

**T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN
ARTEMİSİA TÜRLERİNİN NÜKLEAR RİBOZOMAL DNA ITS
POLİMORFİZMİ**

SEÇİL EKER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

ORDU 2016

TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Seçil EKER tarafından hazırlanan ve Doç. Dr. Onur KOLÖREN danışmanlığında yürütülen “Doğu Karadeniz Bölgesi’ nde Yayılış Gösteren *Artemisia* Türlerinin Nükleer Ribozomal DNA ITS Polimorfizmi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 28/10/2016 tarihinde oy birliği ile Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Onur KOLÖREN

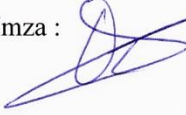
Başkan : Prof. Dr. Hüsrev MENNAN
: Bitki Koruma Anabilim Dalı,
Ondokuzmayıs Üniversitesi

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Onur KOLÖREN
: Bitki Koruma Anabilim Dalı,
Ordu Üniversitesi

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK
: Biyoloji Anabilim Dalı,
Ordu Üniversitesi

İmza : 

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun...03/11/2016 tarih ve 2016/4.95...sayılı kararı ile onaylanmıştır.

23.11.2016



TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



İmza

Seçil EKER

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDE YAYILIŞ GÖSTEREN *ARTEMİSİA* TÜRLERİNİN NÜKLEAR RİBOZOMAL DNA ITS POLİMORFİZMİ

Seçil EKER

Ordu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı, 2016
Yüksek Lisans Tezi, 45s.

Danışman: Doç. Dr. Onur KOLÖREN

Artemisia spp. bahçelerde, boş alanlarda ve yol kenarlarında görülen en önemli 10 yabancı ot cinsinden biri olarak kabul edilmektedir. Bitkinin yüksek uyum yeteneği, değişik morfolojik ve fizyolojik çeşitliliği sebebiyle dünyanın pek çok bölgesinde farklı ortamlarda görülür. Bu şekilde geniş bir dağılıma sahip olmasından dolayı tüm yabancı otlarda olduğu gibi *Artemisia* spp.'ninde kendi popülasyonu içerisinde sınıflandırma ihtiyacı duyulmaktadır.

Bitkilerin moleküler sistematüğinde, tür ve tür içi popülasyonların filogenetik analizlerinde en fazla tercih edilen moleküler markörlerden birisi ribozomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) gen bölgeleridir. ITS bölgelerinin yüksek oranda varyasyon göstermeleri taksonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde, cinsler arasında ve tür seviyesinde taksonomik sorunların çözülmesinde tercih edilmesine nedendir.

Bu çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi Giresun, Trabzon ve Rize illerinin farklı noktalarından toplanan 17 tane *Artemisia* spp.'nin popülasyon örnekleri ribozomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) gen bölgeleri kullanılarak genetik çeşitliliği belirlenmiştir. Sonuçlara göre, 4 haplotip bulunmuştur. Haplotip-I ve Haplotip-II, genotiplerinin *A. argyi* ve *A. sylvatica* türleri ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Haplotip-I'in, *A. argyi* ile % 99.6 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Haplotip-II'nin ise, *A. sylvatica* ile % 99.6 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Haplotip-III, *A. unalaskensis* ile % 98 oranında benzer bulunurken, Haplotip-IV, *A. koidzumii* ile % 92 oranında benzer bulunmuştur. Bu genetik çeşitliliğin farklı coğrafik bölgeler, farklı mücadele yöntemleri ve farklı tarımsal uygulamalar gibi pek çok faktör sebebiyle meydana gelebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Artemisia* spp., Genetik çeşitlilik, ITS, Ribozomal DNA

ABSTRACT

NUCLEAR RIBOSOMAL DNA ITS POLYMORPHISM OF *ARTEMISIA* SPECIES IN EASTERN BLACK SEA REGION

Seçil EKER

University of Ordu
Faculty of Agriculture
Department of Plant Protection, 2016
MSc. Thesis, 45p.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Onur KOLOREN

Artemisia spp., the ten most seen in the garden in the empty spaces and road sides is considered to be one of the weed. The plant's high adaptability is seen in various different environments in many parts of the world because of different morphological and physiological diversity. In this manner because it has a broad spectrum of weeds, as in all *Artemisia* spp. classification takes needs in their population.

Systematic molecular plant species and the phylogenetic analysis of intraspecific populations most preferred molecular markers from one ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) region genes. In determining the phylogenetic relationships between taxa show a high rate of variation of the ITS region, between the sexes and species level has led to the preferred means of resolving taxonomic problems.

This study East Black Sea Region Giresun, Trabzon and Rize provinces gathered from different points 17- *Artemisia* spp. population samples of ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) is determined genetic diversity using gene regions. According to the results, it was found 4 haplotypes. Haplotype-I ve Haplotype-II genotype was found that *A. sylvatica* and *A. argyi* similar types. Haplotype-I, *A. argyi* were determined by the similarity ratio of 99.6 %. Haplotype-II's, the similarities with *A. sylvatica* has been determined that the rate of 99.6 %. Haplotype-III *A. unalaskensis* were similar with 98 %, haplotype-IV *A. koidzumi* were similar with 92 %. This genetic variation is thought to occur due to many factors, such as different geographic regions, different control methods and different agricultural practices.

Keywords: *Artemisia* spp., Genetic diversity, ITS, Ribosomal DNA

TEŞEKKÜR

Tez konunun belirlenmesi, çalışmanın yürütülmesi ve yazımı esnasında en baőta danışman hocam Sayın Doç. Dr. Onur KOLÖREN'e ve laboratuvar çalışmalarında her daim destek veren ve ondan çok Őey öğrendiğim hocam Sayın Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN'e ve tez jüri yeleri olan sayın Prof. Dr. Hüsrev MENNAN ve Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK'e en içten teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin her aşamasında yanımda olan değerli eőim Samet EKER'e, hayatım boyunca yanımda olan sevgili anneme ve biricik kızıma yürekten teşekkür ederim.

