ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUZ GÖLÜ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN ENDEMİK *SALSOLA ANATOLICA* ALLEN VE *SALSOLA STENOPTERA* WAGENITZ TÜRLERİNİN ISSR TEKNİĞİ İLE MOLEKÜLER AYRIMININ ARAŞTIRILMASI

Güliz DOĞAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2018

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Güliz DOĞAN tarafından hazırlanan "**Tuz Gölü'nde Yayılış Gösteren Endemik *Salsola anatolica* Allen ve *Salsola stenoptera* Wagenitz Türlerinin ISSR Tekniği ile Moleküler Ayrımının Araştırılması**" adlı tez çalışması 18/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet Emre YAPRAK
Ankara Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan: Doç. Dr. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP
Gazi Üniversitesi / Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ilgaz AKATA
Ankara Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ahmet Emre YAPRAK
Ankara Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yaralandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

18/01/2018



Güliz DOĞAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZ GÖLÜ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN ENDEMİK *SALSOLA ANATOLICA* ALLEN VE *SALSOLA STENOPTERA* WAGENITZ TÜRLERİNİN ISSR TEKNİĞİ İLE AYRIMININ ARAŞTIRILMASI

Güliz DOĞAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Emre YAPRAK

Salsola stenoptera ve *S. anatolica* türleri, morfolojik olarak ayrımı çok güç ve yakın ilişkili türlerdir. *S. anatolica* türü bazı yazarlar tarafından *S. stenoptera* türünün sinonimi bazı kaynaklarca da *S. stenoptera* türünden ayrı bir tür olarak kabul edilmektedir. İki tür arası farklılığın mikrohabitat farklılıklarından kaynaklanıp kaynaklanmadığı farklı morfolojideki örneklerin ekotipler mi yoksa farklı türler mi olduğu daha önce netleştirilememiştir. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre *S. anatolica* ve *S. stenoptera* türleri LC tehdit kategorisinde bulunmaktadır, Buna ilaveten, *S. anatolica* Bern Sözleşmesi Ekliste-1'de de yer almakta olup küresel ölçekte tehdit altında kabul edilmekte ve uluslararası antlaşmalarla korunmaktadır. Morfolojik ayrımı güç olan bu iki bitki Tuz Gölü'ndeki farklı lokalitelerden toplanmış ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) DNA parmak izi metodu ile farklı türler mi yoksa aynı tür mü olduğunu belirlemek amacı ile çalışılmıştır. Sonuç olarak, *S. stenoptera* ve *S. anatolica* türünün ayrı türler olduğu tespit edilmiştir.

Ocak 2018, 26 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salsola stenoptera, Salsola anatolica,* chenopodiaceae, endemik, ISSR, DNA parmak izi metodu, moleküler sistematik

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE DISTINCTION OF ENDEMIC *SALSOLA ANATOLICA* ALLEN AND *SALSOLA STENOPTERA* WAGENITZ SPECIES AROUND TUZ LAKE BY ISSR FINGERPRINTING METHOD

Guliz DOGAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet Emre YAPRAK

Salsola stenoptera and *S. anatolica* are difficult to distinguish morphologically. *S. anatolica* species is accepted to be synonym to *S. stenoptera* according to some authors while there are others who agree that *S. stenoptera* and *S. anatolica* are different species. It has not yet been clarified whether differences between these two species stem from their different microhabitats or not, and if samples with different morphology are ecotypes or another species. According to Red Data Book of Turkish Plants, *S. stenoptera* and *S. anatolica* are categorized as LC. Moreover, *S. anatolica is listed as* globally endangered species by Bern Convertion Appendix I and is under protection by International Agreements as well. In this study these two species have been examined by using ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) DNA fingerprinting method. to determine whether they are alike or unlike after collecting them from different locations of Tuz Lake. And as a result of this study, it has been found out that *S. stenoptera* and *S. anatolica* are different species.

January 2018, 26 pages

Key Words: *Salsola stenoptera, Salsola anatolica,* chenopodiaceae, endemic, ISSR, fingerprinting method, molecullar systematics

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle benden yardımını esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ahmet Emre YAPRAK'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve Doç. Dr. Gül Nilhan TUĞ'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında gerek arazi de gerekse laboratuvar da benden yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarım Dr. İsa BAŞKÖSE'ye, İnci Bahar ÇINAR'a, Gizem SAYGIN'a, Gül AYYILDIZ'a, Merve ÖRNEK YILDIRIM'a ve Duru SANCAR'a çok teşekkür ederim.

Çalışma dönemim boyunca bana her zaman destek olan ve yardımlarıyla çalışmalarıma katkıda bulunan sevgili arkadaşlarım Gülizar AYDOĞDU'ya ve Aydan ACAR ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana her konuda destek olan ve arkamda duran canım ailem; annem Emine DOĞAN'a, babam Yusuf DOĞAN'a, abim Hüseyin Ali DOĞAN'a, yengem Beyza ÖVÜL DOĞAN'a ve yeğenim Poyraz DOĞAN'a teşekkür ederim.

Güliz DOĞAN
Ankara, Ocak 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİN ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **7**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **10**
3.1 Arazi Çalışmaları **10**
3.2 DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması **12**
3.3 DNA konsantrasyonunun spektrofotometrik ölçümü **14**
3.4 ISSR'nin Belirlenmesi için PZR Gerçekleştirilmesi **15**
3.5 Veri Analiz Yöntemi **17**
4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR **18**
4.1 Veri Analizi **18**
5. SONUÇ VE TARTIŞMA **22**
KAYNAKLAR **23**
ÖZGEÇMİŞ **26**

SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
cm^3/gr	Santimetreküp/Gram
cm	Santimetre
m	Metre
ul	Mikrolitre
uM	Mikromolar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
ng/ul	Nanogram/Mikrolitre
ºC	Santigrad derece
pmol	Pikomol
U	Unit
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

2n	Diploid kromozom sayısı
A	Adenin nükleobazı
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
bç.	Baz Çifti
C	Sitozin nükleobazı
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTPs	Deoksi nükleosit trifosfatlar
G	Guanin nükleobazı

ISSR	Inter Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarları Arası Polimorfizm)
LC	Least Concern – Az Endişe Verici
MN	Macherey-Nagel Kit
PE	Elution Buffer
PC	Bağlama tamponu
PL1	Liziz Tamponu 1
PL2	Liziz Tamponu 2
PW1	Yıkama Tamponu 1
PW2	Yıkama Tamponu 2
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
sn	Saniye
s.str.	Sensu stricto (dar anlamda)
SSR	Simple Sequence Repeat
T	Timin nükleobazı
TBE	Tris/Borik Asit/EDTA
UBC	United British of Colombia

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 ISSR-PZR Temsili $(AG)_8$ tek primerlerinin (TC)n tekrar bölgesinin hedef alınıp ISSR bölgesini kullanarak iki ters yönlü (TC)n sekansının şematik olarak gösterilmesi 2

Şekil 1.2 *Salsola stenoptera* türünün habitusu ve çiçek durumu 5

Şekil 1.3 *Salsola anatolica* türünin habitusu ve çiçek durumu 6

Şekil 3.1 Tuz Gölü'nün genel görüntüsü 10

Şekil 3.2 Kırmızı daireler ile gösterilen arazi bölgelerinin Tuz Gölü'ndeki Konumları 11

Şekil 3.3 Silika jel içeren poşetlerde zarflar içerisinde kuruması beklenilen bitki örnekleri 12

Şekil 3.4 *Salsola stenoptera* ve *Salsola anatolica* türlerinin UBC 888 nolu primerde agaroz jel görüntüsü 16

Şekil 3.5 *Salsola stenoptera* ve *Salsola anatolica* türlerinin UBC 808 nolu primerde agaroz jel görüntüsü 17

Şekil 4.1 *S. anatolica* ve *S. stenoptera* türlerinden bireylerin ISSR verilerinin jacards benzerlik indeksi hesaplanarak UPGMA metodu ile kümeleme analizi yapılarak elde edilen dendogram 21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Arazi çalışmaları sonucunda elde edilen birey sayısı, arazinin yapıldığı yer ve tarihi 11

