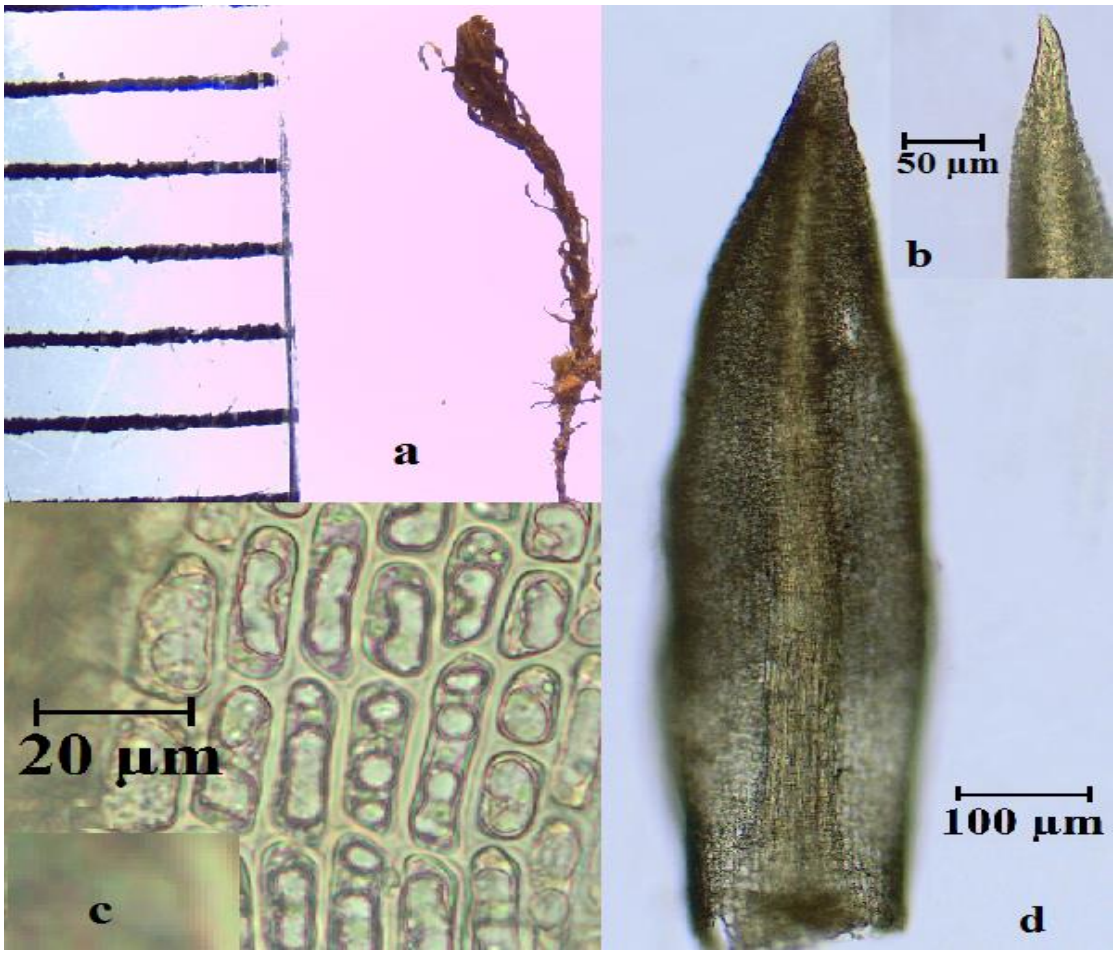
Şekil 3.4 *Weissia controversa* var. *crispata* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Spor, c. Yaprak orta hücresi, d. Yaprak, e. Yaprak ucu)

Weissia condensa (Voit) Lindb. (Şekil 3.5)



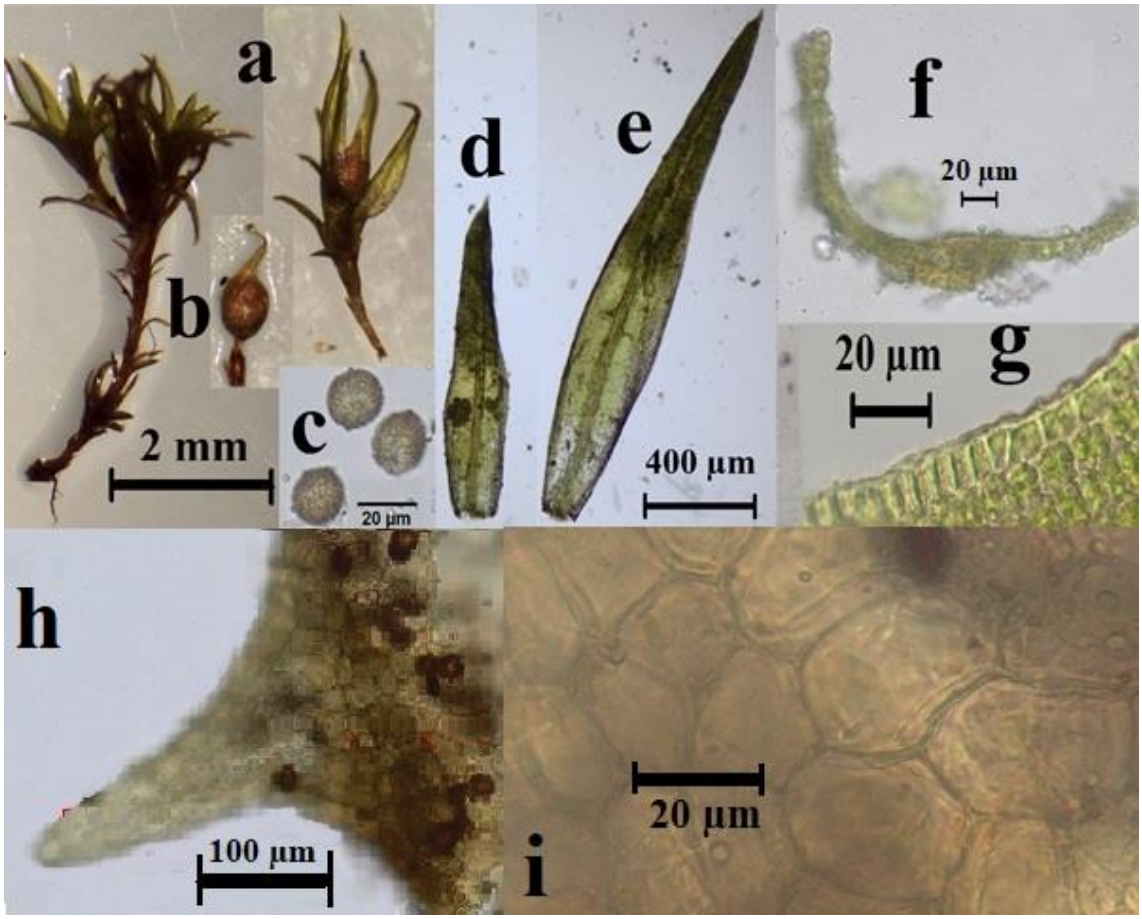
Şekil 3.5 *Weissia condensa* türünün mikroskobik görünümü (a. Kapsül, b. Yaprak, c. Yaprak taban hücresi, d. Spor, e. Yaprak ucu)

Weissia rutilans (Hedw.) Lindb. (Şekil 3.6)



Şekil 3.6 *Weissia rutilans* türünün mikroskobik görünümü (a. Bitki, b. Yaprak ucu, c. Yaprak taban hücresi, d. Yaprak)

Weissia wilsonii (Sm.) Mitt. (Şekil 3.7)



Şekil 3.7 *Weissia wilsonii* mikroskobik görünüşü (a. Bitki, b. Kapsül, c. Spor, d,e. Yaprak, f. Yaprak enine kesit, g. Yaprak kenar hücre, h. Kapsül kapağı, i, Kapsül hücresi)

Tüm taksonlar birkaç özellikleri bakımından birbirlerinden farklılıklar göstermektedirler. *Weissia*'larda morfolojik tür ayrımlarında peristom açıklığı ve taban damar kalınlığı özellikleri dikkate alınmaktadır. Bu bağlamda en kalın taban damar *Weissia longifolia* ve *W. rutilans* türlerinde Çizelge 3.1'de görüldüğü şekilde ölçülmüştür. Mevcut ölçümler doğrultusunda en dar peristom açıklığı ise *Weissia condensa* türüne aittir. Elimizdeki *Weissia rutilans* bitki örneğinde kapsül bulunmadığı için kapsüle ait bilgi ve görüntülere yer verilmemiştir (Çizelge 3.1).

Weissia longifolia türü sporlar gri renkli ve papillos yapılıdır. Yaprak kenarı düz ancak yaprak ucu kukulattır. *Weissia brachycarpa*'da ise sarımsı-açık kahverenkli sporlar görülür ve papillos yapıya rastlanmaz. Yaprak kenarı katlanmış halde ve yaprak ucu

kukulat yapıdadır. *Weissia rutilans* ve *Weissia wilsonii* türlerinde bitki dallanmış haldedir. *Weissia rutilans* türünde yaprak ve yaprak ucu düz formdadır. *Weissia condensa* sarımsı-kahverengi düz yapılı sporlara sahiptirtir. Yaprak kenarı kıvrık, yaprak ucu ise kukulat yapılıdır. *Weissia controversa* türü için spesifik nitelik olarak değerlendirilen peristom dişleri sarımsı-turuncu, sporlar ise sarımsı-zeytin yeşili renktedir. Yaprak kenarı ve ucu düz forma sahiptir. *Weissia controversa* var. *crispata* türünde kahverengimsi sporlar hafif papillos yapıdadır. Orta hücreler de papillos yapı gösterir. Yaprak kenarı kıvrımlı ve yaprak ucu kukulattır. *Weissia wilsonii* hafif papillos yapılı sporları zeytin yeşili renkte ve yaprak ucu kukulat formdadır.

Çizelge 3.1 incelendiğinde bitki boyu en uzun olan takson *Weissia rutilans* iken bitki boyu en kısa olan takson; *Weissia longifolia'*dır. En uzun yaprak boyu *Weissia brachycarpa*'ya aittir. En uzun seta *Weissia controversa*'da ölçülmüştür ve peristom diş sadece bu türde görüldü. Kapsül uzunluğu genelde tüm türlerde yaklaşık 1 mm civarındadır. Peristom açıklığı en geniş *Weissia longifolia* iken en dar *Weissia condensa* olmuştur. Orta hücre boyutları *Weissia longifolia* türünde daha büyük iken diğer türlerde ölçümler birbirine yakın ve 6-7 mm civarındadır. En büyük bazal hücre *Weissia brachycarpa* türünde ölçüldü. Yaprak kenarı hücresi *Weissia rutilans*'ta en küçük iken *Weissia longifolia* türünde en büyüktür. Yaprak ucu hücresi ise en büyük *Weissia longifolia*'da, en küçük *Weissia condensa*'dadır. En kalın taban damar *Weissia longifolia* iken en dar tür ise *Weissia rutilan*s'tır.

Çizelge 3.1 *Weissia* taksonlarının morfolojik olarak karşılaştırılması

Bitki kısımları	***Weissia longifolia***	***Weissia brachycarpa***	***Weissia rutilans***	***Weissia condensa***	***Weissia controversa***	***Weissia controversa* var. *crispata***	***Weissia wilsonii***
Bitki Boyu (mm)	**2**	5	**7**	2	5	4	4-6
Yaprak Boyu ve Eni (µm)	900-1900 X 180-200	**2500-2900** **X** **120-160**	1000-1100 X 200-210	1400-1500 X 150-200	1200-1700 X 120-170	1500-1600 X 130-140	900-1600 X 250-380
Seta Uzunluğu (mm)	0,5	2	-	0,5	**3**	1-1,5	0,5-0,8
Kapsül Uzunluğu (mm)	0,5	1	-	0,7	1	1	0,5-0,8
Pristom Dişleri (µm)	Yok	Yok	-	Yok	55-70	Yok	Yok
Peristom Açıklığı (µm)	**400-460**	190-200	-	**100-120**	330-430	180-200	150-200
Sporlar (µm)	**23-28**	**12-18**	-	13-17	13-17	17-22	14-18
Orta Hücre (µm)	**7-13** **X** **4-7**	6-8 X 4-6	6-8 X 5-7	6-7 X 6-7	5-9 X 6-8	4-6 X 6-10	5 X 7
Bazal Hücre (µm)	20-45 X 7-12	**30-33** **X** **15-18**	25-26 X 9-13	20-28 X 13-18	16-45 X 12-14	20-30 X 10-12	-
Yaprak Kenarı Hücresi (µm)	**10-18** **X** **3-6**	6-14 X 4-6	**5-7** **X** **6-8**	6 X 7	8-10 X 3-4	7 X 6	-
Yaprak Ucu Hücresi (µm)	**16-28** **X** **4-6**	-	16-20 X 5-7	**6-9** **X** **4-5**	7-8 X 9	11-13 X 5-6	-
Taban Damar Kalınlığı (µm)	**80-70**	36-50	**60-80**	57-61	40-48	43-68	55