Ayrıca TF-1459 numaralı Yüksek Lisans Tez Projesi olarak destek veren Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve personeline desteklerinden dolayı teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
ÇİZELGELER LİSTESİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR	IX
EKLER LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM	9
3.1. Materyal.....	9
3.1.1. Bitkisel Materyal.....	9
3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller.....	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması.....	12
3.2.2. Moleküler Çalışmalar.....	15
3.2.2.1. DNA İzolasyonu.....	15
3.2.2.2. Ribozomal DNA İnternal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgesi Analizi.....	19
3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama.....	21
3.2.2.4. PZR Polimorfizmi ve Genetik Farklılığın Hesaplanması.....	21
4. BULGULAR	22
4.1. Moleküler Bulgular.....	22
4.1.1. 18S-26S rDNA-ITS Gen Bölgesi.....	23

4.1.1.1. rDNA-ITS Geni ve Sekans Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri.....	23
4.2. <i>Artemisia</i> spp.'nin Filogenetik İlişkisi (Soy Ağacı).....	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
6. KAYNAKLAR	40
EKLER.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1.	<i>Artemisia</i> spp. bitki örneği.....	9
Şekil 3.2.	<i>Artemisia</i> spp. ile bulaşık fındık arazisi görüntüsü.....	10
Şekil 3.3.	<i>Artemisia</i> spp.'nin Türkiye üzerindeki dağılımı.....	11
Şekil 3.4.	Doğu Karadeniz Bölgesi haritası.....	13
Şekil 3.5.	Bitki örneklerinden DNA elde ederken sıvı azot ile fiziksel öğütme işlemi.....	15
Şekil 3.6.	Bitki örneklerinden elde edilen genomik DNA'nın elektroforez yapılarak agaroz jelde kontrolü.....	16
Şekil 3.7.	<i>Artemisia</i> spp. yapraklarından elde edilen genomik DNA'nın agaroz jel içindeki görüntüsü.....	19
Şekil 3.8.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aşamaları.....	20
Şekil 4.1.	Doğu Karadeniz Bölgesi'nden toplanan <i>Artemisia</i> spp. örneklerinin rDNA-ITS gen bölgesinin agaroz jel içindeki görüntüsü.....	22
Şekil 4.2.	Sekanslar sonucunda elde edilen <i>Artemisia</i> spp.'ler arasındaki filogenetik ilişki (soy ağacı).....	35

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. PZR çalışmalarında kullanılan ITS primerlerine ait bilgiler.....	12
Çizelge 3.2. Bitki örneklerine ait coğrafik bilgiler.....	14
Çizelge 4.1. Genbank' tan elde edilen <i>Artemisia</i> spp.'nin referans numaraları.....	23
Çizelge 4.2. rDNA-ITS gen bölgesi haplotipleri	24
Çizelge 4.3. Dört <i>Artemisia</i> spp.'ye ait rDNA-ITS gen bölgesi haplotiplerinin değişken pozisyonları	25
Çizelge 4.4. DnaSP (5.10) Programı ile elde edilen haplotiplere ait nükleotit değişimleri	31
Çizelge 4.5. Belirlenen rDNA-ITS haplotipleri arasındaki DNA dizilerinin yüzde (%) benzerlikleri ve ikili genetik mesafeleri (gri ile işaretli) ve Genbank'tan elde edilen <i>Artemisia</i> spp.'nin referans dizileri.....	34

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrant derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
AFLP	: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
bp	: Baz çifti
cm	: Santimetre
cpDNA	: Kloroplast DNA
CTAB	: Hekzadesil trimetil amonyum bromit
ddH ₂ O	: Steril su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	: Deoksy nükleotide triphosphate
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ETS	: External transcribed spacer
g	: Gram
GPS	: Küresel konumlama sistemi
ISSR	: Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm
ITS	: İnternal transcribed spacer
Kb	: Kilobit
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
ML	: Maximum-likelihood
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar

MP	: Maximum-persimony
NFW	: Nükleaz free water
ng	: Nanogram
NJ	: Neighbour-joining
nm	: Nanometre
OD	: Optik dansite
pH	: Potensiyel hidrojen
pmol	: Pikomol
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
rDNA	: Ribozomal DNA
RFLP	: Kesilen parça uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribo Nükleik asit
rpm	: Devir/saniye
rRNA	: Ribozomal RNA
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
spp	: Türler
SRAP	: Dizi ilişkili çoğaltılmış polimorfizm
SSR	: Basit dizi tekrarları
TAE	: Trisasetate etilendiamin tetraasetik asit
V	: Volt

EKLER LİSTESİ

<u>Ek No</u>		<u>Sayfa</u>
Ek 1.	Laboratuvar çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.....	43

1. GİRİŞ

Türkiye, çok fazla sayıda bitki türüne sahip olduğundan dolayı genetik çeşitliliği fazlasıyla yüksek bir ülkedir. Bu çeşitliliğin nedenlerine baktığımızda ise bunlar; iklim farklılıkları, ekolojik farklılıklar, yükseklik farklılıkları ve jeolojik çeşitlilikler olarak sıralanabilirler (Atalay, 1994; Çelik, 2003; Parmaksız, 2004). *Artemisia* spp. ve özellikle de *Artemisia vulgaris* meyve bahçelerinde görülen en önemli 10 yabancı ottan biri olarak kabul edilmektedir (Holm ve ark., 1996; Önen, 1999). Örneğin; dünyada *Artemisia* spp.'nin yaklaşık 400'ünün 23 tanesinin ülkemizde bulunduğu bildirilmiştir (Davis, 1975; Heywood ve ark., 1977). Bu türlerle yapılacak olan genetik karakterizasyon, ıslah çalışmalarına ve ayrıca genetik materyallerinin değerlendirilmesi açısından çok fazla önem taşımaktadır (Parmaksız, 2004).

Dünya üzerindeki dağılımı Kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde ve daha çok soğuk bölgelerde görüldüğü belirtilmiştir. Bitkinin yüksek adaptasyon yeteneği ile değişik morfolojik ve fizyolojik çeşitliliği sayesinde, dünyanın pek çok bölgesinde farklı ortamlarda görülür (Holm ve ark., 1996; Önen, 1999). Gormer ve Debraux (1961), çalışmalarına göre *Artemisia vulgaris* Batı, Orta ve Kuzey Avrupa da yoğun olarak, Güney Avrupa ve Sibirya'da ise daha nadir bulunduğu belirtilmiştir. Ülkemizde ise rastlandığı bölgelere baktığımızda, özellikle fındık ve meyve bahçelerinde gözlemlenmiştir (Anonim, 1995; Önen, 1999). Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde ise *Artemisia vulgaris* fındık bahçelerinde en fazla yoğunluğa sahip yabancı ot olarak bulunmuştur (Kasa, 1995; Önen, 1999). Karadeniz Bölgesi fındık bahçelerinde sorun olan yabancı ot türlerinden *Artemisia vulgaris* türünün rastlama sıklığınının % 51.85 oranında olduğunu bildirmişlerdir (Mennan ve ark., 1999).