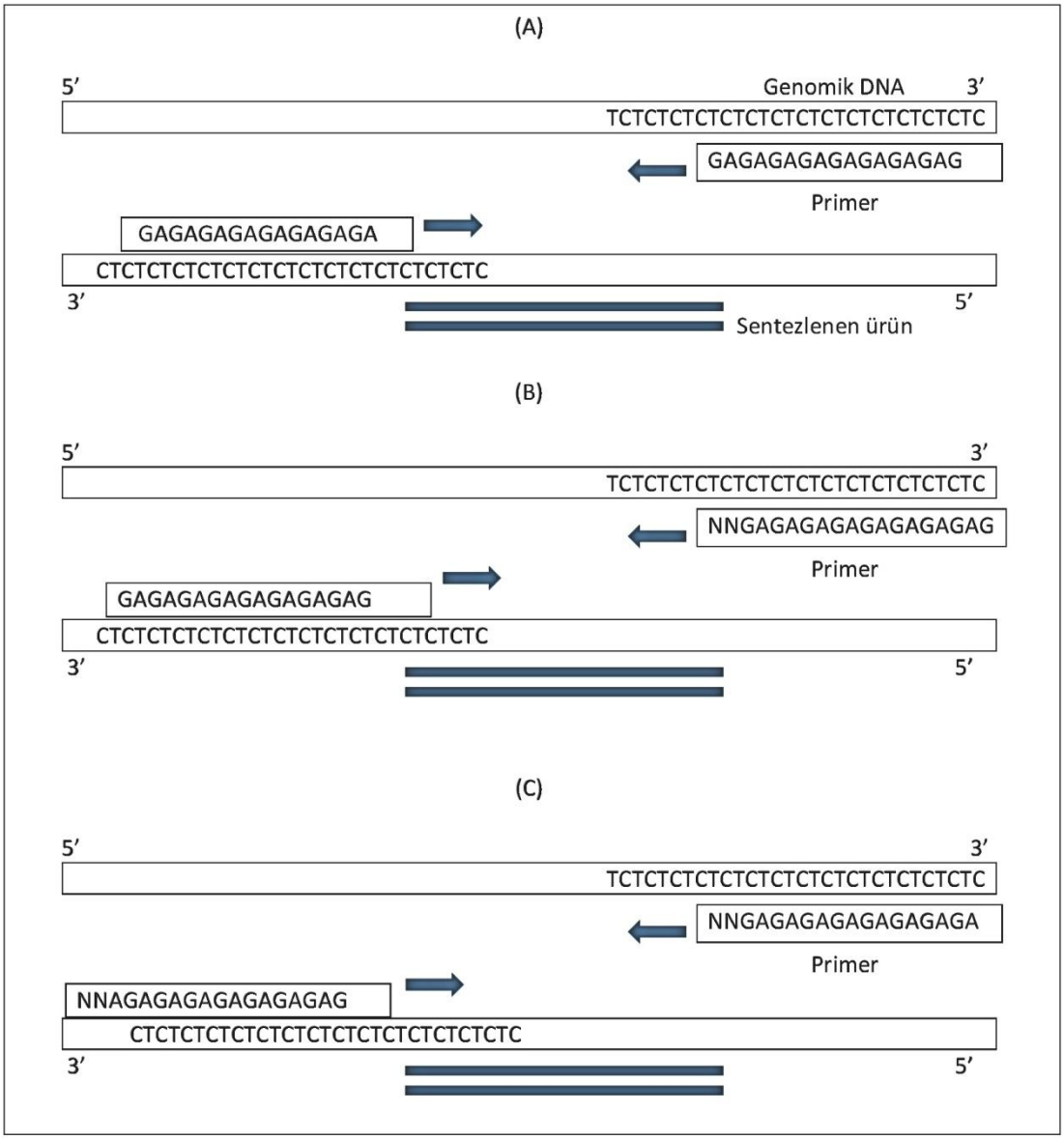
Çizelge 4.1 UBC 808 numaralı primerin skorlaması 19

Çizelge 4.2 UBC 888 numaralı primerin skorlaması 20

1. GİRİŞ

Çalışma alanı olan Tuz Gölü dünyanın en tuzlu ikinci gölü olma özelliğine sahiptir. Bu göl ulusal kriterlere göre A sınıfı sulak alan olma özelliğine sahiptir. Tuzcul habitata sahip bu bölgede yaklaşık 38 endemik bitki türü bulunmaktadır. Türkiye'nin en büyük ikinci gölü olmasına rağmen ülkenin en sığ gölleri arasında yer almaktadır. Aşırı buharlaşmanın da etkisi ile gölün tamamına yakını kurumakta ve kuruyan bölgelerde 30 cm'ye yakın tuz tabakası oluşmaktadır. Dünyanın en tuzlu gölleri arasında yer alan Tuz Gölü'nün su yoğunluğu 1-22.5 cm^3/gr, tuz oranı ise % 32.4'tür. Tuz yoğunluğunun yüksekliği sebebi ile çok fazla sucul bitkiye rastlanmamakla birlikte göl çevresinde geniş bir alanda çok geniş olamayan halofit (tuzcul) flora ve akarsu etkisinde olan bölgelerde halofitik, seyrek bitki örtüsü gözlenmektedir (http://www.csb.gov.tr 2012a).

Çalışmada kullanılacak olan ISSR belirteçleri Zietkiewicz vd. (1994) tarafından geliştirilen, ters konumlanmış ve çoğaltılabilir uzaklıktaki iki basit dizi tekrar bölgesi arasındaki DNA parçasının PZR ile çoğaltılmasına dayanan bir tekniktir. Bu teknikte farklı büyüklükteki mikrosatellit arası dizileri çoğaltmak için çoklu genomik dizileri hedef alan 16-25 baz çifti uzunluğundaki mikrosatallitler primer olarak kullanılır. Kullanılan mikrosatallitler; dinükleotid, trinükleotid, tetranükleotid ve pentanükleotid olabilir. ISSR için kullanılan primerler özel olmayıp herhangi bir tekrarlı diziden sentezlenebilir (Şekil 1.1) ve primerler uzun olduğu için sıkı bağlanma sağlarlar (Genişel 2013) .



Şekil 1.1 ISSR-PZR Temsili $(AG)_8$ tek primerlerinin (TC)n tekrar bölgesinin hedef alınıp ISSR bölgesini kullanarak iki ters yönlü (TC)n sekansının şematik olarak gösterilmesi (Pradeep-Reddy vd. 2002)

Tür içi genetik çeşitliliğin araştırılmasında genetik analiz için kullanılan birçok yöntem içerisinde en güçlülerinden olması (Culley 2001) ve sahip olduğumuz laboratuvar koşullarında uygulanabilir olanı ISSR olduğu için çalışmamızda bu yöntem kullanılmıştır. Polimorfizm, bir popülasyonda iki veya daha fazla sayıda birbirinden ayrılmış ya da farklı fenotiplerin varlığı olarak tanımlanmaktadır. Polimorfizm seviyesinin kullanılan tespit yöntemi ile değişmesine rağmen ISSR belirteçleri

genellikle yüksek polimorfizm gösterirler. Daha yüksek bağlanma sıcaklığı ve daha uzun ISSR primerleri nedeniyle, RAPD ile karşılaştırıldığında daha güvenilir ve tekrarlanabilir bantlar üretmektedir (Qian 2001), ayrıca ISSR'ın maliyeti RFLP, SSR ve AFLP'den daha düşüktür (Wang vd. 2008). Bunların yanında ISSR daha önceden elde edilmiş genomik dizi bilgisi gerektirmez, bu durum onu birçok belirteç sisteminden daha kullanışlı kılmaktadır (Bornet 2001).