3.2 Yöntem

3.2.1 Primer Dizayn: PZR'de kullanılacak primerler, NCBI Gen Bankası'ndaki diziler kullanılarak belirlendi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri

Gen Adı	Primer Adı	Nükleotid Sekansı	Gen Uzunluğu (bp)	G-C İçeriği (%)
atpB-rbcL	atpB-1	5'-acatckartackggaccaataa-3'	550	
atpB-rbcL	rbcL-1	5'-aacaccagctttraatccaa-3'	550	35
rps4	rps5	5'-atgtcccgttatcgaggacct-3'	600	52,38
rps4	trnAS	5'-taccgagggttcgaatc-3'	600	52,94
psbA	501F	5'-tttctcagacggtatgcc-3'	1144	50
psbA	trnHR	5'-gaacgacgggaattgaac-3'	1144	50

3.2.2 Genomik DNA'nın Saflaştırılması: Genomik DNA'lar Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit ile saflaştırıldı ve bitkiler bistüri ile daha küçük parçalara ayrıldı. Numaralandırılmış ependorf tüpe alıp üzerine 350 µL LizBuffer A eklendi. Daha sonra Sonikasyon işlemine geçildi. MS 73 ve A.M. %75 şartları altında 10 saniyede bir 2-3 sn ara vermek şartı (kuru buz ile temas) ile toplam 1 dk olmak üzere ependorf tüpteki karışım işlem görmüştür. Bu işleme 1 dk ile sınırlı kalmayıp tüpteki karışımın en etkin düzeyde homojen hale gelmesi evresine kadar yaklaşık 3-4 dk devam edildi. Daha sonra karışıma 20 µL RNAase A ve 50 µL LizBuffer B eklendi ve 65ºC ayarlanmış su banyosunda 10 dk bekletildi. Bu süre içerisinde 2-3 dakikada bir Homojen bir süspansiyon elde etmek için vortexlendi. Bu işlemden sonra karışıma 130 µL Presipitation eklendi ve tüp 2-3 kez el ile çalkalanarak ve kuru buza koyup 5 dk bekletildi. Ardından 12.000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi ardından tüplerde oluşan süpernatant kısım, yeniden numara verilen steril ependorf tüpe alındı. Üzerine 400 µL Binding Solution ve 400 µL Etanol eklenerek 1-2 dk vortexlendi. Daha sonra bu karışım, maksimum 700 µL olacak şekilde GeneJET genomik DNA purifikasyon kolonuna transfer edilerek 8.000 RPM'de 1 dk santrifüj edildi. Kolonların altında kalan sıvılar Elüsyon Buffer eklenene kadar her santrifüj işleminden sonra döküldü. Yine kalan karışım kolonlara eklenerek 8.000 RPM'de 1 dk santrifüj edilir ve kolon altında kalan sıvı dökülür. Sonra 500 µL Wash Buffer I eklendi ve 10.000

RPM'de 1 dk santrifüj edildi, kolon altında kalan sıvı döküldü. Ardından 500 µL Wash Buffer II eklendi ve 14.000 RPM'de 3 dk santrifüj edildi, kolon altında kalan sıvı döküldü. Bu işlemden sonra kolonun altında kalan ependorf tüpler değiştirildi ve 25 µL Elüsyon Buffer, tam beyaz noktaya gelecek şekilde eklendi, 5 dk bekledikten sonra 8.000 RPM'de 1 dk santrifüj edildi. Bu kez kolonun altındaki sıvı dökülmeden bu işlem bir kez daha tekrar edildi ve karışıma numara verilmiş, steril ependorf tüpe alınarak 20ºC'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi: Elektroforez işlemi agaroz jel düzeneğinde (Thermo Scientific) yatay olarak gerçekleştirildi. Genomik DNA için %0.8'lik jel, TAE (Ek 2) tamponunda hazırlandı. DNA örnekleri 10X DNA yükleme boyası (Thermo Scientific) ile birlikte jele yüklendi. DNA bantlarının moleküler ağırlıkları 1 kb DNA cetveli (Thermo Scientific, Ek 3) kullanılarak belirlendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 90 Volt elektrik akımında 50 dakika yürütüldü. Yürütme işleminin ardından agaroz jel etidyum bromür çözeltisi (10 µg/mL, TAE tamponu) ile boyandı. DNA bantları UV lambası (Vilber Lourmat) ile görüntülendi.

3.2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Bitkilerin moleküler olarak tür doğrulamasını yapmak için *psbA*, *atpB-rbcL* ve *rps4* genleri PZR ile çoğaltıldı. PZR karışımı, 1X PZR tamponu (Fermantas), 5 µL Buffer, 5 µL $MgCl_2$ (Fermantas), 1 mM dNTP karışımı (Fermantas), 1 µL ileri ve geri primer, 1 µL *Taq* DNA polimeraz (Fermantas) hariç, 10 µL kalıp DNA ile hazırlandı. Karışımın toplam hacmi dH_2O ile 50 µL'ye tamamlandı. Başlangıç denatürasyon aşaması süresi *Weissia* türlerinde G-C oranının yüksek olduğu düşünüldüğü için 3 dakikadan 15 dakikaya yükseltildi. Son 3 dakika kala 1 µL *Taq* DNA polimeraz (Fermantas), PZR tüplerine hızlıca eklenmiştir.

PZR'de kullanılan primerler ve ürün boyutu Çizelge 3.2'de gösterilmişti. İlgili genlerin (*psbA*, *atpB-rbcL* ve *rps4*) çoğaltılması için kullanılan primerler ve PZR koşulları Çizelge 3.3'de gösterildi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve -20ºC'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3 Örnek bir PZR primer tablosu

PZR ürünü	Kullanılan Primer	PZR Koşulları (40 döngü)
psbA	501F ve trnHR	✓ Başlangıç denatürasyonu: 94°C'de 15 dakika ✓ Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika ✓ Primer bağlanma: 50°C'de 1 dakika ✓ Uzama: 72°C'de 1.30 dakika ✓ Son uzama: 72°C'de 10 dakika
atpB-rbcL	atpb-1 ve rbcL-1	✓ Başlangıç denatürasyonu: 94°C'de 15 dakika ✓ Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika ✓ Primer bağlanma: 50°C'de 1 dakika ✓ Uzama: 72°C'de 1 dakika ✓ Son uzama: 72°C'de 10 dakika
rps4	rps5 ve trnAS	✓ Başlangıç denatürasyonu: 94°C'de 15 dakika ✓ Denatürasyon: 94°C'de 1 dakika ✓ Primer bağlanma: 50°C'de 1 dakika ✓ Uzama: 72°C'de 1.30 dakika ✓ Son uzama: 72°C'de 10 dakika

3.2.5 Jel Ekstraksiyon: İstenen DNA bantları agaroz jelden Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit ile ekstrakte edildi. Jel kesitine tüplerin ağırlığı oranında Bindig Buffer eklenip jel tamamen çözünene kadar 50-60 °C'de su banyosunda inkübe edildi. Jel çözeltisi GeneJET purifikasyon kolonuna eklendi ve 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Purifikasyon kolonuna 100 µL Bindig Buffer 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra kolona 700 µL Wash Buffer eklenerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar hiçbir malzeme eklenmeden 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve kolon altındaki sıvı faz her aşamada dökülerek ilerlendi. Bu aşamada kolon altındaki tüpler değiştirilerek kolonun merkezine toplam 50 µL elüsyon tamponu iki seferde eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Jel ekstraksiyon işlemi bittikten sonra ürünler %0,8'lik agaroz jelde 100 voltta 20 dakika yürütüldü ve -20^{o}C'de muhafaza edildi.

3.2.6 DNA dizilerinin elde edilmesi ve biyoinformatik analizler: Jel ekstraksiyonu ile elde edilen örneklerin nükleotit dizileri Sanger zincir sonlandırma yöntemine göre elde edildi. Nükleotit dizileri Chromas (https://technelysium.com.au/wp/chromas) programı ile görüntülendi. Daha önceden elde edilen ilgili nükleotit dizileri NCBI

GenBankasından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore) alındı. Elde edilen nükleotit dizilerinin benzerlikleri BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) programında "nucleotide" seçeneği kullanılarak karşılaştırıldı.

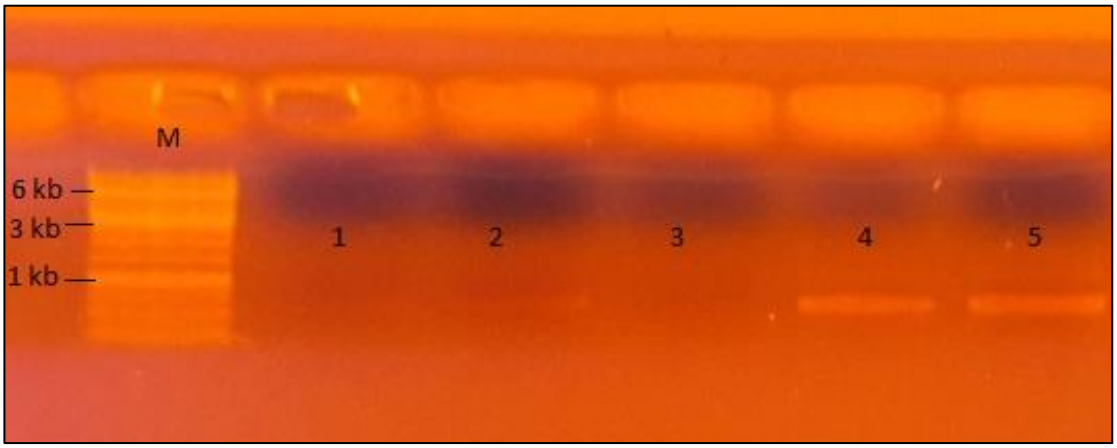
Filogenetik analizler MEGAX programıyla (https://www.megasoftware.net) yapıldı. Bunun için öncelikle, elde edilen ve GenBankasından alınan nükleotit dizileri ClustalW algoritması kullanılarak çoklu hizalama yapıldı. Hizalaması yapılan dizilerle Neighbour Joining yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu.

4. BULGULAR

Laboratuvar ortamında yapılan analizlerden sonra DNA dizilerini elde edebilmek amacı ile bitki örnekleri ilk olarak Atlas Biyoteknoloji Laboratuvar Malzemeleri San. Tic. Ltd. Şti. firmasına gönderildi. Firma *Weissia rutilans, W. condensa, W. wilsonii, W. brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri ile çalışmış ancak en iyi diziyi *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* taksonlarında sağlayabilmiştir. Daha sonra *Weissia rutilans, W. wilsonii, W. controversa* örnekleri laboratuvar ortamında tekrar analiz edildi ve bu kez farklı bir firma (Seha Medikal) ile çalışıldı ancak herhangi bir sonuç elde edilmedi. Bu nedenle filogenetik yönden yapılan değerlendirmeler *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* üzerinden ele alınmıştır.

4.1 *rps4* geni örnekleri için jel ekstraksiyon ve dizi analizleri

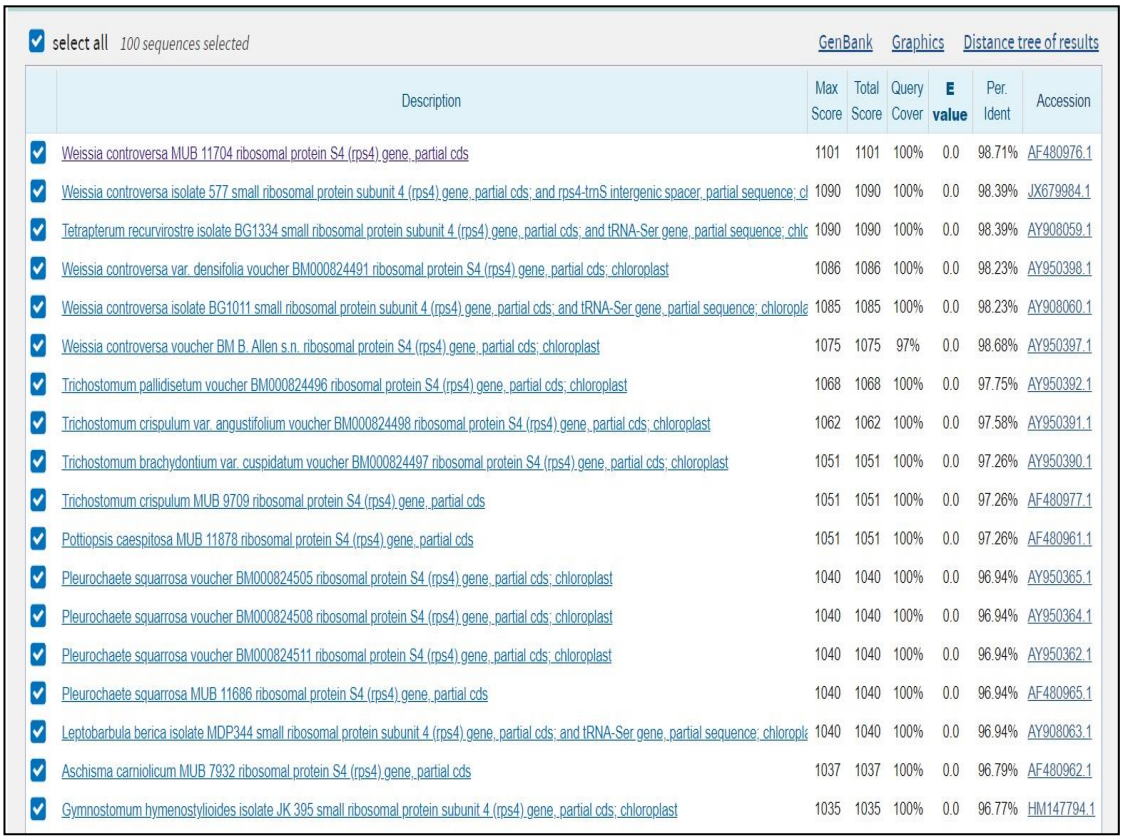
4. ve 5. kuyucuklarda net bantlar elde edilirken 1. ve 2. bantlar yoğunluk olarak daha zayıf kalmıştır ve 3. kuyucukta hiç bant elde edilememiştir (Şekil 4.1). Bu laboratuvar çalışması Atlas Biyoteknoloji Laboratuvar Malzemeleri San. Tic. Ltd. Şti. firmasına gönderilmiş ve en iyi dizileme sonucu 4. ve 5. örneklerden elde edilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.1 *rps4* geni gel extraction görünümü (M: 1kb gen marker, 1,2,3,4,5 PZR ürünü; sıra ile *Weissia rutilans, W. condensa, W. wilsonii, W. brachycarpa ve W. controversa* var. *crispata* örnekleri)