Artemisia spp. güçlü olarak kültür bitkisi ile besin elementleri, su, ışıklandırma ve alanı kaplama yönünden rekabet eder. Yüksek bir çoğalma ve hızlı bir gelişmeye sahip olan pelinin bulaştığı alanlarda kısa sürede tam bir kaplama yapacağından ürün almak mümkün olmamakta ve iş gücünü büyük oranda artırmaktadır (Anonim, 1990; Önen, 1999). *Artemisia* spp. bu şekilde geniş bir dağılıma sahip olmasından kuşkusuz ki adaptasyon yetenekleri, rekabet gücü ve çok yıllık yaşamsal formundan kaynaklanmaktadır. İşte bu nedenden dolayı, tüm yabancı otlarda olduğu gibi

Artemisia spp.'ninde kendi popülasyonu içerisinde sınıflandırma ihtiyacı duyulmaktadır (Chapman, 2006).

Canlıları, benzerlik ve akrabalık derecelerine göre gruplara ayırmaya sınıflandırma adı verilmektedir. Bu tür çalışmalar, yabancı otların kültür bitkileriyle olan ilişkilerini belirlemek için ve bilgi edinmede, böylece onlar hakkında fikir yürütmemize yardımcı olmaktadır. Örneğin; belirli bir türün bütün üyeleri gelişim özellikleri bakımından, rekabet yeteneği bakımından benzerdir ve yaşamsal olarak da benzer alanlarda var olurlar (Hoffmann ve Frodsham, 1993).

Canlılar, çoğunlukla dış görünüşleri (morfolojik yapıları) ve çevreyle olan ilişkileri temel alınarak sınıflandırılmaktadır ve bu tür sınıflandırmalara Suni ya da Ampirik sınıflandırma adı verilmektedir. Fakat yapılan bu sınıflandırma günümüzde geçerliliğini yüksek oranda kaybetmiştir (Hoffmann ve Frodsham, 1993). Diğer bir sınıflandırma tekniği ise; canlıların anatomik, fizyolojik ve köken benzerlikleri, akrabalık dereceleri göz önüne alınarak yapılan sınıflandırma yani Bilimsel (Doğal ya da Filogenetik) sınıflandırmadır. Bu sınıflandırma kullanılan temel özelliklerden biride moleküler teknikler (genetik markörler) kullanılarak yapılan sınıflandırmadır ve son zamanlarda canlıların sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Hoffmann ve Frodsham, 1993).

Genetik markörler kendi içerisinde iki alt bölümden oluşmaktadır. Bunlardan ilki morfolojik markörler ya da biçimsel markörler olup kendi içerisinde göz ile görülen ve fenotipik markörler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bir diğer genetik markör ise moleküler markörler olup kendi içerisinde Protein ve DNA markörleri olarak iki kısımdan oluşmaktadır.

Morfolojik markörler; Bitkiler de morfolojik karakterlere bakılarak yani bitkilerin kalıtsal yapısını dışa akseden gözle görülen kısmın tümüne dayalı yapılan sınıflandırmadır ve bu sınıflandırmada bitkilerin ayırt edici kısımları (bitki boyu, yaprak boyu, kapsül eni, kapsül boyu, çiçeklenme zamanı gibi vs.) ve bu kısımların birbirlerine olan oransal, şekilsel ve işlevsel yapılarına bakılarak yapılmaktadır. Moleküler markörler; bitki sistematğinde kullanılan markörler ise Protein ve DNA markörleridir. DNA markörleri, popülasyonun ya da bireylerin ya da her ikisinin birbirleriyle olan türler içi ve türler arası ilişkinin genetik farklılıklarını ölçmek için

çok önemli ve genel bir kıstastır. Modern moleküler biyolojideki benzersiz gelişimi, özellikle bu DNA markör teknolojisi, bitkiler üzerindeki moleküler düzeydeki ekolojik araştırmalarda bu markörlerin kullanım alanlarının gelişimi ve yeni tekniklerin oluşturulması için oldukça önemlidir.

Bu çalışmada; Doğu Karadeniz Bölgesi Giresun, Trabzon ve Rize illerinden toplanmış olan *Artemisia* spp.'nin genetik farklılıklarının ITS primerleri yardımıyla PZR tekniği kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bahçelerde ve boş alanlarda en çok rastlanan yabancı ot türlerinden biri olan *Artemisia* spp. ile ilgili ileride yapılacak olan daha geniş kapsamlı çalışmalara zemin oluşturacak olması çalışmanın önemini arttırmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kornkven ve ark.'na (1998) göre, *Artemisia* spp. bölümlerinden *Tridentatae* 11 türden oluşmaktadır ve Kuzeybatı Amerika'da oldukça yaygındır. Çalışmalarında nükleer ribozomal DNA internal transcribed spacer (ITS) gen bölgeleri sekanslarını soy ağacını oluşturmak, tür içi ve türler arası ilişkileri çözümlmek için kullanmışlardır. Datalar sonucunda *Tridentatae*'nin içinde *A. bigelovii* ve *A. palmeri* türlerini belirlemişlerdir. Ancak, ITS verileri türler arası ilişkileri ve *Tridentatae*'nin büyük soylarının çeşitliliğini belirlemede tam anlamıyla yeterli gelmemiştir ve daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulacağına karar vermişlerdir.

Valles ve McArthur'a (2001) göre, *Artemisia* spp. (Asteraceae, Anthemideae, Artemisiinae) familyasındaki en büyük cinslerden birisidir. 500 kadar taksonu vardır ve 5 adet altcins ayrılır. Bazı cinslerin değişmez ve karakteristik özellikleri olmasına rağmen morfolojik çeşitlilik yüksek oranda mevcuttur. *Artemisia* spp. 2 temel kromozom sayısına sahiptir, bunlar $x=9$ ve $x=8$ 'dir. Çok kromozomluluk ve az kromozomluluk iki birbiriyle çok ilişkili evrimsel mekanizmalardır, özellikle ilki tüm büyük gruplarda önceliklidir. *Artemisia* spp.'nin klasik sistematigi moleküler yöntemlerle daha da incelenmiştir. Bu çalışma, sitogenetik ve moleküler veriler tarafından aydınlatılarak özellikle *Artemisia* spp.'nin sistematigi ve değişimi hakkında bize genel bir bilgi sağlamaktadır.