Çalıştığımız bitki türleri *Salsola stenoptera* Wagentz ve *Salsola anatolica* Aellen, *Chenopodiaceae* familyası üyeleri arasında yer almaktadır. *Chenopodiaceae* familyası; bir, iki veya çok yıllık olup; genelde halofit ve sukkulent otsular veya çalılardır. Yaprakları alternat veya oppozit (karşılıklı); tam, loplu veya pinnat parçalı, bazen silindirik ve etli, bazen pul şeklinde, stipülsüzdür. Çiçek durumu sık dikasyum, spika veya panikula şeklinde, çiçekleri ise braktesiz, erdişi (hermafrodit) veya tek eşeyli, aktinomorftur. Periant tek serili 2-5 birleşik sepallerden oluşmuştur, petaller yoktur. Sadece por taşıyan polenleri por sayısına göre genelde poli ya da periporat olarak isimlendirilirler. Stamenler sepal sayısı kadar, pistil 1, ovaryum üst durumlu, nadiren alt durumlu, 1 lokuluslu, 2-3 karpelli, tek ovüllü olup plasentasyon bazaldır. Meyva periantla sarılmış olan küçük bir nuks veya kapsula şeklindedir. Ilıman ve subtropik bölgelerde genellikle tuzlu ortamlarda yayılış gösteren 102 cins ve yaklaşık 1400 kadar tür içerir. Şeker elde edilir, sebze olarak yenilir (Seçmen vd. 2008). Ülkemizde 33 cins ve 129 türü vardır.

Kökeni Latince tuzlu anlamına gelen *Salsola* familyasına ait taksonlar özellikle tuzlu ve yarı tuzlu habitatlarda yayılan bir cinstir. *Salsola* cinsi; otsu veya alçak çalılardan oluşur; tüylü, tüysüz veya kılsı tüylüdür. Alt yapraklar hariç alternat, nadiren ± karşılıklı, çoğunlukla daralıcı lineerdir. Çiçekler tek veya braktelerin koltuğunda küçük gruplar halinde, genellikle spika çiçek durumunda, her biri 2 brakteollüdür. Periant segmentleri 5, ovat-lanseolat, başlangıçta zarımsı sonra kısmen sertleşir, meyvede kanatlı veya tüberküllüdür. Stamenler 5, konektif obtus veya akut uçludur. Tohum horizontaldir. Stigmalar 2, şerit, biz (subulat) veya ipliksidir (Allen 1967).

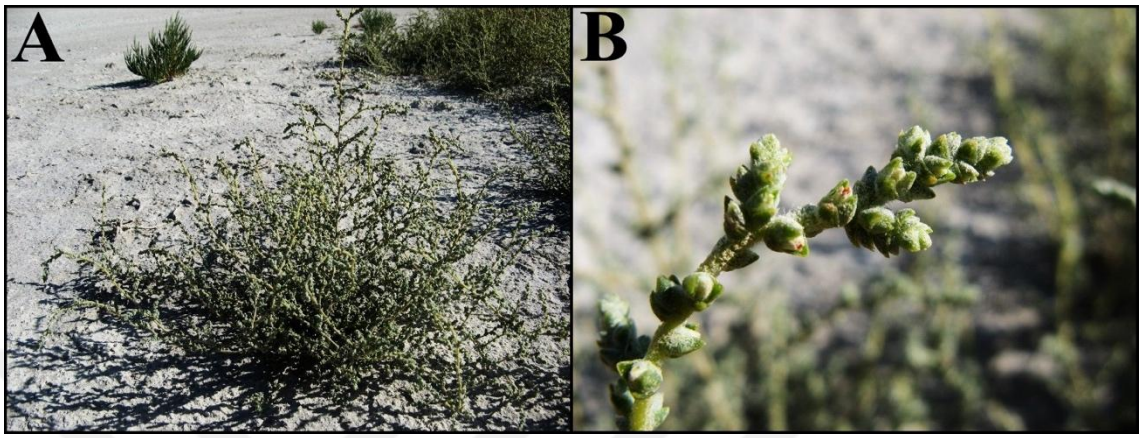
Salsola L.

1. Yaprakların ucu diken şeklinde
   2. Yapraklar karşılıklı (opozit) **4. soda**
   2. Sadece en alttaki yapraklar karşılıklı
      3. Periant segmentleri dimdik ileri doğru dışarı çıkan bir orta damara sahip **1. kali**
      3. Periant segmentleri ince zarımsı, genelde buruşuk
         4. Brakte ve brakteoller kaidede şişkin değil; periant segmentleri genelde kanatlı **2. ruthenica**
         4. Brakte ve brakteoller kaidede şişkin; periant segmentleri her zaman kanatlı **3. tragus**
1. Yaprakların ucu diken şeklinde değil
   5. Tek yıllık
      6. Her iki anter yarımı kalp şeklinde, 0.3-0.5 mm, aşağı doğru genişleyen
         7. Stigmalar sesil, küçük subulat, koyu kahverengi; filamentler tabana doğru kuvvetlice genişlemiş **5. inermis**
         7. Stigmalar birbirinden farklı, stiluslar dar, ipliksi, beyazımsı; filamentler dar
            8. Brakteoller genişlemiş rombik, gaga şeklinde **6. stenoptera**
            8. Brakteoller elongat-triangular veya akuminat - triangular, tabanda romboid **7. anatolica**
      6. Her iki anter yarımı darımsı linear, aşağı doğru genişlememiş
         9. Ek bağlantılar şişkin kese şeklinde, yuvarlak, tabanda kısa; anterler 1–5 mm **8. crassa**
         9. Ek bağlantılar küçük, benekli, rombit ya da akuminat; anterler 0.75-1.2 mm
            10. Bitki ± yoğun ölçüde kalın tüylü; periant tüylü **9. incanescens**
            10. Bitkinin üst yarısı tamamen ya da neredeyse çıplak; periant segmentlerin kenarları biraz tüylü
               11. Ek bağlantılar benekli ya da kısa üçgenimsi **10. nitraria**
               11. Ek bağlantılar belirgin şekilde kavisli **11. macera**
   5. Çalılar
      12. Ek bağlantılar geniş ± 1 mm; anterler 1.5 mm **14. canescens**
      12. Ek bağlantılar küçük, en fazla 1/20 mm; anterler 0.70-1.0 mm

13. Stigmalar şerit şeklinde, kalın, koyu kahverengi, kısa papillalı **12. dendroides**

13. Stigmalar şerit şekinde, beyaz, uzun papillalı **13. Laricina**

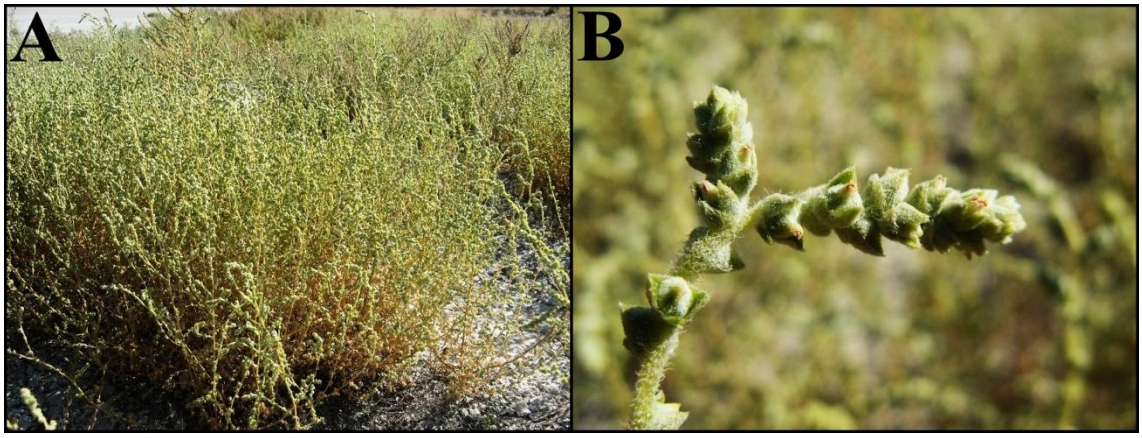
(Allen 1967)



Şekil 1.2 *Salsola stenoptera* türünün habitusu ve çiçek durumu

a. Türün habitusu, b. Türün çiçek durumu

Salsola stenoptera Wagenitz (Şekil 1.2); tek yıllık, kısa dallı, otsu, 15-20cm uzunluğunda, seyrek uzun tüylü bir bitkidir. Alt yaprakları 3-4.5mm, linear, semisirkular (yarım dairesel), uzun tüylü, kısa grandular geçişli ve geniş braktelidir. Brakteoller, otsu, alt kısımların marjini saydam (clear), genelde çiçekleri kadar veya çiçekleriden daha uzundur. Periant segmentleri uzun-ovat (elongate-ovat), zarsı marjini yaygın olarak elongat zarsı apeksli, unumsu tabakalı ve özellikle alt kısımlarında silikat uzun tüylüdür. Filamentler, alt kısımda bir miktar genişlemiştir. Anterler, 0.3mm kordat-ovat, dar, sivri bir apendaj (apendaj-appendage: petallerin üzerindeki ek çıkıntı) ile birleşmiştir. Stilus kısa; stigmalar 0.3-0.4mm, stilustan biraz daha uzun ve iplik gibidir. Tuzlu bölgelerde yetişen *S. stenoptera,* 900-1300m yükseklik arasında özellikle Tuz Gölü'nün güneydoğu tarafında ve halofit vejetasyonlarda bulunur (Wagenitz 1959). Endemik ve İran-Turan elementi olan *S. stenoptera* türü Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre düşük riskli (LC) tehdit kategorisine girmektedir (Ekim vd. 2000).