TACGCCGTTTAGGAACTTTACCAGGACTAAGCAATAAAACACCCCAT
TTAAAATCTAGTTCCACTAATCAATCAAGTTCTAATAAAAAAATTTCT
CAGTATCGCATTCGTTTAGAAGAGAAGCAAAAATTGCGTTTTCATTAC
GGAATAACAGAAAGACAATTACTAAATTATGTACGTATTGCTAGAAA
AGCAAAAGGATCAACAGGGCTAATTTTATTACAATTATTAGAAATGC
GCTTAGATAATGTTATTTTTCGATTAGGTATGGCTCCTACAATTCCTG
GAGCAAGACAATTAGTAAATCATAGACATATTTTAGTAAATAATCGC
ATAGTAAATATTCCAAGTTACCGTTGTAAACCTCAGGATTTTATTACT
ATAAAAAATCGGCAAAAATCTCAAGTTATGGTTACTAAAAATGTCGA
TTTTTCTCAAAAATCTAAAATACCAAATCATTTAACTTTTAATTCTTTA
GAAAAAAAGGGACTAGTTAATCAGATATTAGATCAAGAATCAATTGG
TTTAAAAATAAATGAATTGTTAGTTGTAGTATATGGTTCTCGTCAAGC
CTAACTAAAAAATAAAAAAAGAGTTAATTTTTTATATATGATAAAATT
T

Şekil 4.2 *rps4* geni *Weissia brachycarpa* türü DNA dizisi



select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Weissia controversa MUB 11704 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds	1101	1101	100%	0.0	98.71%	AF480976.1
Weissia controversa isolate 577 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; and rps4-trnS intergenic spacer, partial sequence; cl	1090	1090	100%	0.0	98.39%	JX679984.1
Tetrapterum recurvirostre isolate BG1334 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; and tRNA-Ser gene, partial sequence; chlc	1090	1090	100%	0.0	98.39%	AY908059.1
Weissia controversa var. densifolia voucher BM000824491 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1086	1086	100%	0.0	98.23%	AY950398.1
Weissia controversa isolate BG1011 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; and tRNA-Ser gene, partial sequence; chloropla	1085	1085	100%	0.0	98.23%	AY908060.1
Weissia controversa voucher BM B. Allen s.n. ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1075	1075	97%	0.0	98.68%	AY950397.1
Trichostomum pallidisetum voucher BM000824496 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1068	1068	100%	0.0	97.75%	AY950392.1
Trichostomum crispulum var. angustifolium voucher BM000824498 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1062	1062	100%	0.0	97.58%	AY950391.1
Trichostomum brachydontium var. cuspidatum voucher BM000824497 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1051	1051	100%	0.0	97.26%	AY950390.1
Trichostomum crispulum MUB 9709 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds	1051	1051	100%	0.0	97.26%	AF480977.1
Pottiopsis caespitosa MUB 11878 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds	1051	1051	100%	0.0	97.26%	AF480961.1
Pleurochaete squarrosa voucher BM000824505 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1040	1040	100%	0.0	96.94%	AY950365.1
Pleurochaete squarrosa voucher BM000824508 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1040	1040	100%	0.0	96.94%	AY950364.1
Pleurochaete squarrosa voucher BM000824511 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1040	1040	100%	0.0	96.94%	AY950362.1
Pleurochaete squarrosa MUB 11686 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds	1040	1040	100%	0.0	96.94%	AF480965.1
Leptobarbula berica isolate MDP344 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; and tRNA-Ser gene, partial sequence; chloropl	1040	1040	100%	0.0	96.94%	AY908063.1
Aschisma carniolicum MUB 7932 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds	1037	1037	100%	0.0	96.79%	AF480962.1
Gymnostomum hymenostylioides isolate JK 395 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	1035	1035	100%	0.0	96.77%	HM147794.1

Şekil 4.3 *rps4* geni *Weissia brachycarpa* türü nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları

Weissia brachycarpa'ya ait GenBankasında dizi bulunmadığı için elde edilen dizi BLAST sonucunda *W. controversa* dizileri ile eşleşiyor (Şekil 4.3).

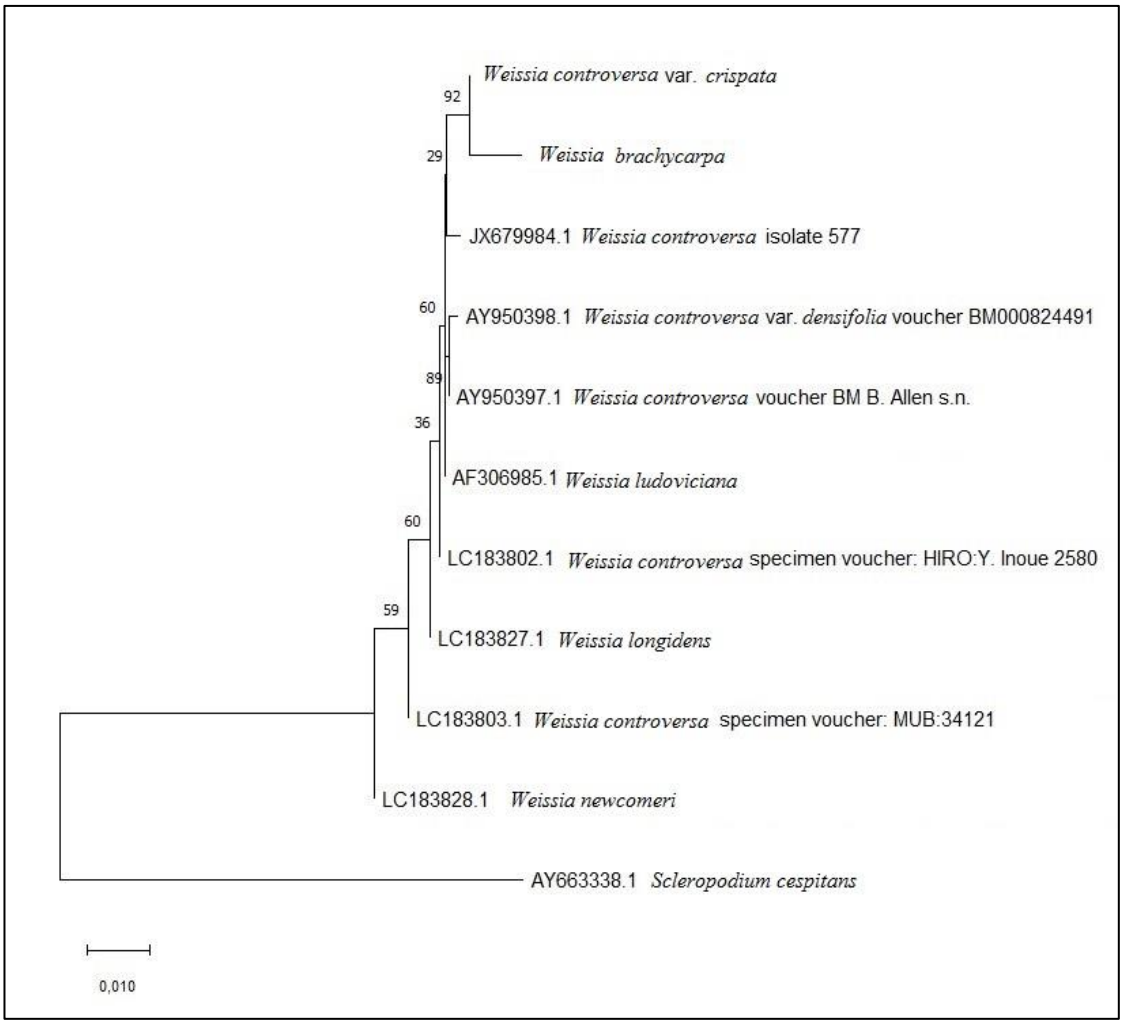
GCCGTTTAGGAACTTTACCAGGACTAAGCAATAAAACACCCCATTTAA
AATCTAGTTCCACTAATCAATCAAGTTCTAATAAAAAAATTTCTCAGTA
TCGCATTCGTTTAGAAGAGAAGCAAAAATTGCGTTTTCATTACGGAAT
AACAGAAAGACAATTACTAAATTATGTACGTATTGCTAGAAAAGCAAA
AGGATCAACAGGGCTAATTTTATTACAATTATTAGAAATGCGCTTAGA
TAATGTTATTTTTCGATTAGGTATGGCTCCTACAATTCCTGGAGCAAGA
CAATTAGTAAATCATAGACATATTTTAGTAAATAATAGCATAGTAAAT
ATTCCAAGTTACCGTTGTAAACCTCAGGATTTTATTACTATAAAAAATC
GGCAAAAATCTCAAGTTATGATTACTAAAAATGTAGATTTTTCTCAAA
AATCTAAAATACCAAATCATTTAACTTTTAATTCTTT

Şekil 4.4 *rps4* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü DNA dizisi

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Weissia exserta chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	867	867	100%	0.0	99.79%	LC176285.1
Weissia controversa chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	867	867	100%	0.0	99.79%	LC176284.1
Weissia controversa isolate 577 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; and rps4-trnS intergenic spacer, partial sequence; cl	867	867	100%	0.0	99.79%	JX679984.1
Weissia controversa MUB 11704 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds	867	867	100%	0.0	99.79%	AF480976.1
Weissia controversa isolate BG1011 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; and tRNA-Ser gene, partial sequence; chloropla	867	867	100%	0.0	99.79%	AY908060.1
Weissia ludoviciana ribosomal protein 4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast gene for chloroplast product	863	863	99%	0.0	99.79%	AF306985.1
Weissia longidens chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	861	861	100%	0.0	99.58%	LC183827.1
Weissia sp. YI1493 chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	861	861	100%	0.0	99.58%	LC183805.1
Weissia controversa chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds, specimen_voucher: MUB:34121	861	861	100%	0.0	99.58%	LC183803.1
Weissia controversa var. densifolia voucher BM000824491 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	861	861	100%	0.0	99.58%	AY950398.1
Tetrapterum recurvirostre isolate BG1334 small ribosomal protein subunit 4 (rps4) gene, partial cds; and tRNA-Ser gene, partial sequence; chlc	861	861	100%	0.0	99.58%	AY908059.1
Weissia sp. YI3169 chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	856	856	100%	0.0	99.36%	LC183810.1
Weissia sp. YI2606 chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	856	856	100%	0.0	99.36%	LC183808.1
Weissia condensa chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	856	856	100%	0.0	99.36%	LC183797.1
Trachycarpidium lonchophyllum chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	856	856	100%	0.0	99.36%	LC183796.1
Weissia newcomeri chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	852	852	99%	0.0	99.36%	LC183828.1
Pottiopsis caespitosa chloroplast rps4 gene for ribosomal protein S4, complete cds	850	850	100%	0.0	99.15%	LC176275.1
Trichostomum pallidisetum voucher BM000824496 ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	850	850	100%	0.0	99.15%	AY950392.1
Weissia controversa voucher BM B. Allen s.n. ribosomal protein S4 (rps4) gene, partial cds; chloroplast	846	846	97%	0.0	99.78%	AY950397.1