Plevnes ve ark., (2009), *Artemisia* spp.'nin 5 türünün morfolojik ve genetik çeşitliliğini belirlemişlerdir. Bu türler; *A. abrotanum* L., *A. dracuncululus* L., *A. absinthium* L., *A. pontica* L. ve *A. vulgaris* L.'dir. *Artemisia* spp. bitkileri arasında morfolojik farklılığı belirlemek için biometrik ölçümler kullanmışlardır. Bunlar; büyüme dinamiği, bitki boyu, yaprak çifti genişliği ve uzunluğu gibi ölçümlerdir. Moleküler yöntem olarak ISSR amplifikasyonunu kullanarak *Artemisia* spp. arasındaki genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. 40 farklı primer kullanılmış ve 15'inden sonuç elde edilmiştir. Toplamda, 120 bant çoğaltılmış ve 71'inin polimorfik olduğu ve 49'unun da spesifik türler olduğunu belirlemişlerdir. Filogenetik benzerlik dendogram analizi % 3.6'dan % 56.7'ye kadar geniş bir aralıkta hesaplandığı için, bu çalışılan türler arasındaki genetik çeşitliliğin geniş bir döngüye sahip olduğunu belirtmişlerdir. En büyük genetik benzerlik oranı %56.7 ile *A. absinthium* ve *A.*

abrotanum türleri arasında belirlenmiştir. Genetik benzerlik *A. vulgaris* ve *A. dracunculus* türleri arasında % 49.6 iken, *A.pontica* ve *A. abrotanum* türlerinde % 15 oranında belirlenmiştir.

Pellicer ve ark., (2009) yaptıkları çalışmalarında, 67 *Artemisia* spp.'nin bulunduğu 84 populasyon örneğinde genomların büyüklüğünü belirlemiş ve bu populasyonlardan *Crossostephium chinense*'yi kaydetmişlerdir. Bazı soylar arasındaki alt türlerde genom boyutlarında oluşan heterojen değişiklikler yüzünden hala filogenetik ilişkiler belirsizdir. Bu çalışmada *Artemisia* spp.'nin kromozom sayısı artış seviyesinin orantılı olmadığı doğrulanmıştır. Sonuçlar, Michaelis–Menten methodu ile aynı fikirdedir, genom boyutları doygunluk davranışı göstererek maksimuma eğilimlidir. Sonuç olarak, bu çalışma ile artan genom büyüklüklerinin doğrusal olmadığı desteklenmiştir.

Hasan ve ark., (2009), yaptıkları çalışmalarında *Artemisia* spp.'nin filogenisi ve sınıflandırması tartışmışlardır. Avrasya, Kuzey Amerika ve Asya'nın ılıman bölgelerine kadar çeşitliliğin dağıldığını saptamışlardır. Bu tür kendi içinde 5 büyük gruba ayrılır, bunlar; *Absinthium* DC., *Artemisia* L., *Dracunculus* Besser, *Seriphidium* Besser ve *Tridantatae* McArthur'dur. Bu çalışma, modern moleküler tekniklere dayalı doğal bir sınıflandırma kurmak için yeni genom bölgeleri aramamıza gerek olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmalarında, *Artemisia capillaris*'in bireyleri arasındaki genetik çeşitlilik Malezya'nın Terengganu ve Kelantan bölgelerinde RAPD yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Örnekler Terengganu ve Kelantan'ın farklı bölgelerinden toplanmıştır. Bitki yapraklarından genomik DNA Sarkosyl methodu kullanılarak izole edilmiştir. Sonuçlar, RAPD bantları ile açıkça görülmüştür. İncelenen 77 primerden 10 tanesi çalışılmış ve DNA çoğatılmıştır. Primerler; OPA 04, OPA 09, OPA 16, OPA 17, OPA 18, OPG 03, OPG 05, OPG 09, OPG 15'dir. Toplamda Terengganu örneklerinden 335, Kelantan örneklerinden 370 RAPD bantları elde edilmiştir. Terengganu örneklerinde polimorfik bantların boyutu 150-3000 bp arasında ve % 100 polimorfikken, Kelantan örneklerinde 124 bant polimorfiktir (% 95) ve bantların boyutu 200-2500 bp arasında hesaplanmıştır.

Eserkaya ve ark.'na (2010) göre, gelecekte artması beklenen nüfusun temel besin ihtiyacı da artacağı için, bu ihtiyaçları karşılamada yeterli olmak için üretimin artırılması gerektiğini vurgulamışlardır. Bu sebeple üretimi arttırmanın en etkili yolunun bitki ıslahı olduğu düşünülmektedir. Fakat pek çok bitki türünde genetik çeşitlilik daralma gösterdiğinden dolayı gerekli tescilli çeşitlerin genlerinin kültür çeşitlerine aktarılması gerekmektedir. Ancak bu konuda pek çok problemlerle karşılaşmaktadır. Markör kullanılarak yapılan seleksiyon işlemleri bitki ıslahında karşılaşılan bu sorunlara çözüm bulmak amacıyla geliştirilmiştir. Markör kullanılarak yapılan seleksiyon tekniği, gen transferleri, gen izolasyonları ve klonlama gibi işlemlerde kullanılmaktadır. Bu yöntem oldukça hızlı, ekonomik ve doğrudur ki klasik ıslaha fazlasıyla yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Filiz ve Koç'a (2011) göre, biyoteknoloji günümüzün en ünlü ve yeniliklere açık bilimsel çalışmalarının başında gelmektedir. Özellikle bitki biyoteknolojisinde kullanılan moleküler markör teknolojileri çok önemli bir araçtır. Moleküler markör demek; genomda herhangi bir gen bölgesini temsil eden DNA parçası demektir. Polimer Zincir Reaksiyonunun (PZR) bulunmasından sonra Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm (AFLP), Basit Dizi Tekrarları (SSR), Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (SRAP), Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ve Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (ISSR) gibi çok fazla sayıda moleküler markör teknikleri bulunmuştur. Bu markör teknikleri; soy ağacı çalışmaları, yeni gen keşifleri, genetik çeşitlilik araştırmaları gibi çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak, bu moleküler markörler biyoteknolojik çalışmalara çok önemli katkılar sağlamış ve etkili ve hızlı sonuçların alınmasına yardımcı olmuştur. Bu çalışmada ise; kullanılan moleküler markör tekniklerin genel koşulları, faydaları, zararları ve uygulama ortamlarından bahsedilmiştir.