Şekil 1.3 *Salsola anatolica* türünün habitusu ve çiçek durumu

a.Türün habitusu, b. Türün çiçek durumu

Salsola anatolica Aellen (Şekil 1.3); tek yıllık, 15-30cm uzunluğunda genç ince dalları geniş ölçüde pürüssüz tüylü ve dağınık uzun tüylerle kaplanmıştır. 3-7mm olan yaprakları, geniş üçgenimsi kaideden doğrusal olarak uzamış, semisirkular (yarım dairesel) apeksli, kenarlarda devamlı olan yapraklar kaideye doğru devamlı değildir. Brakteler, uzun-üçgenimsi, otsu, saydam (clear) zarımsı marjinli, silikat, brakteoller kadar uzun. Brakteoller, biraz küçük, lanseolat-ovat, birkaç uzun tüylü, periant kadar veya daha uzundur. Periant segmentleri (gençleri) 1mm, uzun-ovat (elongate-ovat), geniş zarımsı membranlı, kanatlar mevcuttur. Anterler 0.5mm filamentler tabana indikçe genişleyen, apendajın bağlantı yeri kısa, kürek şeklinde ve sivridir. Stilusu kısa, stigması ise ipliksi yapıya sahiptir. Endemik ve İran-Turan elementi olan *S. anatolica* türünün çiçeklenme zamanı 6. ve 8. aylar olup yaklaşık 1000m yükseklikteki tuzlu topraklarda bulunmaktadır (Aellen 1967). Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre düşük riskli (LC) tehdit kategorisine giren bu tür (Ekim vd. 2000) Bern Sözleşmesi Ek liste 1'de de yer almaktadır (Anonumous 2002) ve küresel ölçekte tehdit altında kabul edilmekte aynı zamanda da uluslararası antlaşmalarla korunmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sobhian vd. (2003) tarafından yapılan çalışmalarda Orta Asya kökenli bir bitki olan *Salsola tragus* L. (*Chenapodiaceae*) türünün Kaliforniya'da bulunan iki biyotipi üzerine çalışılmış ve bu biyotipler tip A ve tip B olarak isimlendirilmiştir. Kaliforniya'daki *Salsola tragus* popülasyonundaki tip bitkileri morfolojik olarak ayırt edilebilmesine rağmen, Kaliforniya tip A için yapılan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) analizleri karşılaştırıldığında Özbekistan, Yunanistan ve Ukrayna'dan yayılışları ile benzer bulunmuştur.

Ryan ve Ayres (2007) tarafından yapılan çalışmada, Kaliforniyada bulunan egzotik istilacı *Salsola tragus* türünün, kromozom sayısı 2n=36 ve *S. tragus* s.str. olarak tanımlanan, Tip A olarak isimlendirilen ve kromozom sayısı 2n=18 olan ve dünyada herhangi bir *salsola* ile yakın bulunamayan, Tip B olarak isimlendirilen iki genetik oluşumdan Tip B'nin Ukraynadaki *S. tragus* ile bağlantılı olup olmadığını ve Ukrayna'da bulunup bulunmadığını anlamak için izoenzimatik ve DNA'ya dayalı analizler yapılmıştır. Ayrıca, Kaliforniyadaki *S. tragus* türü ile Ukraynadaki kıyaslanmıştır. Ukrayna örneklerinin izoenzimatik analizleri yapıldığında Kaliforniya *S. tragus* türü için ayırt edici bir özellik olan aspartat transferaz ve 6 fosfoglukonat dehidrogenaz kalıp aktivitesinin dehidre olmamış elektroforezden sonra olduğu saptanmıştır. Ukrayna örneklerinin hiçbiri Kaliforniya Tip B'ye benzeyen izoenzimatik kalıp göstermemiştir. DNA'ya dayalı analizler, RAPD ve ISSR primerleri Ukrayna örneklerinin Kaliforniya Tip A *S. tragus* türü ile benzediğini ancak Tip B *S. tragus* türü ile benzemediğini göstermektedir. Yakın zamanda Güney Afrikada geniş yayılış gösterdiği tespit edilmesine karşın, Tip B'nin kökeninin neresi olduğu hala bilinmemektedir.

Ayres vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, Kaliforniya'daki biri ilk olarak 1800'lerin başlarında tanımlanmış olan Avrasya kökenli *S. tragus* diğerleri Kaliforniya çöllerinde, bozkırlarında yetişen diğer bir Avrasya kökenli *S. paulsenii* ve geçtiğimiz 10 yıl içinde tanımlanan Güney Afrika kökenli olma olasılığı yüksek olan *S. kali* subspecies (alttür) *austroafricana* ve bu 3 türle aynı bölgede yaşayan tanımlanmamış 2

Salsola taksonunun karyolojisi, genom büyüklüğü, DNA sekans verileri ve mikrosatellit lokasyonlarla dominant nükleer DNA markerlar kullanılarak moleküler akrabalık ilişkileri araştırılmıştır. Flow sitometre yöntemi ile yapılan kromozom sayımı ve genom büyüklüğü değerlendirmeleri karşılaştırılmış. Bu analizler sonucunda tanımlanmamış taksonlardan birisinin *S. tragus* ve *S. kali* alttür *austroafricana* arasındaki yeni bir allopoliploid hibrit olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, diğer tanımlanmamış taksonun ise tüm üç tanımlanmış türü içeren kompleks bir hibrit olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ancak hibrit taksonların istila potansiyelleri henüz bilinmemektedir.

Gao vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, kuzeybatı Çin'de yayılış gösteren *Salsola passerina* türünün 7 popülasyonuna ait popülasyonlar arası farklılık ve genetik çeşitlilik ISSR belirteçleri kullanılarak araştırılmıştır.15 ISSR primeri 196 görünür DNA fragmenti oluşturmuş ve bunlardan 153 tanesi (% 78.06 oranında) polimorfik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Buna rağmen, popülasyon seviyesinde polimorfizm göreceli daha düşüktür (yaklaşık olarak % 45.60 civarında). Ortalama beklenen heterozigotluk ve Shaman bilgilendirici indeksi sırası ile tür seviyesinde 0.1759 ve 0.2811, popülasyon seviyesinde ise 0.1251 ve 0.1977 değerlerini göstermektedir. Nei'nin Gst değeri temeline dayanan genetik varyans (% 70.96) büyük oranda bireyler arası ve popülasyon içi olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen, popülasyonlar arasında sadece % 29.04 oranında genetik varyans gözlenmiştir. Pair-wise genetik tanımlama değerinin popülasyonlar arası ortalama değeri 0.9329 olarak bulunmuş ve AMOVA analizi ile de benzer genetik yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Nei genetik uzaklık algoritması UPGMA analizi ile popülasyonu üç ana gruba bölmektedir: QHDLA (Delingha), LZXJS (Xujiashan) ve geri kalan 5 popülasyon NXZN (Zhongning), NMWH (Wuhai), MQHLY (Minqin), JTDY (Jinta) ve AXTS (Anxi) olmak üzere. Mantel testi sonuçlarına göre, genetik uzaklık belirgin şekilde dikey jeografik dağılımla ilişkilendirilmiştir ($p < 0.001$) .