Şekil 4.5 *rps4* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları

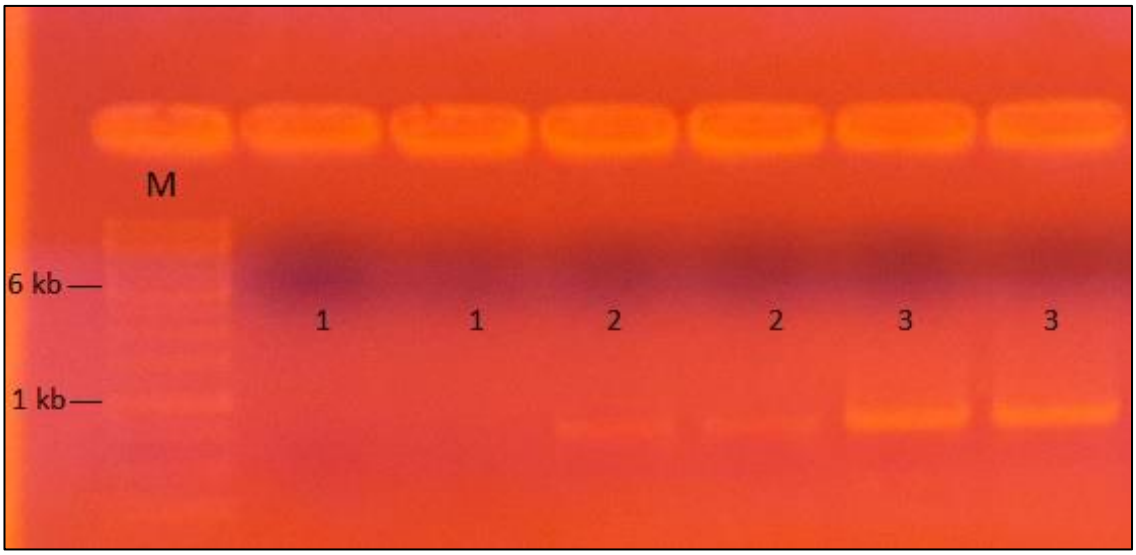


Şekil 4.6 *rps4* geninde *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri arasındaki filogenetik ilişki

Weissia cinsi için *rps4* genine bağlı yapılan filogenetik analizde farklı türlerin yakın dallarda, aynı türlerin de farklı dallarda yer alması, bu genin türler arası ayırımı (rezolüsyonu) yeterince sağlamadığını göstermektedir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

4.2 *psbA* geni örnekleri için jel ekstraksiyon ve dizi analizleri

Örnek miktarları fazla olduğu için ikiye bölünerek kuyucuklara yüklenmiştir (Şekil 4.7). Atlas Biyoteknoloji Laboratuvar Malzemeleri San. Tic. Ltd. Şti. firmasına gönderilen bu örneklerden de en iyi dizileme sonucu (Şekil 4.8) 2. ve 3. örneklerden elde edilmiştir.



Şekil 4.7 *psbA* geni gel extraction görünümü (M: 1kb gen marker, 1,2,3 PZR ürünü; sıra ile *Weissia rutilans, W. brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri

TCATGATTGTGTTCCAAGCTGAACATAACATCCTTATGCACCCATTCCACAT
GCTTGGTGTAGCTGGTGTATTCGGCGGCTCTCTATTCAGTGCTATGCATGGT
TCCTTGGTAACTTCAAGTTTAATCCGAGAAACTACTGAGAACGAATCTGCTA
ACGCAGGTTACAAGTTTGGTCAAGAAGAAGAAACTTACAACATCGTAGCTG
CTCACGGTTACTTTGGTAGACTTATCTTCCAATATGCTAGCTTTAACAACTCT
CGTTCTTTACACTTCTTTTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGTTTAC
TGCATTAGGTATCAGCACAATGGCTTTCAACCTAAATGGTTTTAACTTTAAC
CAATCAGTTGTTGACAGTCAAGGTCGTGTAATTAACACTTGGGCTGATATTA
TCAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACGTAATGCTCATAA
CTTCCCTCTAGATTTAGCTTCTGTTGAAGCTCCTTCTGTAAACGGTTAATATT
TTA

Şekil 4.8 *psbA* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü DNA dizisi



select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Weissia multicapsularis photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, partial cds; and psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; chloro	970	970	100%	0.0	100.00%	MH545572.1
Weissia longifolia var. angustifolia photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence;	970	970	100%	0.0	100.00%	MH545571.1
Weissia sterilis photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His gene	959	959	99%	0.0	99.81%	MH545573.1
Pseudocrossidium replicatum strain PS1, complete genome	926	926	100%	0.0	98.48%	MG132071.1
Syntrichia ruralis chloroplast, complete genome	926	926	100%	0.0	98.48%	FJ546412.1
Pyrrhobryum vallis-gratiae trnK-psbA intergenic spacer, partial sequence; photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, complete cds; and psb	887	887	100%	0.0	96.95%	AY312917.1
Hedwigia ciliata trnK-psbA intergenic spacer, partial sequence; photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, complete cds; psbA-trnH interger	887	887	100%	0.0	97.14%	AY312905.1
Fissidens nobilis isolate KBDI00015 chloroplast, complete genome	881	881	100%	0.0	96.95%	NC_044155.1
Fissidens nobilis isolate KBDI00015 chloroplast, complete genome	881	881	100%	0.0	96.95%	MK876184.1
Tetraplodon mnioides trnK-psbA intergenic spacer, partial sequence; photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, complete cds; psbA-trnH in	881	881	100%	0.0	96.95%	AY312922.1

Şekil 4.9 *psbA* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları

Bu tür; reverse (geri) primer analizi iyi durumda olmadığı için yalnızca forward (ileri) primer ile çalışılmıştır (BLAST yapılmıştır). GenBank'ta *Weissia controversa* var. *crispata* türü için *psbA* geninde çalışılmış herhangi bir araştırma verisi bulunmadığı için yapılan BLAST karşılaştırmasında yüksek oranda uyumluluk gösterdiği türler *Weissia wilsonii*, *Weissia longifolia* var. *angustifolia* (Baumgartner) A.C. Crundwell & Nyholm ve *Weissia sterilis* W.E. Nicholson olarak görülmektedir (Şekil 4.9). Bu doğrultuda moleküler ve morfolojik yönden analiz ettiğimiz bitki türünün en azından cins düzeyinde doğru teşhis edildiği anlaşılmaktadır.

ACTTCATGATTGTGTTCCAAGCTGAACATAACATCCTTATGCACCCATTCCA
CATGCTTGGTGTAGCTGGTGTATTCGGCGGCTCTCTATTCAG**T**GCTATGCAT
GGTTCCTTGGTAACTTCAAGTTTAATCCGAGAAACTACTGAGAACGAATCTG
CTAACGCAGGTTACAAGTTTGGTCAAGAAGAAGAAACTTACAACATCGTAG
CTGCTCACGGTTACTTTGGTAGACTTATCTTCCAATATGCTAGCTTTAACAA
CTCTCGTTCTTTACACTTCTTTTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGTATCTGGT
TTACTGCATTAGGTATCAGCACAATGGCTTTCAACCTAAATGGTTTTAACTT
TAACCAATCA**G**TTGTTGACAGTCAAGGTCGTGTAATTAACACTTGGGCTGAT
ATTA

Şekil 4.10 *psbA* geni *Weissia brachycarpa* türü DNA dizisi

95. ve 375. bazlarda karmaşık bir yapı görülmüştür. Bu durumun sebebi heterozigot yapı ya da analiz hatası olabilmektedir. 95. bazda bazı allellerden C, bazı allellerden ise T bazı gelmiştir. Heterozigot yapı olduğu düşünülerek BLAST karşılaştırmalarında 95. baz için farklı cinslerde karşılık gelen bazlara bakıldığında T bazı olarak düzeltilmesi gerektiğine karar verilmiştir. Benzer bir durum 375. Bazda da görülmüştür ve G bazı olarak düzeltilmiştir (Şekil 4.10). Yapılan düzeltmelerden sonra tekrar BLAST karşılaştırmalarında; bizim elde ettiğimiz dizilerin dışında kalan dizilerden tür düzeyinde tanımlamalar yapıldığı için bizim çalışmamızda tür düzeyinde bir ayrım yapılamamıştır. Bu durumda *psbA* geni moleküler düzeyde rezolusyonu iyi sağlayamıyor şeklinde yorumlayabiliriz.

Diğer bir taraftan ise; *psbA* 1144 bp uzunlukta bir bazdır ancak yaptığımız analizlerde yalnızca 466 bp elde edilmiştir. Bu nedenle elde edilen kısım tüm *Weissia* sp. türlerinde belki ortaktır ve türler arası asıl ayrımı sağlayacak kısım elde edilmeyen baz kısmında olabilir.

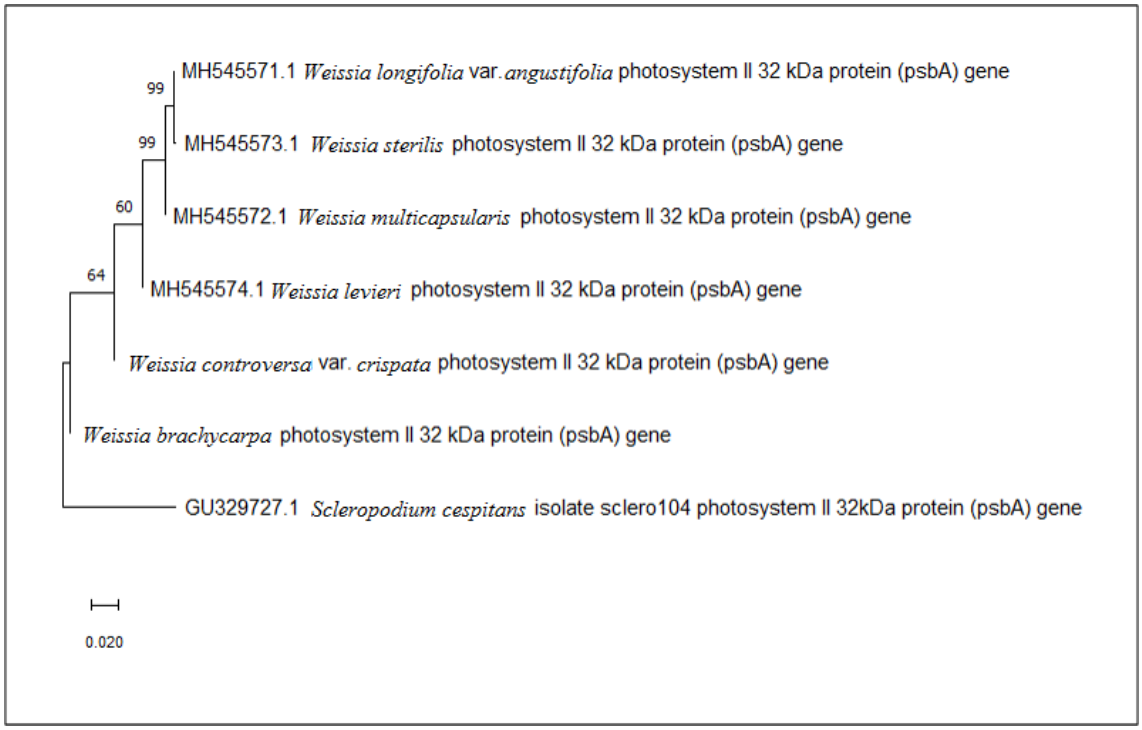


select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Weissia multicapsularis photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, partial cds; and psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; chloro	776	776	100%	0.0	100.00%	MH545572.1
Weissia longifolia var. angustifolia photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence;	776	776	100%	0.0	100.00%	MH545571.1
Weissia sterilis photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH intergenic spacer, complete sequence; and tRNA-His gene	760	760	98%	0.0	99.76%	MH545573.1
Pseudocrossidium replicatum strain PS1, complete genome	749	749	100%	0.0	98.81%	MG132071.1
Syntrichia ruralis chloroplast, complete genome	743	743	100%	0.0	98.57%	FJ546412.1
Hedwigia ciliata trnK-psbA intergenic spacer, partial sequence; photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, complete cds; psbA-trnH interger	708	708	99%	0.0	97.36%	AY312905.1
Pyrrhobryum vallis-gratiae trnK-psbA intergenic spacer, partial sequence; photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, complete cds; and psb	702	702	98%	0.0	97.09%	AY312917.1
Tetraplodon mnioides trnK-psbA intergenic spacer, partial sequence; photosystem II 32 kDa protein (psbA) gene, complete cds; psbA-trnH in	701	701	98%	0.0	97.11%	AY312922.1
Bryum capillare photosystem II protein gene, complete cds, chloroplast gene for chloroplast product	701	701	98%	0.0	97.11%	AY163129.1
Bryum algovicum photosystem II protein gene, complete cds; chloroplast gene for chloroplast product	701	701	98%	0.0	97.11%	AY163124.1

Şekil 4.11 *psbA* geni *Weissia brachycarpa* türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları

GenBank'ta *Weissia brachycarpa* türü için *psbA* geninde çalışılmış herhangi bir araştırma verisi bulunmadığı için yapılan BLAST karşılaştırmasında yüksek oranda uyumluluk gösterdiği türler *Weissia wilsonii*, *W. longifolia* var. *angustifolia* ve *W. sterilis* olarak görülmektedir (Şekil 4.11). Bu doğrultuda moleküler ve morfolojik yönden analiz ettiğimiz bitki türünün en azından cins düzeyinde doğru teşhis edildiği anlaşılmaktadır.