Kürşat ve Civelek, (2011) çalışmalarında, Türkiye'de kendiliğinden yetişen ve biyolojik açıdan birbirine çok benzer olan *Artemisia haussknechtii* Boiss., *Artemisia splendens* Willd. ve *Artemisia caucasica* Willd. türlerini morfolojik özellikleri bakımından incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada Türkiye'de doğal olarak yetişen *Artemisia* spp.'nin tüm taksonları üç altcins (*Artemisia*, *Dracunculus* ve *Seriphidium*) içerdiğini saptamışlardır. Bu çalışmadaki üç türde de *Artemisia* Less. türüne ait altcinsler yer almıştır. Türlerin Türkiye Florası'nda verilen özellikleri genişletilerek

bazı farklılıklar ve yeni bazı morfolojik özellikler tespit edilmiştir. Bu çalışma, bu türlerin iyi tanınması için önemli morfolojik özellikleri belirlemiş ve gelecekte yapılacak olan daha geniş kapsamlı çalışmalar için zemin hazırlamıştır.

Nazar ve Mahmood'a (2011) göre, *Artemisia* spp. Asteraceae'nin önemli bir türüdür, ekolojik ve ekonomik açıdan önemlidir. *Artemisia* spp.'nin doğal sınıflandırması henüz tam olarak belirlenememiştir ve taksonomiciler geçen 20 yılı aşkın süredir bu problemi çözmeye çalışmaktadır. Bu çalışmada *Artemisia* spp.'yi 5 büyük bölüme ayırarak isimlendirmişlerdir; *Absinthium*, *Artemisia*, *Dracunculus* Besser, *Seriphidium* Besser ve *Tridentatae*. Çalışmalarında topladıkları bitki örneklerinden 3 tür belirlemişlerdir. Bunlar; *A. vulgaris*, *A. roxburghiana* ve *A. absinthium*'dur. Moleküler çalışmalarda, türler arasında genetik çeşitliliği belirlemek için RAPD PZR yöntemi kullanmışlardır. 10'dan fazla rastgele primer seçerek kullanılmış ve bunların 9'u sonuç vermiştir. Bütün bu primerlerden toplamda 611 adet bant elde edilmiş, bunların 419'u polimorfik ve polimorfizmin seviyesi % 68 oranında belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tür içi ve türler arası hem morfolojik hem de moleküler çeşitliliğin seviyesi geniş bir aralıkta gözlemlenmiştir.

Badr ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada, aromatik bir yabancı ot olan *Artemisia* spp.'nin yedi doğal popülasyonu arasındaki genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. Mısır'da Güney Sinai'nin farklı noktalarından *Artemisia judaica* örnekleri toplamış ve RAPD yöntemi kullanılarak incelemişlerdir. Toplamda 87 bant çoğaltılmıştır, bunun 50'si polimorfik çıkmıştır. RAPD primerleri olarak 10 tane primer seçilmiş ve polimorfizm oranı % 57.47 olarak bulunmuştur. Bu demektir ki, incelenen örnekler genetik çeşitlilik göstermektedir. RAPD markörleri, incelenen popülasyonlar arasındaki benzerliği hesaplamak ve bunların arasındaki genetik mesafeyi gösteren bir soy ağacı oluşturmak için kullanılmıştır. Bu veriler, bu türleri koruma ve toplama stratejileri için önemli temel veriler sağlamıştır.

Haghighi ve ark., (2014) çalışmalarında, *Artemisia* (Asteraceae) türünün taksonomik ve filogenetik ilişkilerini tartışmışlardır ve 1'den 8'e *Artemisia* spp.'nin farklı türünün olduğunu düşünmektedirler. Bu çalışmada, *Artemisia* spp.'nin filogenetik ilişkilerini nüklear ribozomal ITS ve kloroplast DNA gen bölgelerini kullanarak yeniden incelemişlerdir. İnceledikleri cinsler; *Artemisia*, *Dracunculus* ve

Serphidium'dur. İnan Tebriz ve Trabzon Horasan bölgelerinden toplamda 39 tane populasyon örneği toplamışlardır. Bu 39 populasyon örneği içerisinde 15 tane türün *Artemisia*, *Serphidium* ve *Dracunculus* içinde olduğunu belirlemişlerdir. Bunlar; *Artemisia fragrans*, *A. scoparia*, *A. incana*, *A. spicigera*, *A. austriaca*, *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. absinthium*, *A. sieberi*, *A. biensis*, *A. diffusa*, *A. campestris*, *A. chamaemelifolia*, *A. kopetdaghensis* ve *A. aucheri*'dir. ITS sekansları sonucunda 672 bp'de *Artemisia vulgaris* tanımlanırken, 707 bp'de *Artemisia biennis* tanımlanmıştır. Fakat, kloroplast DNA sekanslarında 420-465 bp'de *Artemisia kopetdaghensis* ve *A. scoparia* türlerini tanımlamışlardır. *Artemisia*, *Serphidium* ve *Dracunculus* türleri arasındaki varyasyon oranlarını ITS gen bölgelerini kullanarak % 55.29 bulurken, kloroplast DNA gen bölgelerini kullanarak % 41.52 oranında bulmuşlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Artemisia spp. yabancı otu ülkemizde, yabani pelin, koyun otu, misk otu ve yavşan otu gibi isimlerle de tanınmaktadır (Akalin, 1954; Özer ve ark., 1996; Önen, 1999). Morfolojik açıdan; 100 cm'ye kadar uzayabilen otsu veya çalimsı formda çok yıllık, rizomlu bir bitkidir. Gövde kahverengimsi, dik ve köşeli dallanmıştır. Yapraklar ince, uzun ve 3-5 parçalıdır. Yaprığın üst yüzeyi tüsüz, alt yüzeyi beyaz keçe gibi tüylerle örtülüdür. Çiçekler birleşik salkım şeklinde dizilmiş, çiçek sapı kısa, çiçek tablası tüsüz ve kokuludur. Temmuz-Eylül aylarında çiçek açar. Meyve 1.1-1.5 mm uzunlukta, oval, gri-kahverengi olup üzerinde gümüşü çizgiler bulunmaktadır. Bitki ortalama 50.000-70.000 tohum oluşturabilir. Besin maddelerince zengin, kireçli, tınlı-kumlu, sulanan ve taban toprakları sever (Ak ve ark., 2011).