Welles ve Ellstran (2016) tarafından yapılan araştırmada, yeni ortaya çıkan türler olan neotürlerin (neospecies, yeni bulunan tür) hızla yayılıp hızla soyunun tükendiği görüşünü kanıtlamak için yaptığı çalışmada ilk kez Central Valley Kaliforniya'da gözlenen, istilacı *Salsola australis* ve *Salsola tragus* türlerinin hibridizasyonu ile

türeyen allopoliploid *Salsola ryanii* türünün keşfinden 10 yıl sonraki durumunu ISSR marker tekniği ile 810(UBC), 835(UBC), 840(UBC) ve 890(UBC) numaralı primerleri kullanarak Kaliforniya'nın 53 bölgesinden topladığı çeşitli *Salsola* türleri ile oluşturduğu sıralama ve 2002 yılındaki sıralama ile karşılaştırıp sıralamanın nasıl değiştiğini gözlemlemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Arazi Çalışmaları

Yapılan literatür ve herbaryum çalışmaları (ANK, GAZİ, HUB) ile *Salsola stenoptera* Wagenitz ve *Salsola anatolica* Allen taksonlarının ülkemizde yayılış gösterdiği Tuz Gölü yakınındaki lokaliteleri tespit edilmiştir (Şekil 3.1). Yapılan literatür çalışmaları ile simpatrik yayılış gösterdiği saptanan bu iki taksonun Tuz Gölü'nde aynı noktadan toplanmıştır.



Şekil 3.1 Konya Kulu ilçesine bağlı Akin Köyü'ndeki arazi alanından Tuz Gölü'nün genel görüntüsü

Belirlenen yayılış alanlarından (Şekil 3.2) herbaryum örnekleri toplanıp ''Flora of Turkey and East Aegean Islands I-XI'' (Davis 1965-1985, Davis 1988, Güner vd. 2000) eserlerine göre teşhis edilmiştir. Arazi çalışmaları sırasında belirtilen taksonların lokalite bilgileri (yer, mevki, yükseklik, habitat özellikleri, toplama tarihi, GPS koordinat bilgileri, toplayıcı numarası) arazi defterine kaydedilmiştir (Çizelge 3.1). Tüm popülasyonları temsil eden herbaryum örnekleri Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda saklanmaktadır.

Çizelge 3.1 Arazi çalışmaları sonucunda elde edilen birey sayısı, arazinin yapıldığı yer ve tarihi

Tür	Birey Sayısı	Arazi Bölgesi	Tarih
S. stenoptera	20	Konya Kulu Tuz Gölü kuzey kıyıları	11.08.2015
S. anatolica	20	Konya Kulu Tuz Gölü kuzey kıyıları	11.08.2015
S. stenoptera	20	Konya Cihanbeyli Bolluk Gölü kenarları	26.08.2015
S. anatolica	20	Konya Cihanbeyli Bolluk Gölü kenarları	26.08.2015

Yapılan araştırmalar ve elimizdeki olanaklar ışığında bitki örneklerinin DNA izolasyonuna uygun olarak DNA kaybetmeden en hızlı kurutma şeklinin silika jel olduğu tespit edilmiştir (Liston vd. 1990, Chase ve Hills 1991) (Şekil 3.3).



Şekil 3.2 Kırmızı daireler ile gösterilen arazi bölgelerinin Tuz Gölü'ndeki konumları (http://www.google.com 2005)

Arazi çalışmalarında alandan toplanılan örneklerin her birine ayrı ayrı GLZ 2015 001'den başlayan birey numaraları verilip her birinden genç yaprak örnekleri alınmış ve birey numaraları verilen genç yaprak örnekleri küçük zarflar içerisinde kilitli poşetlerde bulunan silika jellere konulup ağızlar sıkıca kapandıktan sonra DNA ekstraksiyonu yapılıncaya kadar -20 ºC'de saklanmıştır (Şekil 3.3). Arazide toplanılan her bir herbaryum örnekleri de uygun koşullarda kurutulup saklanmıştır.



Şekil 3.3 Silika jel içeren poşetlerde zarflar içerisinde kuruması beklenilen bitki örnekleri

3.2 DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

Bitki materyalleri, moleküler analizlerde kullanılan DNA materyali izole etmek amacıyla silika jel içeren poşetlerde -20 ℃' de saklanmıştır. Genç yaprak örneklerinden materyalin kalitesine bağlı olarak 0.05 g, 0.04 g, 0.03 g ya da 0.025 g ve materyali ezmek için aşındırıcı amaçlı kullanılan steril kumdan 0.01 g alınarak steril havanlarda ezilmiş ardından ezilen materyaller ependorf tüplerine alınmıştır. Geri kalan aşamalarda laboratuvar olanaklarımıza ve türümüze uygun MN kit kullanılmış ve bu kitte bulunan 2 ayrı prosedür aşağıda açıklandığı gibi elde edilen DNA'nın kalitesine bakılarak seçilerek kullanılmıştır.

2a prosedürü

- Ependorflara alınan ezilmiş örneğin içerisine 400 µl PL1 solüsyonu ve ardından 10 µl RNase eklenilerek vortekslenir.
- Vorteksin ardından 65 ℃'de ısıtılmış olan blok ısıtıcıda 30-60 dakika arası inkübasyona bırakılır (materyal 10'ar dakika ara ile çalkalanır).
- İnkübasyona uğrayan karışım MN kiti içerisinden çıkan mor halkalı filtreli tüplere boşaltılarak 2 dakika santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonunda mor halkalı filtreden geçip alt tüpte biriken sıvı yeni hazırlanan ependorflara konularak üzerine 450 µl PC solüsyonu eklenerek tekrar vortekslenir.
- Vortekslenen tüpün içerisindeki yaklaşık 700 µl olan sıvı MN kitinden çıkan yeşil halkalı filtreli tüpe aktarılıp 1 dakika santrifüjlenir.
- Yeşil halkalı filtreli tüpün altındaki tüpe biriken sıvı atılır ve yeşil halkalı filtreli tüpe 400 µl PW1 solüsyonu eklenerek 1 dakika santrifüj yapılır ve ardından tekrar alt tüpteki sıvı atılır.
- Yeşil halkalı filtreye 700 µl PW2 solüsyonu eklenir, 1 dakika santrifüjü yapılı ve tekrar sıvı dökülür.
- Son kez yeşil halkalı filtreye 200 µl PW2 solüsyonu eklenir, 2 dakika santrifüjlenir.
- Yeni hazırlanan ependorflara yeşil halkalı filtreler konulur ve 65 ℃'de ısıtılan PE solüsyonundan 50 µl eklenerek 5 dakika inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonun ardından 1 dakika santrifüj yapılır.
- Ardından tekrar 50 µl PE solüsyonu eklenerek 5 dakika inkübasyona bırakılan materyal 1 dakika daha santrifüjlenip ardından -20 ℃'de saklanır.

2b prosedürü

- Ependorflara alınan ezilmiş örneğin içerisine 300 µl PL2 solüsyonu ve ardından 10µl RNase eklenilerek vortekslenir.
- Vorteksin ardından 65 ℃'de ısıtılmış olan blok ısıtıcıda 30-60 dakika arası inkübasyona bırakılır (materyal 10'ar dakika ara ile çalkalanır).
- İnkübasyonun ardından 75 µl PL3 solüsyonu eklenerek 5 dakika buzda

bekletilir.

- İnkübasyona uğrayan karışım MN kiti içerisinden çıkan mor halkalı filtreli tüplere boşaltılarak 2 dakika santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonunda mor halkalı filtreden geçip alt tüpte biriken sıvı yeni hazırlanan ependorflara konularak üzerine 450 µl PC solüsyonu eklenerek tekrar vortekslenir.
- Vortekslenen tüpün içerisindeki yaklaşık 700 µl olan sıvı MN kitinden çıkan yeşil halkalı filtreli tüpe aktarılıp 1 dakika santrifüjlenir.
- Yeşil halkalı filtreli tüpün altındaki tüpe biriken sıvı atılır ve yeşil halkalı filtreli tüpe 400 µl PW1 solüsyonu eklenerek 1 dakika santrifüj yapılır ve ardından tekrar alt tüpteki sıvı atılır.
- Yeşil halkalı filtreye 700 µl PW2 solüsyonu eklenir, 1 dakika santrifüjü yapılı ve tekrar sıvı dökülür.
- Son kez yeşil halkalı filtreye 200 µl PW2 solüsyonu eklenir, 2 dakika santrifüjlenir.
- Yeni hazırlanan ependorflara yeşil filtreler konulur ve 65 ℃'de ısıtılan PE solüsyonundan 50 µl eklenerek 5 dakika inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonun ardından 1 dakika santrifüj yapılır.
- Ardından tekrar 50 µl PE solüsyonu eklenerek 5 dakika inkübasyona bırakılan materyal 1 dakika daha santrifüjlenip ardından -20 ℃' de saklanır.