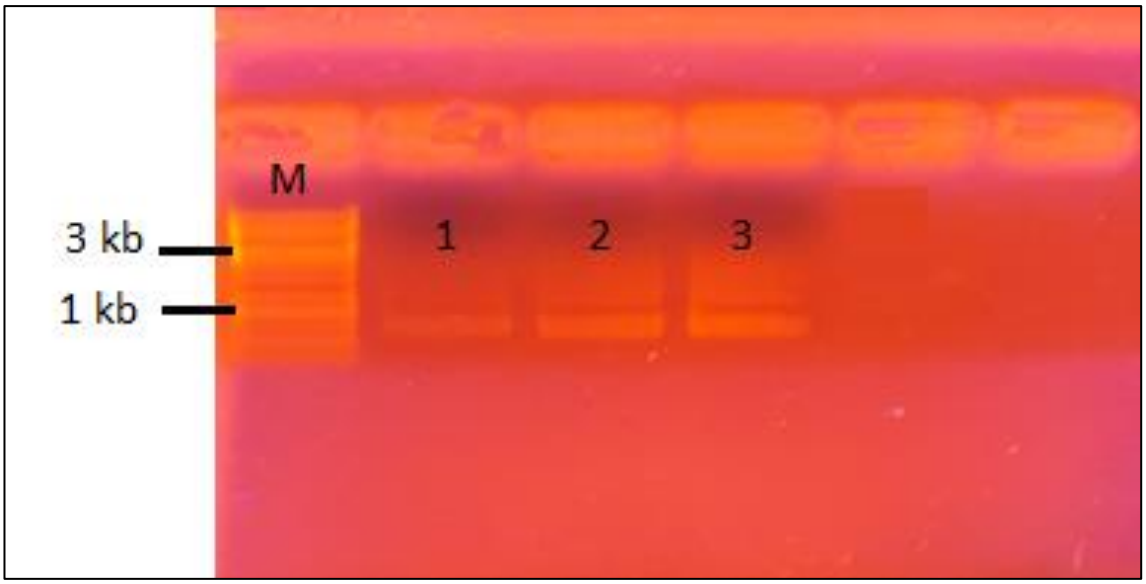


Şekil 4.12 *psbA* geninde *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri arasındaki filogenetik ilişki

GenBank'ta *psbA* geninde çalışma bulunduğu için *Scleropodium cespitans* (Müll. Hal.) L.F. Koch türü dış grup olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).

4.3 *atpB-rbcL* geni örnekleri için jel ekstraksiyon ve dizi analizleri

Bu laboratuvar çalışması Atlas Biyoteknoloji Laboratuvar Malzemeleri San. Tic. Ltd. Şti. firmasına gönderildi.



Şekil 4.13 *atpB-rbcL* geni gel extraction görünümü (M: 1kb gen marker, 1,2,3 PZR ürünü; sıra ile *Weissia condensa, W. brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri)

Weissia condensa yeterli yoğunlukta bir bant oluştursa da dizileme için gönderilen firmada reverse primer oluşturulamadığı için çalışmaya dâhil edilmemiştir (Şekil 4.13).

ATTTTTAACAATAAGTGTAGAAGTCCCAAAAGTACGATAATTTGTTTTCATA
AAATTTAGAAATAATAAAATTAATTATGGATTGTATTGAAAAAATATTTAGT
ATCAACTCGATCATTTAATTATTAAATAAAAAAAATTATTTTCAATTTATTA
TTTTTTATAAAAATAAATAAAATAAAAAAATTAAAAGTTGTAATAAACAAA
GCTTTTTTGTAATATAAAGTTATTAGTAAATAATTTTTTTTTTTAATTAAAAT
TTTTTTTTACTATTTTTTAATTAAAATTTTTTTTTATTAATTAGTTTAACATTT
GAAAGATTAATAGGTCAATGCTTGAA**R**AATAAAAACAATCTACTACAAAAA
AAGATTCTGAGTTGCATCAAATATAAAAAATAATATACAATGATACTGTTTT
GTTATAGAAAAATTACTGTGTCTAGTTTTAGACAAAATTAAATATTAAAATT
TTTTTTTTTTTTATTTTCTCGAGTAGACCTCATCTTTGCAAGAATGATTAATT
GAGTTGTAGGGAGGTACCTAT

Şekil 4.14 *atpB-rbcL* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü DNA dizisi

341. bazda heterozigotluk görülmüştür ve hem A hem G bazı geldiği için heterozigotluk terimleri gereği R olarak nitelendirilmiştir (Şekil 4.14).

select all *100 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Weissia controversa var. densifolia voucher BM000824491 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequer	987	987	100%	0.0	99.45%	AY950352.1
Weissia controversa voucher BM B. Allen s.n. ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and ribul	965	965	100%	0.0	98.72%	AY950351.1
Trichostomum brachydontium voucher Cano 6745 (MUB) ATP synthase beta (atpB) gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete se	928	928	100%	0.0	97.61%	KT380199.1
Trichostomum brachydontium var. cuspidatum voucher BM000824497 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, comp	911	911	99%	0.0	97.05%	AY950345.1
Weissia condensa voucher Cano 6227 (MUB) ATP synthase beta (atpB) gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; ar	902	902	100%	0.0	96.88%	KT380181.1
Pleurochaete squarrosa voucher GOET B. Allen 22346 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence;	893	893	100%	0.0	96.50%	AY950326.1
Pleurochaete squarrosa voucher BM000824502 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and rib	893	893	100%	0.0	96.50%	AY950318.1
Pleurochaete squarrosa voucher BM000824509 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and rib	887	887	100%	0.0	96.32%	AY950323.1
Pleurochaete squarrosa voucher BM000824504 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and rib	883	883	99%	0.0	96.30%	AY950321.1
Trichostomum crispulum isolate P142 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and ribulose-1,5-	881	881	96%	0.0	97.14%	KM020532.1

Şekil 4.15 *atpB-rbcL* geni *Weissia controversa* var. *crispata* türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları

Weissia controversa var. *crispata*'ya ait GenBankasında dizi bulunmadığı için elde edilen dizi BLAST sonucunda *W. controversa* dizileri ile eşleşiyor (Şekil 4.15).

ATTTTTAACAATAAGTGTAGAAGTCCCAAAAGTACGATAATTTGTTTTCATA
AAATTTAGAAATAATAAAATTAATTATGGATTGTATTGAAAAAATATTTAGT
ATCAACTCGATCATTTAATTATTAAATAAAAAAAATTATTTTCAATTTATTA
TTTTTTATAAAAATAAATAAAATAAAAAAATTAAAAGTTGTAATAAACAAA
GCTTTTTTGTAATATAAAGTTATTAGTAAATAATTTTTTTTTTTAATTAAAAA
TTTTTTTTACTATTTTTTAATTAAAATTTTTTTTTATTAATTAGTTTAACATTT
GAAAGATTAATAGGTCAATGCTTGAAGAATAAAAACAATCTACTACAAAAA
AAGATTCTGAGTTGCATCAAATATAAAAAATAATATACAATGATACTGTTTT
GTTATAGAAAAATTACTGGGTCTAGTTTTAGACGAAATTAAATATTAAAATT
TTTTTTTTTTTTATTTTCTCGGGTAGACCTCTTCTTTGCAAGAATGGTATTTGG
GGGTGGGGGGGGGGGGCCTCTTTTGTCATTAATTGAGTGTAGGGAGGGACC
T

Şekil 4. 16 *atpB-rbcL* geni *Weissia brachycarpa* türü DNA dizisi

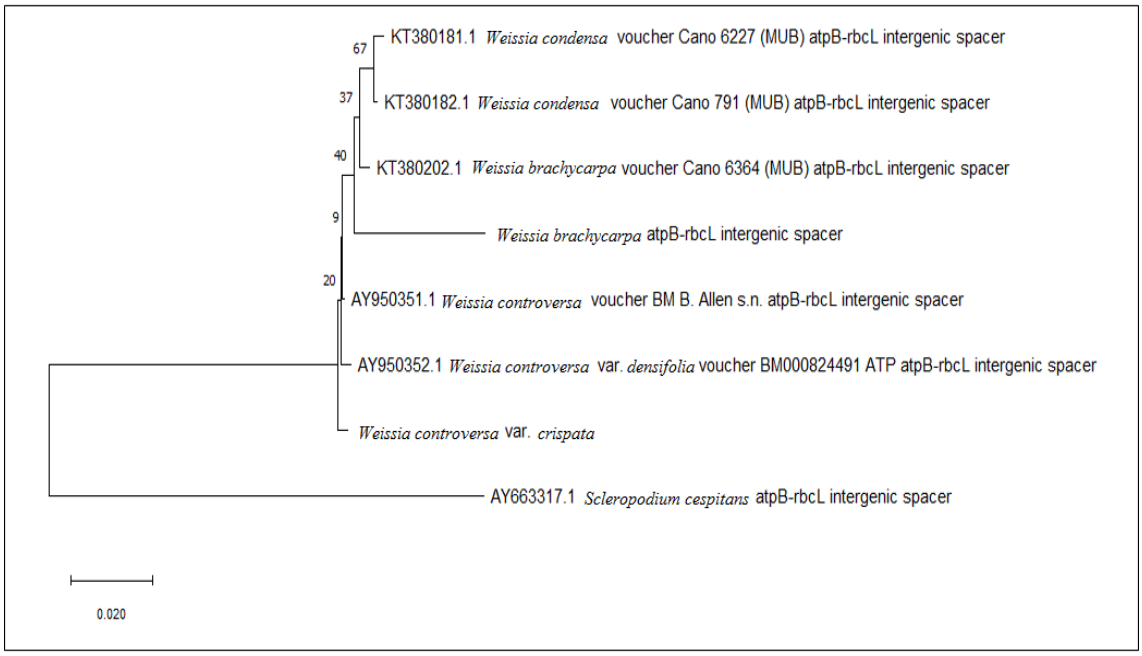


select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Weissia controversa var. densifolia voucher BM000824491 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequer	918	918	89%	0.0	98.83%	AY950352.1
Weissia controversa voucher BM B. Allen s.n. ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and ribul	907	907	89%	0.0	98.45%	AY950351.1
Trichostomum brachydontium voucher Cano 6745 (MUB) ATP synthase beta (atpB) gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete se	848	848	89%	0.0	96.51%	KT380199.1
Weissia condensa voucher Cano 6227 (MUB) ATP synthase beta (atpB) gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; ar	845	845	89%	0.0	96.51%	KT380181.1
Weissia condensa voucher Cano 791 (MUB) ATP synthase beta (atpB) gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and	833	833	89%	0.0	95.92%	KT380182.1
Trichostomum crispulum isolate P142 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and ribulose-1.5-	832	832	89%	0.0	95.93%	KM020532.1
Trichostomum brachydontium var. cuspidatum voucher BM000824497 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, comp	832	832	89%	0.0	95.92%	AY950345.1
Tortella bambergeri isolate P151 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and ribulose-1.5-bisph	813	813	89%	0.0	95.36%	KM020507.1
Tortella bambergeri isolate P130 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence; and ribulose-1.5-bisph	813	813	89%	0.0	95.35%	KM020504.1
Pleurochaete squarrosa voucher GOET B. Allen 22346 ATP synthase beta gene, partial cds; atpB-rbcL intergenic spacer, complete sequence;	813	813	89%	0.0	95.34%	AY950326.1

Şekil 4.17 *atpB-rbcL* geni *Weissia brachycarpa* türü Nükleotit dizisi BLAST sonucu uyumluluk oranları

atpB-rbcL geni *Weissia brachycarpa* türünde GenBank'ta çalışma bulunmaktadır ve elde ettiğimiz dizi analizi doğrultusunda (Şekil 4.16) aynı zamanda morfolojik açıdan yapılan ayrımdan da emin olduğumuz için Şekil 4.17'de bulunan BLAST uyumluluk oranı doğrultusunda, *atpB-rbcL* geninin tür düzeyinde iyi bir tanımlama elde edemediğini söyleyebiliriz. Moleküler anlamda iyi bir teşhis değildir.