Şekil 3.1. *Artemisia* spp. bitki örneği (Anonim, 2016a)

Artemisia spp. tıbbi olarak, solucan düşürücü, karın ağrılarına ve kasılmalarını dindirici, idrarı artırıcı, yatıştırıcı, ayrıca cilt hastalıklarına, yaralara ve astıma karşı ilaç olarak kullanılmaktadır (Holm ve ark., 1996; Önen, 1999). *Artemisia* spp. pestisit olarak ise, içerdiği bileşikler insektisit ve larvasit (böcek ve larvalarına karşı) etkiye sahiptir. Yerleşim alanlarında sinek ve sivrisinekleri kovucu (repellent) etkisinden yararlanılmaktadır (Fogelfors, 1984; Misra ve ark., 1986; Önen, 1999). Ayrıca bakterisit ve fungusit etkiye sahip olup (Kaul ve ark., 1976), *Artemisia* spp.'den elde edilen insektisit ve herbisit etkili Comphor (Taxophen ticari isimli) Kuzey Amerika'da uzun süre satılmıştır (Duke ve ark., 1988; Önen, 1999).

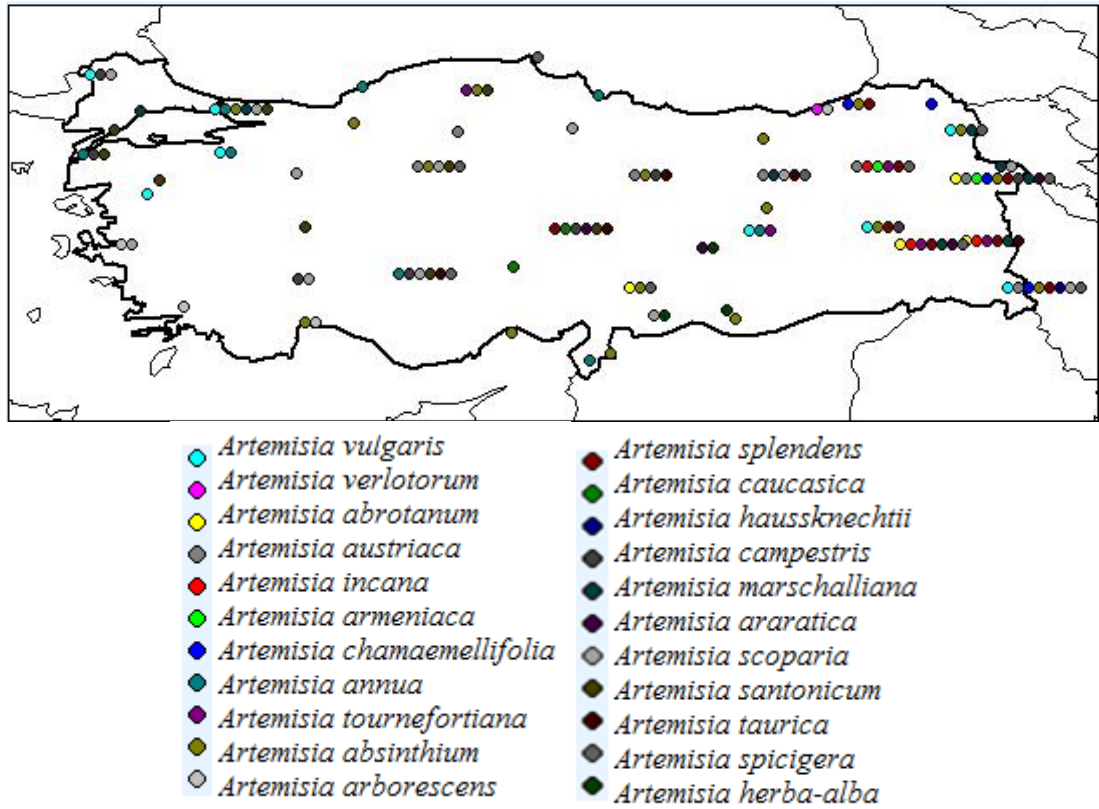
Tıpkı diğer bitkiler gibi *Artemisia* spp.'de zengin polisakkarit içermesi ve sekonder metabolitlere sahip tıbbi aromatik bir bitki olması nedeniyle DNA izolasyonu zordur. Son yıllarda yaygın olarak kullanılan CTAB (cetyl trinethyl ammonium bromide) DNA izolasyon protokolü pek çok farklı bitkide (pamuk, meyve ağaçları gibi) yüksek kalitede DNA ekstraksiyonu sağlamaktadır (Michiels ve ark., 2002). *Artemisia annua*, *A. tourenfortiana*, *A. gmelinii*, *A. dracunculus*, *A. sieversiana* gibi *Artemisia* spp.'den polisakkarit ve sekonder metabolitlerden uzaklaştırılmış saf DNA eldesi için modifiye CTAB protokolü kullanılmıştır. Modifiye edilmiş bu protokol ile oldukça etkili daha saf *Artemisia* spp. DNA'ları elde edilmiştir.



Şekil 3.2. *Artemisia* spp. ile bulaşık fındık arazisi görüntüsü

Dünyada *Artemisia* spp.'ye ait yaklaşık 400 türün 23 tanesinin ülkemizde bulunduğu bildirilmiştir (Davis, 1975; Heywood ve ark., 1977). Dünya üzerindeki dağılımı Kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde ve daha çok soğuk bölgelerde görüldüğü belirtilmiştir. Bitkinin yüksek uyum yeteneği ile değişik morfolojik ve fizyolojik çeşitliliği sayesinde, dünyanın pek çok bölgesinde farklı ortamlarda görülür (Holm ve ark., 1996; Önen, 1999). Gormer ve Debraux (1961), çalışmalarına göre *Artemisia vulgaris* Batı, Orta ve Kuzey Avrupa da yoğun olarak, Güney Avrupa ve Sibirya'da ise daha nadir bulunduğu belirtilmiştir.

Ülkemizde ise rastlandığı bölgelere baktığımızda, özellikle fındık ve meyve bahçelerinde gözlemlenmiştir (Anonim, 1995; Önen, 1999). Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde ise *Artemisia vulgaris* fındık bahçelerinde en fazla yoğunluğa sahip yabancı ot olarak bulunmuştur (Kasa, 1995; Önen, 1999).



Şekil 3.3. *Artemisia* spp.'nin Türkiye üzerindeki dağılımı (TÜBİVES, 2014)

Artemisia spp. bu şekilde geniş bir dağılıma sahip olmasından kuşkusuz ki adaptasyon yetenekleri, rekabet gücü ve çok yıllık yaşamsal formundan kaynaklanmaktadır. İşte bu nedenden dolayı, tüm yabancı otlarda olduğu gibi

Artemisia spp.'ninde kendi popülasyonu içerisinde sınıflandırma ihtiyacı duyulmaktadır (Chapman, 2006).