Diğer DNA parmak izleme (fingerprinting) tekniklerinde olduğu gibi ISSR tekniğinde de PZR için kullanılan başlangıç DNA'nın saf olması ve konsantrasyonunun tüm reaksiyonlarda aynı olması çok önemlidir. Bu sebeple izolasyon sonucu elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri Nanodrop spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okunarak tespit edilmiş ve gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

3.3 DNA Konsantrasyonun Spektrofotometrik Ölçümü

İzolasyon sonucu elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri Nanodrop spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okunarak tespit edilmiştir.

Saf olabilmesi için 1.70 - 2.00 nm arasında olması gereken DNA'larımızın, saflığı 1.65 - 2.05 nm arasında olanları kullanılmış ve yaklaşık 11 ng/ul'ye seyreltilip PZR reaksiyonları için hazır hale getirilmiştir.

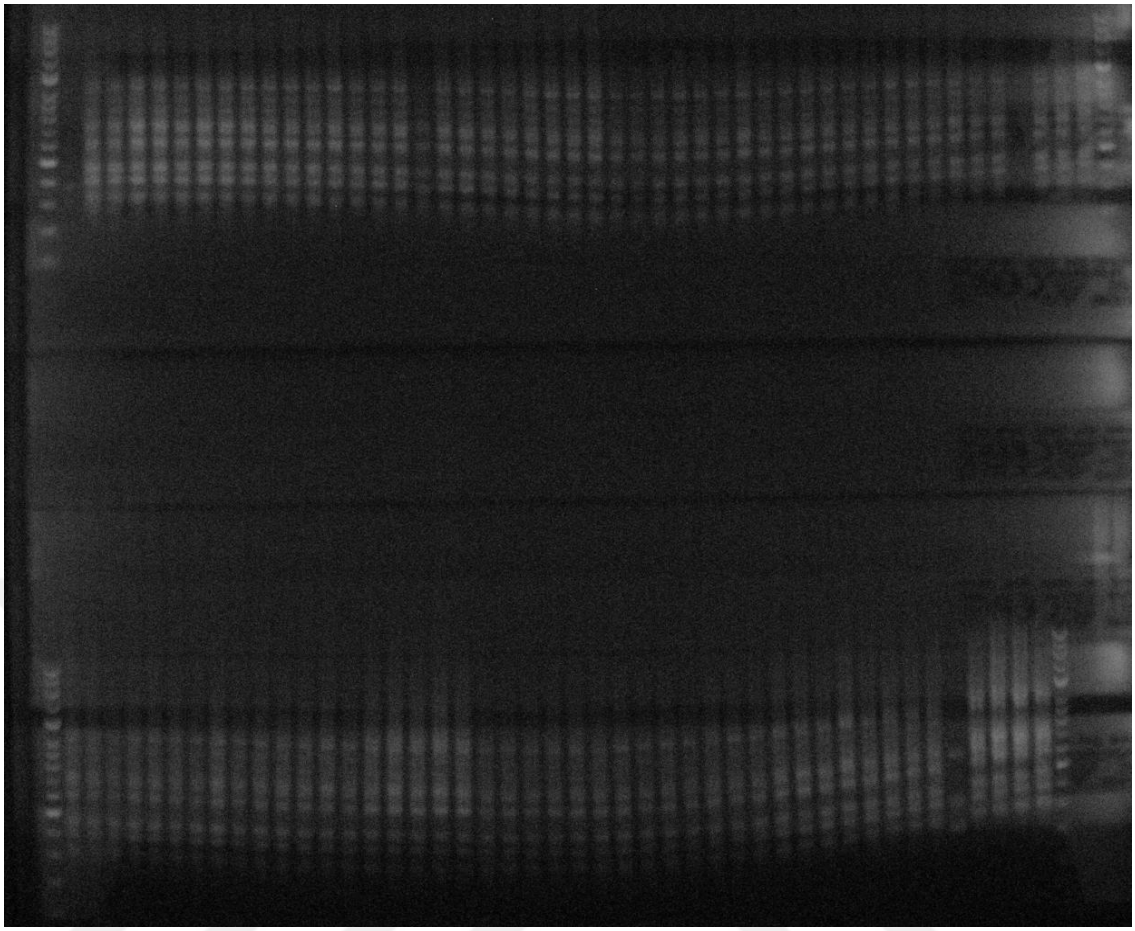
3.4 ISSR'nin Belirlenmesi İçin PZR Gerçekleştirilmesir

Çalışmamız için, çeşitli literatürlerden alınan farklı PZR reaksiyon karışımları, farklı PZR sıcaklıkları ve döngüleri ile yine farklı ISSR primerleri denenerek en uygun primerler ve reaksiyon karışımı ile uygun döngü sayısı belirlenerek çalışılmıştır.

PZR reaksiyonlarında Sobhian vd. (2003) tarafından polimorfik bulunan BDB CAC ACA CAC ACA CA dizisine sahip UBC 888 primeri ile Gao vd. (2009) tarafından ISSR-I ile isimlendirilen ve Ayres vd. (2009) tarafından da kullanılan AGA GAG AGA GAG AGA GC dizili UBC 808 primerler kullanılmıştır.

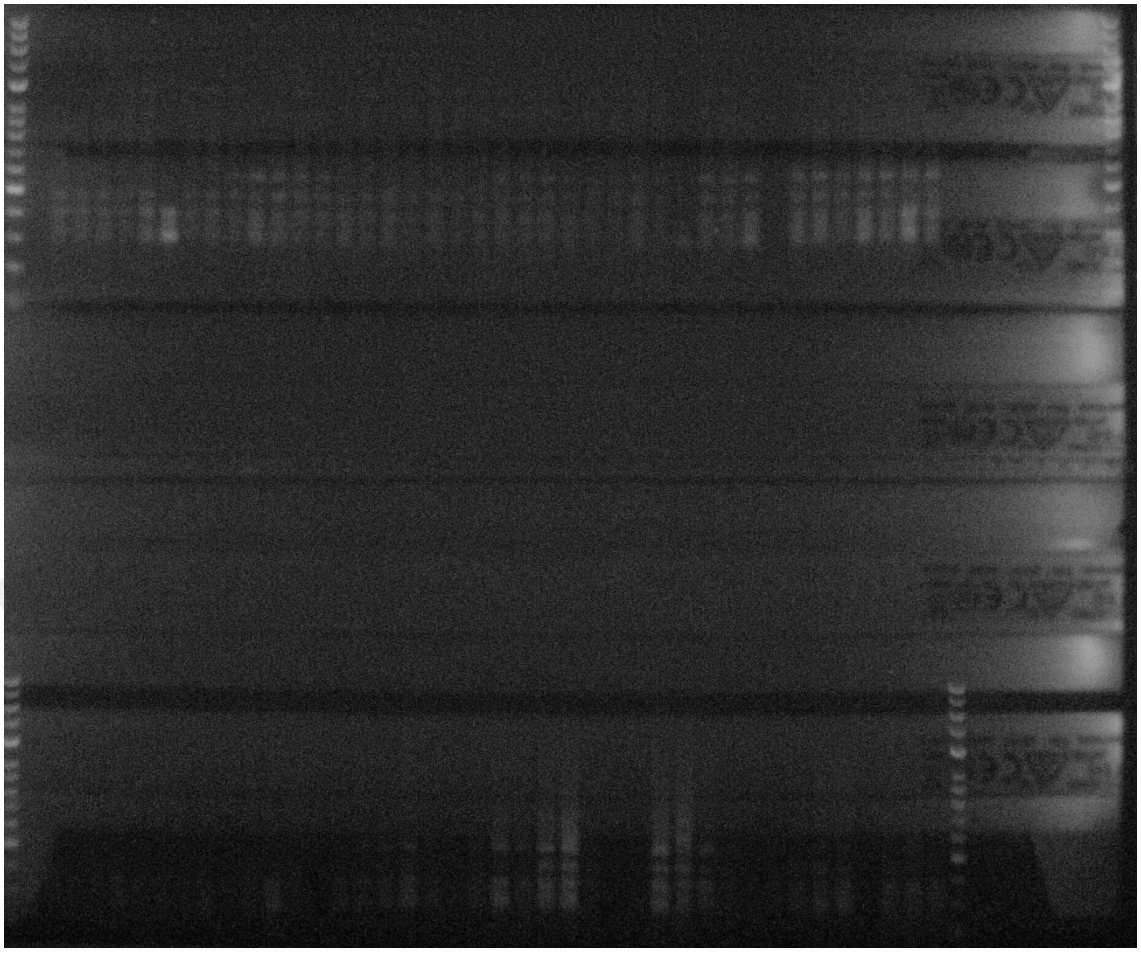
Yapılan optimizasyon çalışmaları sırasında UBC 888 primerinin annealing (bağlanma) sıcaklığı 56.5 ℃ belirlenirken UBC 808 primerinin annealing sıcaklığı 53.5 ℃ belirlenmiştir.