Şekil 4.18 *atpb-rbcL* geninde *Weissia brachycarpa* ve *W. controversa* var. *crispata* örnekleri arasındaki filogenetik ilişki

GenBank'ta *atpB-rbcL* geninde çalışma bulunduğu için *Scleropodium cespitans* türü dış grup olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18). *Weissia brachycarpa* türünün *Weissia controversa* var. *crispata*'dan uzak çıkması, evrimsel açıdan türleşme zamanlarındaki farklılığı ortaya koymaktadır. *Weissia controversa* var. *crispata* daha öncesinde *Weissia fallax* olarak bilinmekte idi. Farklı bir tür gibi nitelendirilirken şu an için *Weissia controversa* türünün bir varyetesi olarak belirtilmektedir. Bu durum da *Weissia controversa* var. *densifolia* (Bruch & Schimp.) Wilson ile yüksek oranda benzerlik göstermesi ile açıklanabilir (Şekil 4.17). GenBank'ta *atpB-rbcL* geninde *Weissia controversa* var. *crispata* ile ilgili çalışma bulunmadığı için tür düzeyinde bir ayrım yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki ıslah çalışmaları, gen kaynaklarının haritalanması ve korunması, sistematik uygulamalar ya da gen bankalarının oluşturulması gibi birçok kullanım alanına sahip moleküler markörlerin, bu uygulamaları etkin biçimde gerçekleştirmek için kattığı en önemli faktör genetik çeşitliliğin belirlenmesine imkân tanımasıdır (Velioğlu vd. 2003). Aynı zamanda DNA parmak izi çıkarılması gibi uygulamalar için kullanılarak genetik materyallerin teşhis ve kontrolünü sağlamaktadır. Böylece popülasyon genetiği, türlerin genetik ilişkileri, hastalıklara dayanıklı genotiplerin belirlenmesi gibi pek çok araştırma alanı için çeşitli fırsatlar sunmaktadır (Neale and Harry 1994). Biyokimyasal ve morfolojik markörlerin aksine DNA markörleri bitki büyüme evrelerinden ya da çevre koşullarından etkilenmemektedir. Dominant ya da kodominant özellikte olabilen bu markörler teorik olarak sınırsız sayıda kabul edilmektedir. Stabil olan DNA markörleri tüm dokularda ortaya çıkabilir (Yorgancılar vd. 2015).

Moleküler markör teknikleri, çalışmaların amaçlarına göre belirlenmiş herhangi bir doku parçasından alınan az miktarda DNA ile etkin sonuçlar elde etmeyi hedeflemektedir (Botstein *et al.* 1980). Bu amaç ile geliştirilmiş markörler, zamandan tasarruf etmeyi sağlayarak yapılacak araştırmalara önemli ölçüde katkı sağlamaktadır.

Her bir moleküler markör tekniği sahip olduğu avantaj ya da dezavantajlara göre tercih edilmektedir. Geliştirilen moleküler tekniklerin bazıları maliyet yönünden avantajlara sahip iken bazıları ise kullanım kolaylığı sağlayabilmektedir. Bazı teknikler ise kombin uygulamalara imkân tanıyarak bilimsel araştırmaları çok yönlü değerlendirme fırsatları sunmaktadır. Dolayısı ile moleküler markör teknikleri, araştırmacılar tarafından tercih edilmesi için geniş bir alan oluşturmaktadır. Bu bağlamda Çetinkaya ve Ayhan (2012)'a göre pek çok kurum ve kuruluşta moleküler tanımlama tekniklerini kullanarak yapılacak çalışmaların önünü açmak amacı ile moleküler mikrobiyoloji teknikleri üzerine çeşitli eğitimlerin verildiğini vurgulamışlardır.

Özellikle tohumsuz bitkiler sistematiği için büyük önem taşıyan bu teknikler klasik morfolojik ayırım yaklaşımından da uzak tutulmamalıdır (Goffinet *et al.* 2004). Günümüze kadar uzun yıllar çaba sarf edilerek gerçekleştirilmiş birçok canlı

sistematiğine yönelik çalışmanın temelini klasik morfolojik ayırım oluşturmaktadır. Bu nedenle gelişen teknoloji ile birlikte uygulama alanına sahip moleküler markör tekniklerin sağladığı çeşitli avantajları da göz önünde bulundurarak aynı zamanda morfolojik gözlemlerle elde edilen bilgilerin de değerlendirildiği çalışmalar daha etkin olacaktır.

Dünya'da ve ülkemizde tohumlu bitki türleri, böcekler ve hayvanlar moleküler araştırmalara konu edilmektedir. Ancak briyofitlerin moleküler düzeyde araştırıldığı çalışmalar ülkemizde henüz yaygın değildir. Dünya'da ise Japonya'da Inoue and Tsubota (2017) tarafından *Weissia* türleri ile ilgili bir araştırma bulunmaktadır. Çalışmada ülkemiz ile uyuşan tek tür *Weissia controversa*'dır. Bu nedenle kendi araştırmamıza göre yorumlamak ve herhangi etkin bir sonuç elde edebilmek zordur. Bitki yayılış alanları üzerindeki iklim etkisi, türlerdeki farklılıklara ve morfolojik ayırımlara neden olmaktadır. Bu doğrultuda moleküler düzeydeki araştırmalarda da farklılıklar meydana gelmektedir.

Bu çalışmada Türkiye'de yayılışa sahip ve daha önce moleküler yönden çalışılmamış *Weissia* türleri ile analizler yapılmıştır. Bitki küçük bir habitusa sahip olduğu için morfolojik yönden ayırt etmek zordur. Bu nedenle moleküler bir araştırmada etkin sonuç elde edebilmek hedeflenmiştir. Diğer taraftan araştırmaya konu edilecek türlerin GenBank'ta benzer ya da aynı gen bölgeleri ile çalışılmış örneklerinin olması elde edilen sonuçların karşılaştırılması açısından önem taşımaktadır. Bu sayede araştırma yorumları daha verimli olacaktır.

Çalışmadaki filogenetik analizlerde, evrimsel yönden *Weissia* taksonları arasındaki türleşmelerle ilgili çıkarımlar yapılmıştır. Sinonim bitki isimlendirmeleri ya da varyete bitki türleri özellikle türleşme konusunda bize fikir vermiştir. *Weissia fallax* türünün *Weissia controversa* var. *crispata* ile sinonim adlandırılması, yaptığımız filogenetik değerlendirme doğrultusunda daha önceden tür olarak kabul gören *Weissia fallax*'ın türleşmeye bağlı *Weissia controversa*'nın bir varyetesi olarak nitelendirildiğini düşünebiliriz. Yaptığımız çalışma kişisel koleksiyon örnekleri ile olduğu için buna net

cevap verebilmek zordur. Daha kapsamlı farklı bir araştırmada bitkilerin toplandığı alandaki *Weissia controversa* yoğunluğuna da bakılarak bu konu değerlendirilebilir.
Küçük bitki örnekleri ile yürütülen laboratuvar çalışmaları beraberinde hassas çalışma prensiplerini getirmektedir. Daha önce deneyimlenmemiş bir tür ve konu ile yapılan araştırmalar pek çok deney, sonuç ve gözleme açıktır. Bunun için zaman, bilgi birikimi ve etkin bir bütçe gerekmektedir. Bu nedenle yaptığımız çalışmada yeterli yoğunlukta bant elde edebilmek zaman zaman oldukça güç bir hal almıştır. Yapılan analizlerde karşılaşılaşılan zorlukların nedenlerinden biri de kişisel koleksiyon örnekleri ile çalışılmasıdır. Bu bağlamda Goffinet *et al.* (2004); genç bitki kısımları ile yapılacak araştırmalardan elde edilecek sonuçların daha etkin, verimli olabileceğini açıklamışlardır.

Bu bağlamda; moleküler markör tekniklerini anlamak ve daha verimli uygulayabilmek için kurumsal eğitimler düzenlenmeli, yetkin personel yetiştirmek için rotasyon çalışmaları yapılmalı, yapılacak bilimsel çalışmanın amacına uygun tekniklerin seçiminde hassas davranılmalı ve iyi bir literatür taraması yapıldıktan sonra geniş ölçekte düşünülerek (bitkiler ya da hayvanlar için yapılmış uygulamaları incelemek) karar verilmelidir. Laboratuvar koşullarını denetleyici ve daha verimli araştırmalar ortaya koymayı amaçlayan kanuni düzenlemeler yapmak yerinde olacaktır.

KAYNAKLAR

Abay, G. 2006. Karayosunları (Musci)'nda spor ve protonema gelişimi. Tabiat ve İnsan, 1; 2-22.

Altun, Z.G. 2006. DNA işaretleyiciler (markör) ve Türkiye'de orman ağaçları ıslahında kullanımı. Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Yayınları, İzmir.

Arda, M. 1995. Biyoteknoloji (bazı temel ilkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara.

Başaran, A. 2004. Tıbbi biyoloji ders kitabı. Güneş & Nobel Tıp Kitapevleri, 7. Baskı, Bursa.

Batan, N. ve Özdemir, T. 2013. Contribution to the moss flora of Eastern Black Sea Region (Artvin) in Turkey and new record to the Southwest Asia. Arctoa, 22; 101-106.

Bayat, A.H. 2010. Tıp tarihi, Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği, İstanbul.

Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragmenth length polymorphisms, Am. J. of Human Genetic, 32; 314-331.

Brown, W.M., George, M.J.R. and Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., (76); 1967-71, USA.

Canlı, K. and Çetin, B., 2014. The Moss Flora of Akdal Mountain (Amasya, Turkey). The Scientific World Journal, 8.

Carter, B.E. 2012. Species delimitation and cryptic diversity in the moss genus *Scleropodium* (Brachytheciaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 63; 891-903.

Caterino, M.S., Cho, S. and Sperling, F.A.H. 2000. The current state of ınsect molecular systematics: a thriving tower of babel. Annual Review of Entomology, 45; 1–54.

Çetinkaya, E. ve Ayhan, K. 2012. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 2(1); 53-62.

Çetin, B. ve Yurdakulol, E. 1988. Yedigöller Milli Parkı'nın karayosunu florası. Doğa TU Botanik D.C. 12(2), 10.

Çevik, A.M. 1994. PCR ve infeksiyoz hastalıklarda kullanımı, Seminer, Ankara Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Bölümü.

Çolakoğlu, G. 1999. Tohumsuz bitkiler sistematiği kitabı, Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları; 428, İstanbul.

Diallo, I.O., Mackenzie, A.M., Spradbrow, P.B. and Robinson, W.F. 1998. Field isolates of fowl pox virus contaminated with reticuloendotheliosis virus. Avian Dis., 27; 60-66.

Efe, A. 1994. Botanikte İsimlendirme (Nomenklatür). İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi. B Serisi, 41(3-4), 62-68.

Eker, S. ve Kolören, O. 2017. Yabancı otların moleküler teşhisinde ribozomal RNA (rRNA) İnternal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgelerinin kullanımı. Ordu Üniv. Bil. Tek. Dergisi, 7(1); 11-21.

Erlich, A.H., Gelfand, D. and Sninsky, J.J. 1991. Recent advantages in PCR. Science, 252; 1643-1652.

Filiz, E. ve Koç, İ. 2011. Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2); 2017-214.

Filiz, E. ve Koç, İ. 2012. Bitkilerde DNA barkotları. Akü Febir, 12; 53-57.

Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Van Alphen Stahl, J. *et al*., 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. Bot J Linn Soc, 159; 1-11.

Gepts, P. 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. Plant Population Genetics. Breeding, and Genetics Resources (A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir, eds.); 64-68, Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

Goffinet, B., Hollowell, V. and Magill, R. 2004. Molecular systematics of bryophytes. Missouri Botanical Garden, 468, USA.

Gözel, U., Yurt, Ç. ve Gözel, Ç. 2016. Nematod Taksonomisinde Kullanılan Moleküler Markörler. Türk. Entomol. Bült., 6(2); 179-189.

Gülşen, O. ve Mutlu, N. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. Alatarım Dergisi, 4 (2); 27-37.

Güz, N. ve Kılınçer, N. 2012. Böcek sistematiğinde moleküler markörlerin kullanımı. Türk. Entomol. Bült., 2(2); 125-145.

Glime, 2017. http://digitalcommons.mtu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1000&context=bryophyte-ecology1. Erişim Tarihi: 20.03.2020.

Grundmann, M., Schneider, H., Russell, S.J. and Vogela, J.C. 2006. Phylogenetic relationships of the moss genus *Pleurochaete* Lindb. (Bryales: Pottiaceae) based on chloroplast and nuclear genomic markers. Science Direct, 6; 33-45.

Harlan, J.R. and De Wet, J.M.J. 1973. On the quality of evidence for origin and dispersal of cultivated plants. Curr. Antropol. 14; 51-62.

Harris, J.W. and Stocker, H. 1998. Maximum Likelihood Method in Handbook of Mathematics and Computational Science, Springer-Verlag; 824, New York.

Hecht, W., 1990. Studies on mitochondrial DNAin farm animals. In genome Analysis in Domestic Animals, 259-268.

Henderson, D.M. and Muirhead C.W. 1955. Contributions to the bryophyte flora of Turkey, 22; 29-43.

Henderson, D.M. 1961. Contributions to the bryophyte flora of Turkey, 23; 279-301.

Henderson, D.M. and Prentice H.T. 1969. Contributions to the bryophyte flora of Tukey: VIII. 29; 235-262.

Hillis, D.M. and Dixon, M.T. 1991. Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic ınference. Q. Rev. Biol., 66; 411–454.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. and Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE, 6(5), e19254.

Hoy, M.A. 2003. Insect molecular genetics, edition two, Academic Press/Elsevier; 560, San Diego.

Hunter, R.L. and Markert, C.L. 1959. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125; 1294-1295.