3.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Materyaller

Moleküler çalışma aşamasında, bitki örneklerinden DNA elde etmek için bu işlemde DNA'nın kimyasal ve fiziksel etkilere maruz bırakılması ile diğer moleküllerden ayrılması sağlanmıştır. DNA bulunduran biyolojik materyalin kimyasal bir değişikliğe uğramasına fırsat vermeden sıvı nitrojen (sıvı azot) ile fiziksel olarak öğütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon prosedürü olarak DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany kullanılmıştır (Handbook, Qiagen, UK, Danquash ve ark., 2002). Ekstraksiyonun kalitesi ve DNA içeriği elektroforez jelle kontrol edilmiştir. Elde edilen elektroforez jel görüntülerine bakılarak saf bir DNA elde edilemediği düşünülmüştür. Çünkü; tıpkı diğer bitkiler gibi *Artemisia* spp.'de zengin polisakkarit içermesi ve sekonder metabolitlere sahip tıbbi aromatik bir bitki olması nedeniyle DNA izolasyonu zordur. *Artemisia* spp. için pek çok protokol kullanılmıştır. Ancak, saf DNA izolasyonu ve yüksek kalitede ürün eldesi gerek ticari kitler gerekse kullanılan protokoller ile mümkün olmamıştır. Bunun sonucunda, Haymes'in (1996) CTAB protokolü modifiye edilerek tıbbi ve aromatik bir bitki olan *Artemisia* spp. yapraklarından DNA elde edilmiştir.

Elde edilen DNA'ların PZR çalışmaları için Ribozomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS) gen bölgeleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PZR çalışmalarında kullanılan ITS primerlerine ait bilgiler

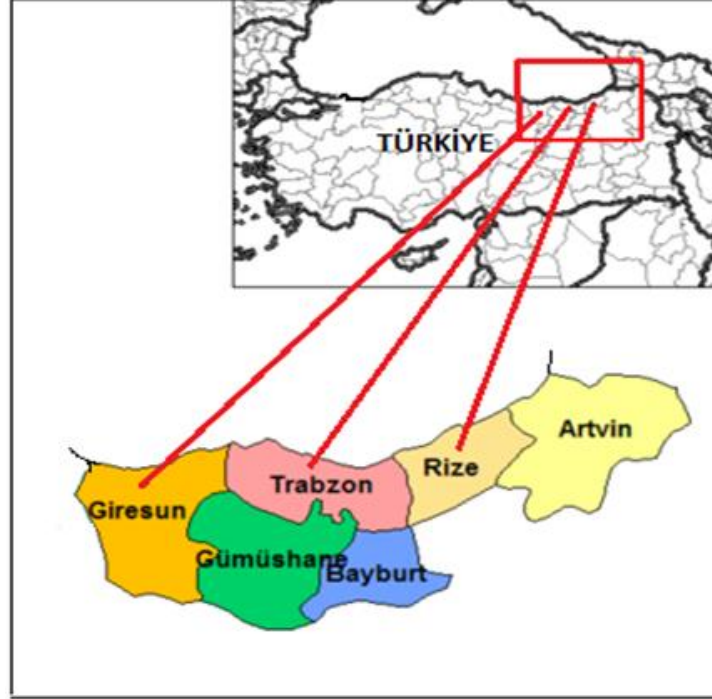
Primer	Baz dizisi	pmol/µl
ITS1	5' AATGCGTGTTT 3'	100 pmol/µl
ITS4	5' GTCTAGTTCAG 3'	100 pmol/µl

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması

Doğu Karadeniz Bölgesi tarım alanlarında sorun olan *Artemisia* spp.'nin genetik farklılıklarının ITS primerleri yardımıyla PZR tekniği kullanılarak belirlenmesi

amaçlanan çalışma için, Doğu Karadeniz Bölgesi'ni temsilen Giresun, Trabzon ve Rize illerinin fındık bahçeleri ve boş alanlarından toplamda 17 tane *Artemisia* spp. populasyon örneği toplanmıştır (Şekil 3.4). Örnek alınan alanların konumları GPS cihazı ile kaydedilmiştir (Çizelge 3.2). Toplanan bitki örneklerinin genç yaprakları DNA izolasyonu için küçük poşetlere alınarak buz kapları ile laboratuvara taşınmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Doğu Karadeniz Bölgesi Haritası

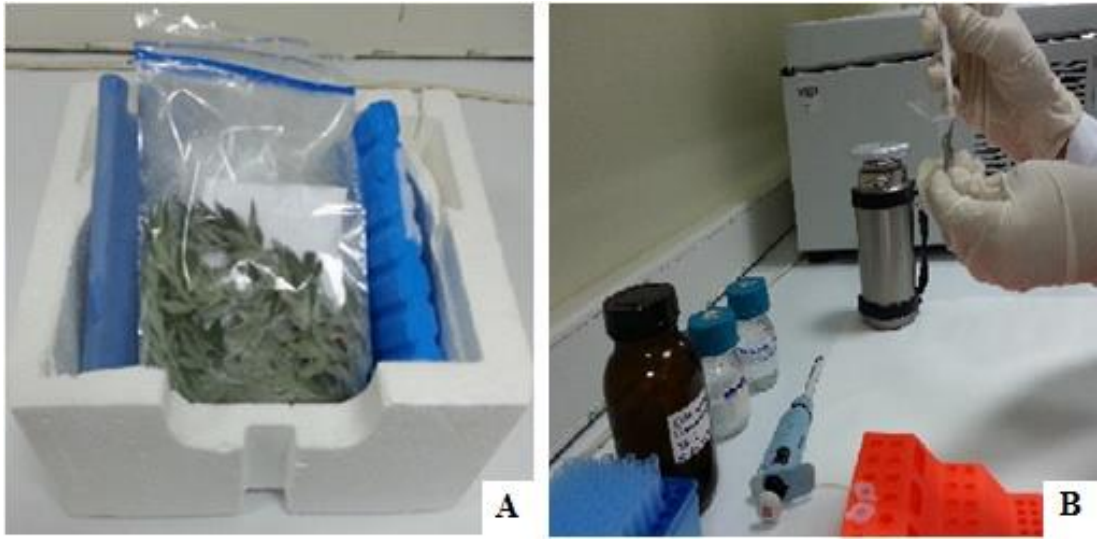
Çizelge 3.2. Bitki örneklerine ait coğrafik bilgiler