PZR reaksiyon karışımı 2mM $MgCl_2$, 1X buffer, 200uM dNTPs, 1pmol primer, 33ng DNA, %4 DMSO, 1U Taq polimeraz ile toplam hacmi 25ul olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan PZR reaksiyon karışımı 94 ℃ 5dk initial denaturasyon (ilk ayrılma); 40 döngülü 94 ℃ 3dk denaturasyon (ayrılma), 53.5 ℃-56.5 ℃ 40sn annealing (bağlanma), 72 ℃ 1dk extension (uzama); 55 ℃ 78sn final extension (son uzama), 72 ℃ 7dk final elongation (son uzama) protokolü kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 *Salsola stenoptera* ve *Salsola anatolica* türlerinin UBC 888 nolu primerde agaroz jel görüntüsü

Elde edilen PZR ürünleri loading solüsyaonu ile karıştırılıp 0,5X TBE ve 3ul Etidyum Bromür ile hazırlanan 1.2'lik agaroz jelde ilk yirmi kuyucuk *Salsola anatolica* onu izleyen yirmi kuyucuk *Salsola stenoptera* olacak şekilde 120V'da 2 saat yürütülmüştür (Şekil 3.4-3.5).



Şekil 3.5 *Salsola stenoptera* ve *Salsola anatolica* türlerinin UBC 808 nolu primerde agaroz jel görüntüsü

3.5 Veri Analiz Yöntemi

ISSR-PZR ürünleri agaroz jelde görüntülenen ISSR bant desenlerinin skorlaması çizelge 4.1-4.2'deki gibi var olan bantlar için 1, var olmayan bantlar için 0 şeklinde yapılmıştır, belirsiz olan bantlar 999 olarak kodlanmıştır. Bu veriler ışığında SYNTAX-2000 programında jacards benzerlik indeksi hesaplanarak UPGMA metodu ile kümeleme analizi yapılarak dendogramlar oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

4.1 Veri Analizi

Yapılan skorlama tablosunda *S. anatolica* türü 1-40 birey numaraları ile *S. stenoptera* türü ise 41-80 birey numaraları ile gösterilmiştir. 1-20, 41-60 birey numaraları ile gösterilen bitkiler Konya Kulu İlçesi Akin Köyü'nden toplanan örnekleri, 21-40, 61-80 birey numaraları ile gösterilen bitkiler Konya Cihanbeyli İlçesi Bolluk Gölü yakınlarından toplanan örnekleri göstermektedir (Çizelge 4.1-4.2).

UBC 808 numaralı primerin PZR ürünleri ile yapılan elektroforez ile *S. anatolica* türünün *S. stenoptera* türünden farklı olarak 2000 bç ve 500 bç de bant verdiği gözlenirken *S. stenoptera* türünün *S. anatolica* türünden farklı olarak 1300 bç de bant verdiği gözlenmiştir. Bunun dışında Konya Kulu alanından toplanan *S. stenoptera* bireylerinin 700 bç ve 275 bç de bant verdiği; ancak Konya Cihanbeyli alanından toplanan bireylerde ise bant vermediği gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

UBC 888 numaralı primerin PZR ürünleri ile yapılan elektroforezde ise *S. anatolica* türünün *S. stenoptera* türünden farklı olarak 1100 bç de bant verdiği gözlenirken *S. stenoptera* türünün *S. anatolica* türünden farklı olarak 200 bç de bant verdiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, 808 primerde olduğu gibi 888 numaralı primerde de Konya Kulu alanından toplanan *S. stenoptera* bireylerinin 500 bç de de bant verdiğinin görüldüğü, ancak Konya Cihanbeyli alanından toplanan bireylerde gözlenmediği ortaya çıkmıştır. Konya Cihanbeyli alanından toplanan *S. anatolica* türüne ait bireyler de 800 bç ve 700 bç de bant verirken 1- 20 birey numaraları ile gösterilen Konya Kulu alanından toplanan *S. anatolica* türüne ait bireylerde ise bant gözlenmemiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1 UBC 808 numaralı primerin skorlaması

UBC 808 ISSR primerinin skorlama tablosu

Bp/Birey	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
2000	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
950	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
600	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
500	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bp/Birey	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
950	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
850	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

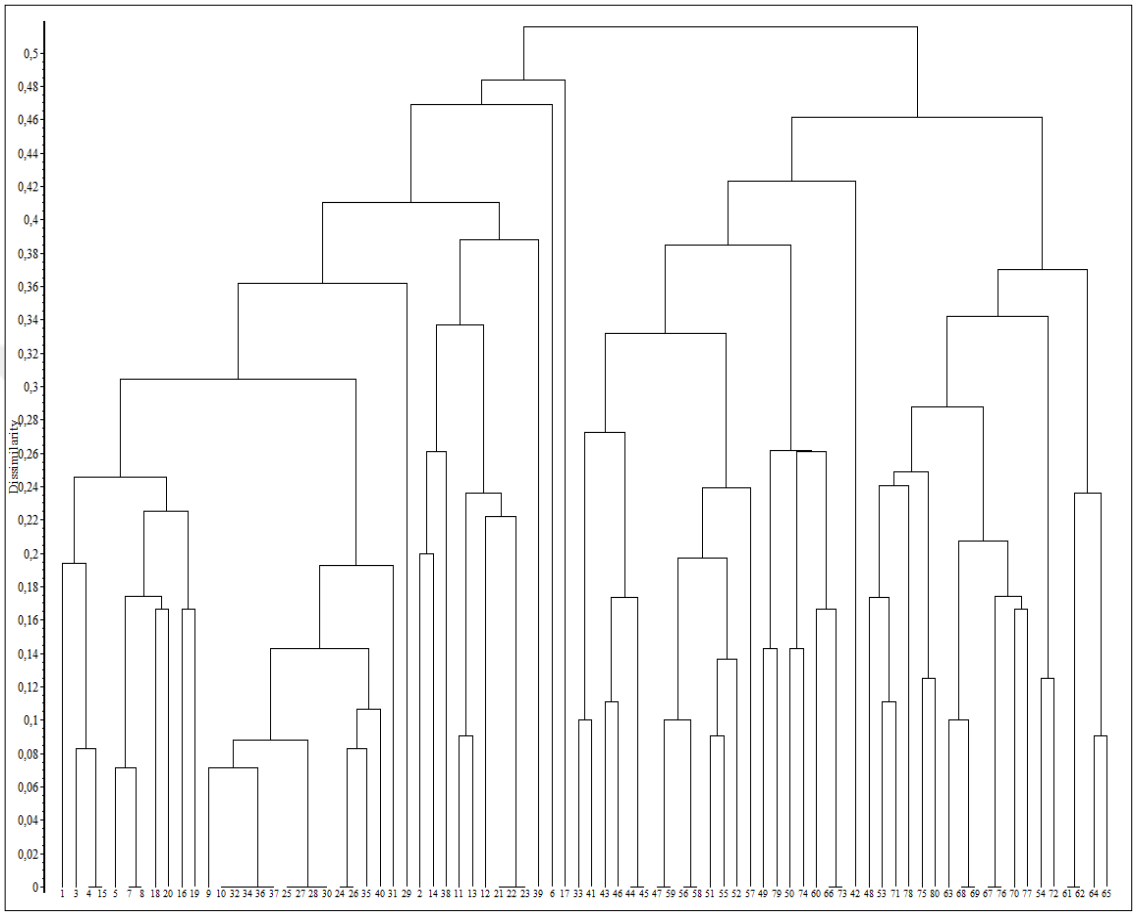
Çizelge 4.2 UBC 888 numaralı primerin skorlaması