Inoue, Y. and Tsubota, H. 2017. A taxonomic revision of cleistocarpous species of Weissia (Pottiaceae, Bryophyta) in Japan. Phytotaxa, 306(1); 001-020.

Iucnredlist, 2020. https://www.iucnredlist.org/regions/europe, A miniature World in decline European red list of mosses, liverworts and hornworts. Erişim Tarihi: 02.07.2020.

Kandemir, B. 2019. https://bilimgenc.tubitak.gov.tr/makale/dnanin-kesfinden-bugune. Erişim Tarihi: 10.06.2020.

Kırmacı, M. and Erdağ, A. 2009. The bryophyte flora of Onaz Mountain (Denizli/Turkey). International of Botany 5(3); 226-235, ISSN 1811-9700.

Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc. Natl. Acad. Sci., 102; 8369–8374, USA.

Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS ONE, 2, e508.

Lang, A.S., Kruijer, J.D. and Stech, M. 2014. DNA barcoding of Arctic bryophytes: an example from the moss genus *Dicranum* (Dicranaceae, Bryophyta). Polar Biol, DOI 10.1007/s00300-014-1509-7.

Hernandez-Maqueda, R., Quandt, D., Werner, O. and Munoz, J. 2008. Phylogeny and classification of the Grimmiaceae/Ptychomitriaceae complex (Bryophyta) inferred from cpDNAMolecular Phylogenetics and Evolution, 46; 863-877.

Markert, C.L. and Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes; tissues, ontogenetic and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci., 45; 753-763, USA.

Meghen, C., Machugh, D.E. and Bradley, D.G. 2002. Genetic characterization and West African cattle, FAO.

Mikrobiyoloji, 2020. http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF888E2D2167B4CAA0. Erişim Tarihi: 10.06.2020.

Mower, J.P., Touzet, P., Gummow, J.S., Delph, L.F. and Palmer, J.D. 2007. Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial gene of seed plants. BMC Evol Biol, 7; 135.

Murtagh, F. 1984. Complexities of hierarchic clustering algorithms: the state of the art. computational Statistics Quarterly 1; 101–113.

Neale, D.B. and Harry, D.E. 1994. Genetic mapping in forest trees: RFLPs, RAPDs, and beyond, training course in population genetics/ısozyme analysis an ıts application to gene conservation in forest trees and crop species, Part I, Edited by Kaya, Z. and Adams, W.T., 430, Ankara.

Özdemir, M. ve Doğru, Ü. 2007. Genetik karakterizasyonda mitokondriyal DNA kullanımı. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 38(1); 105-111.

Özşensoy, Y. ve Kurar, E. 2012. Markör sistemleri ve genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanımları. Journal of Cell and Molecular Biology 10(2);11-19.

Persing, H.D. 1991. Polymerase chain reaction: Trenches to benches. J. Clin. Microbiol., 29; 1281-1285.

Petersen, D.J. and Vrain, T.C. 1996. Rapid identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. hapla* and *M. fallax* using PCR primers to amplify their ribosomal intergenic spacer. Fundamental and Applied. Nematology, 19; 601-605.

Poulton, J., Macaulay V. and Marchington D.R. 1998. Is the bottleneck cracked? Am. J. Hum. Genet. (62); 752-757.

Richardson, D.H.S. 1981. "The Biology of Mosses", Blackwel Scientific Publication, (1)216, Edinburgh.

Robinson, H. and Godfrey, R.K. 1960. Contributions to The Bryophyte Flora of Tukey. 29; 244-253.

Rokas, A., Ladoukakis, E. and Zouros, E. 2003. Animal mitochondrial recombination revisited. Trends in Ecology and Evolution, 18(8); 411-417.

Roose, M. L. 1988. Isozymes and restriction fragmenth length polymorphismin citrus breeding and systematics. In: Goren R., Mendel K. (eds.). Proc. 6th Int. *Citrus* Congress. Balaban Publishers, 1; 155-165, Rehovot, Israel.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4 (1); 406-425.

Sato, H., Tsubota, H., Yamaguchi, T. and Deguchi, H. 2004. Phylogenetic and morphological notes on *Uleobryum naganoi* Kiguchi *et al.* (Pottiaceae, Musci). Hikobia, 14; 143-147.

Sawicki, J., Plasek, V. and Szczecinska, M. 2009. Preliminary studies on the phylogeny of *Orthotrichum* (Bryophyta) inferred from nuclear ITS sequences. Ann. Bot. Fennici, 46; 507-515.

Sober, E. 1983. Parsimony in systematics: philosophical ıssues. Annual Review of Ecology and Systematics, 14; 335–357.

Sokal, R. and Michener, C. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin, 38; 1409–1438.

Suzuki, T., Inoue, Y. and Tsubota, H. 2018. Molecular phylogeny of the genus *Fissidens* (Fissidentaceae, Bryophyta) and a refinement of the infrageneric classification. Molecular Phylogenetics and Evolution, 127; 190-202.

Schochetman, G. and Jones, K.W. 1988. Polimerase Chain Reaction. J. Infect. Dis., 158; 1154-1157.

Schofield, W. B. 2001. Introduction to Bryology, The Blackburn Press, Caldwell, ISBN:973-228-7 077, 431; USA.

Sciencenews, 2020. https://www.sciencenews.org/topic/genetics. Erişim Tarihi: 09.06.2020.

Shaw, A.J., Pokorny, L., Shaw, B., Ricca, M., Boles, S. and Szövényi, P. 2008. Genetic structure and genealogy in the *Sphagnum subsecundum* complex (Sphagnaceae: Bryophyta). Molecular Phylogenetics and Evolution. 49; 304-317.

Staub, J.E., Kuhns, J.J., May, B. and Grun, P. 1982. Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107; 405-408.

Staub, J.E. and Crubaugh, L. 1995. Selection for multiple lateral determinate cucumber genotypes. Cucurbit Gen. Coop. Rpt. 18; 5-6.

Staub, J.E. and Sequen, F.C. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. Hort. Scien. 31(5);729-741.

Stech, M., Veldman, S., Larrain, J., Munoz, J., Quandt, D., Hassel, K. and Kruijer H. 2013. Molecular Species Delimitation in the *Racomitrium canescens* Complex (Grimmiaceae) and Implications for DNA Barcoding of Species Complexes in Mosses. 1(8); 1-9.

Swofford, D.L. 2003. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A. *et al.* 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. Nucleic Acids Research, 35, No. 3.

Tanker, N., Koyuncu M. ve Coşkun, M. 2007. Farmasötik Botanik Kitabı. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 458, Ankara.

Taşpınar, M.S. ve Tosun, M. 2002. İzoenzim elektroforez tekniğinin bitki ıslahında kullanımı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 33 (4), 451-456.

Tonguç Yayıntaş, Ö. 2001. "Moss Flora of Muğla and its Environment". OT Sistematik Botonik Dergisi 8(1); 95-111, ISSN 1300-2953.

Tuchili, L.M., Kodama, H., Sharma, R.N., Takatori, I., Pandey, G.S., Kabilika, S., Mukamoto, M., Tsuji, S., and Baba, T. 1996. Detection of *Salmonella* DNA in

chicken embryos and environmental samples by Polymerase Chain Reaction. J. Vet. Med. Sci., 58; 881-884.

Troitsky, A.V., Bobrova, V.K., Ponomarev, A.G. and Antonov, A.S. 1984. The nucleotide sequence of chloroplast 4.5S rRNA from *Mnium rugicum* (Bryophyta) : mosses also possess this type of RNA. Elsevier Science, (1); 176.

Uphold, W.B. and Dawid, I.B. 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D-loop region. Cell, (11); 571-583.

Ursavaş, S. Birben, Ü. ve Albayrak, R.B. 2013. "Odun dışı orman ürünü olarak karayosunlarının ülkemizdeki ve yurtdışındaki durumu" 2023'e Doğru 2. Doğa ve Ormancılık Sempozyumu, Orman Mühendisleri Odası Ankara.

Ursavaş, S. ve Keçeli, T. 2019. *Weissia multicapsularis*, a rare moss species new to Turkey and Asia. Plant Biosystems 153 (5); 669-672.

Vardar-Kanlıtepe, Ç., Aras, S., ve C.Duman, D. 2010. Bitki Islahında Moleküler Belirteçlerin Kullanımı ve Gen Aktarımı. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 67(1); 33-43.

Velioğlu, E., İçgen, Y., Çengel, B., Öztürk, H. ve Kaya, Z. 2003. Moleküler belirteçler yardımıyla Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) tohum meşçerelerinde, tohum bahçelerinde ve ağaçlandırmalarında bulunan genetik çeşitliliğin karşılaştırılması. Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırmaları Müdürlüğü, Teknik Bülten No: 10; 42, Ankara.

Walker, J. and Dounan, G. 1989. DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. J. Appl. Microbiol., 67; 229-230.

Wallace, D.C. 1994. Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. J.Bioenerg Biomembr (26); 241-250.

Wallace, D.C. 1995. Mitochondrial DNA variations in human evolution and disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91; 8739- 8746.

Werner, O., Ros, R.M., Cano, M.J. and Guerra, J. 2002. *Tortula* and some related genera (Pottiaceae, Musci): phylogenetic relationships based on chloroplast *rps4* sequences. Plant Systematics and Evolution, 235; 197–207.

Werner, O., Ros, R.M., Cano, M.J. and Guerra, J. 2004a. Molecular phylogeny of Pottiaceae (Musci) based on chloroplast rps4 sequence data. Plant Syst. Evol. 243; 147–164.

Werner, O., Ros, R.M., Guerra, J. and Cano, M.J. 2004b.Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers support the species status of Weissia wimmeriana (Sendtn.) Bruch. & Schimp. (Pottiaceae, Bryopsida). Cryptogamie, Bryology, 25(2); 137-146.

Werner, O., Ros, R.M. and Grundmann, M. 2005. Molecular phylogeny of Trichostomoideae (Pottiaceae, Bryophyta) based on nrITS squence data. Taxon, 54(2); 361-368.

Wolcott, J.M. 1992. Advances in nucleic acid-based detection methods. Clin. Microbiol. Rev., 5; 370-386.

Yıldız, B. ve Aktoklu, E., 2012. Bitki sistematiği ilkin karasal bitkilerden bir çeneklilere, Palme Yayıncılık, 396.

Yorgancılar, M., Yakışır, E. ve Tanur Erkoyuncu, M., 2015. Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı. Bahri Dağdaş Araştırma Dergisi, 4(2); 1-12.

Zander, R.H. 1989. Seven new genera in Pottiaceae (Musci) and a lectotype for *Syntrichia*. Phytologia, 65; 424–436.

Zander, R.H. 1993. Genera of the Pottiaceae: mosses of harsh environments. Bull. Buffalo Soc. Nat. Sci., 32; 1–378.

EK 1 Tanımlar

Allel Gen: Bir karakter üzerinde aynı ya da farklı yönde etkili olan iki veya daha fazla genlerden her biri (Belirli bir lokus üzerindeki DNA dizisinin herhangi bir varyantıdır).

Biyoteknoloji: İnsan, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan fonksiyonları anlamak ve değiştirmek amacı ile kullanılan teknikler ve işlemlerdir.

Dominant Gen: Baskınlık veya dominantlık, genetikte bir genin karşılıklı lokuslar üzerinde bulunan alellerinden hangisinin canlının karakterini belirleyeceğini gösteren ilişki.

Fenotip: Fenotip ya da dış yapı, genetik ve çevresel etkenlerin yarattığı özelliklerin canlının dış görünüşündeki yansıması.

Filogeni: Biyolojide filogenetik çeşitli organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkinin araştırmasıdır. Bu ilişkiler filogeni olarak adlandırılır (Evrimsel soy ilişkisi).

Genom: Genom, bir kalıtım birimidir. Bir organizmanın kalıtım materyalinde bulunan genetik şifrelerin tamamını simgeler.

Genotip: Organizmanın kalıtsal yapısıdır (genetik yapıya verilen isim).

Heteroplazmi(k): Normal mtDNA yanında mutant tiplerde mevcutsa, hücre genotipi 'heteroplazmik' olarak adlandırılır.

Heterozigot: Biri anneden biri babadan gelen gen çiftlerinin (Alel) genotipi farklılık gösteriyorsa bu durumda bu gen çiftlerini taşıyan canlı 'heterozigot' olarak adlandırılır.

Homozigot: Bir karakteri kontrol eden iki alel genin birbiri ile aynı olması durumudur.

İzoenzim: Bir enzimin aminoasit dizisi bakımından çok az farklı olan, aynı veya farklı genler tarafından kodlanan fakat katalizledikleri (hızlandırdıkları) kimyasal reaksiyon aynı olan biçimlerinin her birine verilen isimdir.

Kodominant Gen: Eş baskın genlere verilen isimdir. Heterozigotların fenotipinde, her iki alel çiftinin de etki göstermesi durumu.

Linguistik: Dili bir sistem olarak gören, niteliğini, yapısını, birimlerini ve dönüşümlerini inceleyen bilim dalı.

Lokus: Bir genin, bu genin alellerinden birinin ya da bir DNA dizisinin kromozom üzerinde düşünüldüğü yer veya DNA üzerindeki fiziksel özel konumudur.

EK 1 devam

Moleküler Markör: Genomda bir gen ya da gen bölgesine ilişkin DNA parçası veya biyokimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır (Belirteç).

Modifikasyon: Canlılarda meydana gelen ve kalıtsal olmayan değişimlerdir.

Monomorf: Bir populasyonda bütün bireylerin morfolojik ya da fenotipik olarak benzer olması.

Morfoloji: Biyolojide morfoloji, canlıların yapı ve biçimini inceleyen, özel fiziksel niteliklerini araştıran bilim dalıdır.

Nuseller Embriyo: Seksuel olmayıp ana bitkinin nusellus dokusundan gelişmiş embriyodur.

Polimorf: Populasyonda herhangi bir genin veya özelliğin birden fazla formu bulunuyorsa o gen ya da fenotipik özellik polimorfik olarak kabul edilmektedir.

Populasyon: Biyolojide populasyon; belirli bir yerde ve zamanda bulunan, birbirleriyle çiftleşip üreyebilen ve aynı tür içinde yer alan canlıların oluşturduğu bireyler topluluğu.

Rekombinasyon: Genetik çeşitlenme veya rekombinasyon, genetik materyalin bir zincirinin kırılması ve sonrasında farklı bir DNA molekülüne katılmasıyla oluşan süreçtir.

Taksonomi: Taksonomi ya da sınıflandırma bilimi (sistematik), canlıların sınıflandırılması ve bu sınıflandırmada kullanılan kural ve prensipler bütünüdür.

Transkripsiyon: Transkripsiyon, DNA'yı oluşturan nükleotit dizisinin RNA polimeraz enzimi tarafından bir RNA dizisi olarak kopyalanması sürecidir. Başka bir deyişle, DNA'dan RNA'ya genetik bilginin aktarımıdır.

Translasyon: Transkripsiyon sonucu oluşan mRNA'lardaki koda uygun olarak ribozomlarda gerçekleştirilen amino asit zinciri veya polipeptit sentezi sürecidir, daha sonra üretilen amino asit zinciri veya polipeptit uygun bir şekilde katlanarak etkin bir protein haline gelmektedir.

Varyasyon: Genetikte populasyon içinde ya da popülasyonlar arasında ortaya çıkabilen, tür içerisinde veya gen alellerinde gözlemlenen farklılıklardır. Genetik varyasyon, doğal seçilim için "ham madde" sağladığından önem taşır.

Zigot: Biri anneden, biri babadan gelen iki eşey hücresinin birleşmesi sonucu oluşan diploit hücredir. Zigot, gelişiminin devamında bölünerek canlıyı oluşturur.

EK 2 Solüsyon ve Tamponlar

Agaroz Jel Elektroforezi için; TAE tampon (50X)

Tris-baz	:242 g
Glasiyal asetik asit	:57.1 mL
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	:100 mL
Distile su	:1000 mL'ye tamamlanır.

EK 3 Kullanılan Kimyasallar

Agaroz (Biomax-Prona)

EDTA (Sigma)

Etanol (Sigma)

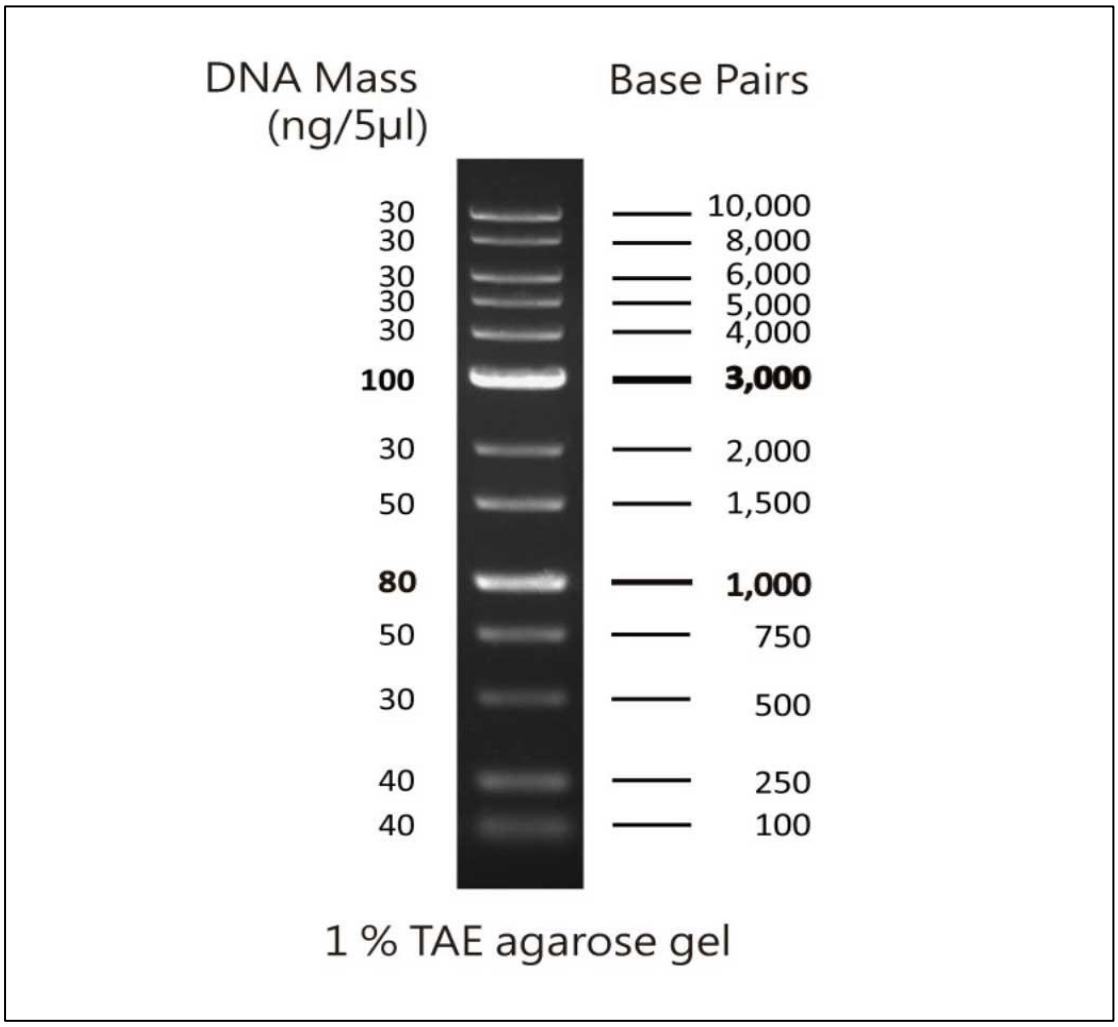
Etidyum bromür (Sigma)

Glasiyal asetik asit (Merck)

Taq DNA polimeraz (Thermo)

Tris-baz (Merck)

EK 4 Boyut Belirteçleri



Şekil 4.19 GeneRuler 1 kb bp DNA marker (Thermo)

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı: Simge ÇİZGEN TAN

Doğum Yeri: Tekirdağ

Doğum Tarihi: 01.01.1992

Medeni Hali: Evli

Eğitim Durumu

İlkokul: Cumhuriyet İlköğretim Okulu (1998-2003); Talatpaşa Ortaokulu (2003-2006), Muratlı/TEKİRDAĞ

Lise: Tekirdağ Tuğlacılar Lisesi (2006-2010)

Lisans: İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümü (2010-2014)

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Orman Botaniği Programı (2017-)

Meslek Durumu: Çankırı Karatekin Üniversitesi Orman Fakültesi, Araştırma Görevlisi (2017-)

Yabancı Dil: İngilizce

Akademik Çalışmalar

Ulusal Hakemli Dergilerdeki Makaleler

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2018. Harvest Amounts and Economic Value of the Acorn in Turkey . Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi, 4 (2); 109-113.

Ulusal Kongre/Sempozyum Bildirileri

Çizgen, S. ve Ursavaş, S., 2019. Botanikte Kullanılan Moleküler Sistematik Yöntemler ve Filogeni. Düzce Üniversitesi Ulusal Botanik Bahçeleri, Arboretumlar,

Herbaryumlar ve Botanik Müzeleri Çalıştayı, 18-21 Nisan 2019, Düzce (Sözlü Bildiri).

Uluslararası Kongre/Sempozyum Bildirileri

Çizgen, S., Tuttu, G., 2017. Türkiye'deki Anemone (*Anemon* sp.) Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. International Symposium On Medicinal, Aromatic And Dye Plants, Proceedings Book, 309. 5-7 October 2017, Malatya, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., 2017. Türkiye'deki *Astragalus* sp. Etnobotanik Kullanımı ve Kitre Hasat Miktarları. International Symposium On Medicinal, Aromatic And Dye Plants, Proceedings Book, 348. 5-7 October 2017, Malatya, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., 2017. Türkiye'deki *Cyclamen* sp. Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. International Symposium On Medicinal, Aromatic And Dye Plants, Proceedings Book, 516. 5-7 October 2017, Malatya, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., 2017. Türkiye'deki Reçine Üretim Miktarı ve Kullanım Alanları. International Symposium On Medicinal, Aromatic And Dye Plants, Proceedings Book, 541. 5-7 October 2017, Malatya, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2017. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the Lavender (*Lavandula* sp.) in Turkey. 1. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi, Abstract Book, 484. 9-12 Mayıs 2017, Konya (Poster Bildiri).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2017. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the Juniper (*Juniperus* sp.) Seed in Turkey. ISFOR 2017, International Symposium on New Horizons in Forestry, Abstract Book, 355. 18-20 October 2017, Isparta, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2017. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the Acorn in Turkey. ISFOR 2017, International Symposium on New Horizons

in Forestry, Abstract Book, 356. 18-20 October 2017, Isparta, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2017. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the Rhododendron (*Rhododendron* sp.) in Turkey. ISFOR 2017, International Symposium on New Horizons in Forestry, Abstract Book, 357. 18-20 October 2017, Isparta, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2017. Türkiye'deki Hayıt Yaprağı Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. 1.Uluslararası Demirci Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, 331-332. 12-14 Ekim 2017, Manisa (Sözlü Bildiri).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2017. Türkiye'deki Kuşburnu Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. International Symposium On Medicinal, Aromatic And Dye Plants, Proceedings Book, 569. 5-7 October 2017, Malatya, Turkey (Poster Presentation).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2017. Türkiye'deki Zeytin-Zeytin Sürgünü Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. 1.Uluslararası Demirci Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, 333-334. 12-14 Ekim 2017, Manisa (Sözlü Bildiri).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2018. Çam (*Pinus* sp.) İbresinin Türkiye'deki Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science (EurasianBioChem 2018), Abstract Book, 1283. 26-27 April 2018, Ankara (Poster Bildiri).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2018. Göknar (*Abies* sp.) Dalının Türkiye'deki Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science (EurasianBioChem 2018), Abstract Book, 914. 26-27 April 2018, Ankara (Poster Bildiri).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2018. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the *Juniperus drupacea* Cones in Turkey. Ecology 2018 International Symposium, Abstract Book, 901. 19-23 June 2018, Kastamonu (Poster Bildiri).

Çizgen, S., Tuttu, G., Ursavaş, S., 2018. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the Oleander (*Nerium oleander*) in Turkey. Ecology 2018 International Symposium, Abstract Book, 871. 19-23 June 2018, Kastamonu (Poster Bildiri).

Çizgen, S., Ursavaş, S.,Tuttu, G., 2017. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the Mistletoe (*Viscum album* L.) in Turkey. 1. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik

Bitkiler Kongresi, Abstract Book, 486. 9-12 Mayıs 2017, Konya (Poster Bildiri).

Tuttu, G., Ursavaş, S., Çizgen, S., 2018. Alıç (*Crataegus* sp.) Meyvesi ve Yaprağının Türkiye'deki Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımları. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science (EurasianBioChem 2018), Abstract Book, 1354. 26-27 April 2018, Ankara (Poster Bildiri).

Tuttu, G., Ursavaş, S., Çizgen, S., 2018. Ladenin (*Cistus* sp.) Türkiye'deki Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımı. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science (EurasianBioChem 2018), Abstract Book, 907. 26-27 April 2018, Ankara (Poster Bildiri).

Ursavaş, S., Çizgen, S., Tuttu, G., 2018. Funda (*Erica* sp.) ve Funda Kök Odununun Türkiye'deki Hasat Miktarları ve Etnobotanik Kullanımları. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science (EurasianBioChem 2018), Abstract Book, 926. 26-27 April 2018, Ankara (Poster Bildiri).

Ursavaş, S., Çizgen, S., Tuttu, G., 2018. Harvest Yields and Ethnobotanical Use of Lichens in Turkey. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Science (EurasianBioChem 2018), Abstract Book, 1287. 26-27 April 2018, Ankara (Poster Bildiri).

Ursavaş, S., Tuttu, G., Çizgen, S., 2018. Harvest Amounts and Ethnobotanical Uses of the Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*) in Turkey. Ecology 2018 International Symposium, Abstract Book, 855. 19-23 June 2018, Kastamonu (Poster Bildiri).