UBC 888 ISSR primerinin skorlama tablosu

ByBirey	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ByBirey	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Yapılan skorlama verileri ışığında SYNTAX-2000 programında jacards benzerlik indeksi hesaplanarak UPGMA metodu ile kümeleme analizi yapılarak dendogramlar oluşturulmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 *S. anatolica* ve *S. stenoptera* türlerinden bireylerin ISSR verilerinin jacards benzerlik indeksi hesaplanarak UPGMA metodu ile kümeleme analizi yapılarak elde edilen dendogram

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yapılan analiz sonucu elde edilen dendogramda (Şekil 4.1) 1-40 nolu örnekler *S. anatolica* türüne ait bireylerdir ve tek bir kümede toplanmıştır. 41-80 nolu örnekler *S. stenoptera* türüne aittir ve yine tek kümede toplanmışlardır.

Bunun dışında *S. anatolica* türünde pek gözlenememesine rağmen *S. stenoptera* türünde kısmen lokal olarak farklılaşmalar olduğu gözlenmiştir.

Tüm bu veriler neticesinde, *S. anatolica* türünün *S. stenoptera* türünden genetik olarak izolasyon gösterdiği ve dolayısı ile farklı türler olduğu ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

Anonim. 2012a Web Sitesi: http://www.csb.gov.tr/projeler/ockb/index.php?Sayfa=sayfa&Tur=webmenu&Id=7793, Erişim Tarihi: 28.12.2017

Anonim. 2012b Web Sitesi: http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=1949, Erişim Tarihi: 17.01.2018

Anonim. 2012c Web Sitesi: http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=1950, Erişim Tarihi: 17.01.2018

Anonymous. 2005. Web Sitesi: http://www.google.com.tr/maps, Erişim Tarihi: 09.01.2018

Anonymous. 2002. Bern Convention / Convention de Berne 19.IX.1979. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Appendix I . CETS No.104

Aellen, P. 1967. Salsola In: P.H. Davis [ed.], "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", Vol. 2, 328-335. Edingburg University Press, Edinburgh.

Arnold, H.L. 1972. An analysis of the taxonomic status of a new taxon in the genus Salsola. PhD Dissertation, Utah State University, Logan

Ayres, D., Ryan, F. J., Grotkopp, E., Bailey, J. and Gaskin, J. 2009. Tumbleweed (*Salsola*, section *Kali*) species and speciation in California. Biological Invasions, 11: 1175-1187.

Bornet, B. and Branchard, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol. Report., 19,209-215.

Chase, M.W. and Hills, H.H. 1991. Silica gel: an idea material for field preservation of leaf samples for DNA studies. Taxon, 40: 215-220.

Culley, T.M. and Wolfe, A.D. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Ation (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR moleculer markers. Heredity, 86,545-556.

Davis, P.H. 1965-1985. Flora of Turkey and East Aegean Islands, vol. 1-9, Edinburgh: Edinburgh University Press.

Davis, P. H., Mill, R. R. and Kit, Tan. 1988. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" Vol. 10. Edinburgh University Press, Edinburgh.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Türkiye Tabiatı Koruma Derneği Yayınları, Ankara

Fang, D.Q. 1997. "Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers". Theor Appl Genet, 95, 408.

Gao, T., Gao, H., Zhang, Y., Xu, S. and An, L. 2009. Genetic diversity of *Salsola passerine* populations in northwestern China based on inter-simple sequence repeat (ISSR). Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), Vol. 45. no.2 A rtical ID: 0455-2059(2009)02-0066-09

Genişel, H. 2013. Türkiye Florası'ndaki Acı Çiğdem (Colchicum L.) Yeni Tür Adaylarının Karakterizasyonunda Issr Markörlerin Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji, 14, İstanbul

Godwin, I.D., Aitken, E.A.B. and Smith, L.W. 1997. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis, 18: 1524–1528.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Başer, K. H. C. 2000. Flora of Turkey and East Aegean Islands (Suppl. 2). Edinburg Univ. Press, Edinburg.

Güner, A., Akyıldırım, B., Alkayış, M. F. Çıngay B., Kanoğlu, S.S., Özkan, A.M., Öztekin, M. ve Tuğ, G.N. 2012. Türkçe bitki adları. Şu eserde: Güner, A., aslan, S. Ekim, T. Vural, M. ve Babaç, M.T. (edlr.). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları Flora Dizisi 1 İstanbul.

Liston, A., Rieseberg, L.H., Adams, R.P., Do, N. and Zhu, G. 1990. A method for collecting dried plant specimens for DNA and isozyme analyses, and the result of a field experiment in Xinjiang, China. Ann. Missouri Bot. Gard, 77: 859-863.

Meyer, W., Mitchell, T.G., Freedman, E.Z. and Vilgays, R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus* neoformans. J Clin Microbiol, 31: 2274–2280.

Qian, W., Ge, S. and Hong, D.Y. 2001.Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granula* from China detected by RAPD and ISSR markers. Theor Appl. Genet.,102, 440-449

Pradeep Reddy, M., Sarla, N. and Siddiq, E.A.2002.Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128: 9-7 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Ryan, F.J., Ayres, D.R. and Bell, D.E. 1999. There's more to tumbleweed(Russian thistle) than meets the eye. In: Kelly M, Howe M, Neill B (eds) Proceedings of the California exotic pest plant council symposium, vol 5. pp 11–19

Ryan, F.J. and Ayres, D.R. 2007. Molecular markers indicate two cryptic, genetically divergent populations of Russian thistle (*Salsola tragus*) in California. Can J Bot, 78:59–67

Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici, E., 2008. Tohumlu Bitkiler Sistematiği, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Sobhian, R., Ryan, F.J., Khamraev, A., Pitcairn, M.J. and Bell, D.E. 2003b. DNA phenotyping to find a natural enemy in Uzbekistan for California biotypes of *Salsola tragus.* L. Biol Control, 28:222–228. doi:10.1016/S1049-9644(03)00068-9

Uotila, P. 2011. Chenopodiaceae (pro parte majore). In: Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity.

Wagenitz, G. 1959. Salsola In: P.H. Davis [ed.], "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", Vol. 2, 328-335. Edingburg University Press, Edinburgh.

Wang, C., Zhang, H.,Qian, Z.Q. and Zhao, G.F. 2008. Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentapyhllum* (Thunb.) Makio based on ISSR polymorphism and its implications for conservation. Biochem. Syst. Ecol., 36, 699-705.

Welles, S.R. and Ellstrand, N.C. 2016. Rapid range expansion of a newly forrmed allopolyploid weed in the genus Salsola. American Journal of Botany, 103 (4): 1 – 5.

Wu, K., Jones, R., Dannaeberger, L. and Scolnik, P.A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. Nucleic Acids Res, 22: 3257–3258.

Yaprak, A.E. 2012. *Salsola*. In: Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M.T. (edr.) Türkiye

Zietkiewichz, E., Rafalkı, A. and Labuda, D. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) – Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification, Genomics, 20(2):176-183.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Güliz

Soyadı : DOĞAN

Doğum yeri : Yenimahelle - ANKARA

Doğum Tarihi : 01.01.1986

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce - Japonca

Eğitim Durumu:

Lise : Kaya Bayazıtoğlu Lisesi (2004)

Lisans : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2010)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü (Eylül 2014 – Şubat 2018)

Bilimsel Yayınlar

SCI İndekslerine Giren Dergide Yayınlanan Makale:

Dogan, G., Y., Tadama, T., Kohama, H., Matsumoto, A., Moriguchi, Y, Evidence of clonal propagation in *Cryptomeria japonica* D. Distributed on Pacific Ocean sine in Japan, *Silvae Genetica* Doi:10.1515/sg-2017-0007