Populasyon No	Yer	Enlem	Boylam
G1	Giresun-Piraziz	40°57'01.56"	38°08'01.64"
G2	Giresun-Bulancak	40°56'23.33"	38°13'56.53"
G3	Giresun-Merkez	40°55'40.35"	38°18'37.96"
G4	Giresun-Keşap	40°55'00.41"	38°30'17.79"
G5	Giresun-Espiye	40°56'55.70"	38°42'10.46"
G6	Giresun-Tirebolu	41°00'35.82"	38°51'02.80"
G7	Giresun-Eynesil	41°03'28.86"	39°07'58.04"
T1	Trabzon-Beşikdüzü	41°04'15.77"	39°12'23.34"
T2	Trabzon-Vakfikebir	41°03'02.12"	39°17'09.92"
T3	Trabzon-Akçaabat	41°00'34.66"	39°35'35.93"
T4	Trabzon-Merkez	40°59'41.63"	39°39'50.99"
T5	Trabzon-Yomra	40°57'58.83"	39°50'08.23"
T6	Trabzon-Arsin	40°57'26.51"	39°56'56.01"
T7	Trabzon-Araklı	40°57'25.23"	40°01'04.07"
R1	Rize-Derepazarı	41°01'24.79"	40°25'14.47"
R2	Rize-Çayeli	41°05'47.22"	40°44'03.82"
R3	Rize-Pazar	41°10'41.91"	40°53'31.22"

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

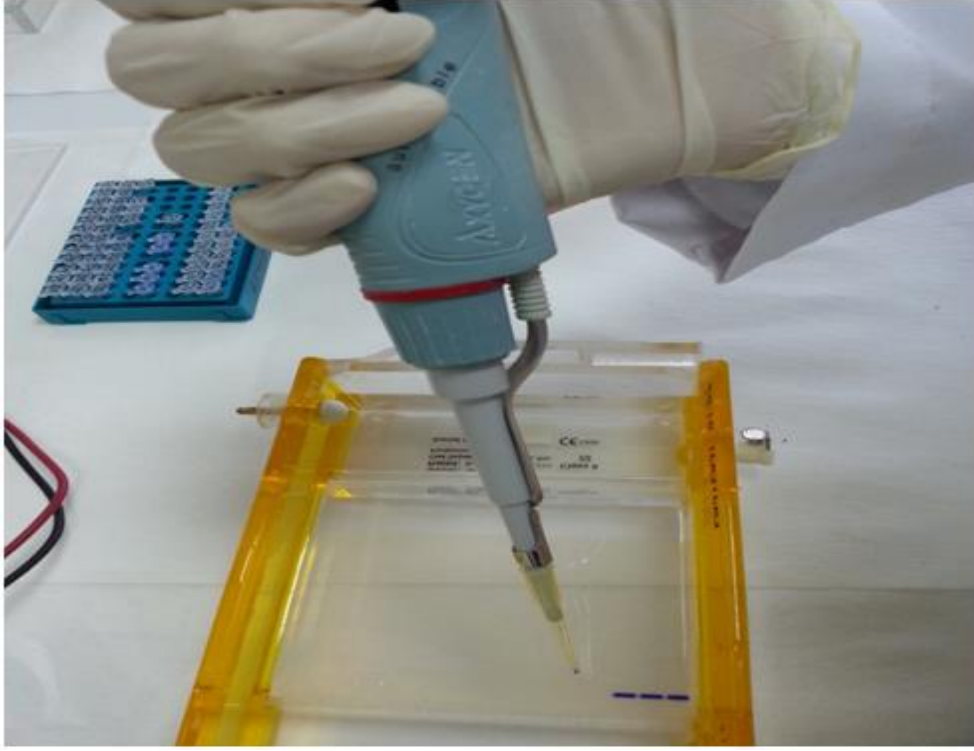
3.2.2.1. DNA İzolasyonu

Doğu Karadeniz Bölgesi Giresun, Trabzon ve Rize illerinden toplanan ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen 17 tane *Artemisia* spp. populasyon örneğinden DNA elde etmek için, DNA kimyasal ve fiziksel etkilere maruz bırakılarak diğer moleküllerinden ayrılması sağlanmıştır. DNA bulunduran bitki örneğinin kimyasal bir değişikliğe uğramasına fırsat vermeden, sıvı nitrojen (sıvı azot) ile fiziksel olarak öğütme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Bitki örneklerinden DNA elde ederken sıvı azot ile fiziksel öğütme işlemi (**A:** Bitki örneği $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilir; **B:** Eppendorf tüpünün içine konulan bitki örneği sıvı azot eklenerek havan eli yardımıyla ezilir.)

Ekstraksiyon prosedürü olarak DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany (Danquash, 2002) ve Haymes'in (1996) CTAB protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır. Ekstraksiyonun kalitesi ve DNA içeriği elektroforez yapılarak agaroz jelde kontrol edilmiştir. Tıbbi ve aromatik bir bitki olan *Artemisia* spp. yapraklarından en kısa sürede, en az maliyetle, en kaliteli DNA'nın Haymes'in (1996) Mini-Prep Method (CTAB)'u ile elde edildiği gözlenmiştir.



Şekil 3.6. Bitki örneklerinden elde edilen genomik DNA'nın elektroforez yapılarak agaroz jelde kontrolü

DNA ekstraksiyon uygulaması DNeasy Plant Mini Kit prosedürüne uygun olarak şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

(Not: Bütün santrifüjler 15 °C'de yapılmıştır.)

1. -80 °C'de muhafaza edilen bitki örneklerimizden 0.2 gr tartılmış ve eppendorf tüplerine konulmuştur. Eppendorf tüpünün içine sıvı azot eklenerek havan eli ile ezilmiştir.
2. Üzerine 600 µl Buffer AP1, 4 µl RNase eklenerek wortexli kuru blok ısıtıcıda 65 °C'de 10 dk bekletilmiştir.
3. Üzerine 200 µl Buffer P3 konulmuş, mikropipet yardımıyla al-ver yaparak karıştırılmış ve sonrasında buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir.
4. 5 dk 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Bir spor alıp üzerine örnek sayısına göre 2 ml'lik QIAshredder spin columnlar yerleştirilmiştir (mor renkli). 4. Aşamada santrifüj edilen örnek tüpünün alt kısmındaki pellete dokunmaksızın üstteki filtrat 5. aşamadaki mor spin columnlara aktarılmıştır. 2 dk 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

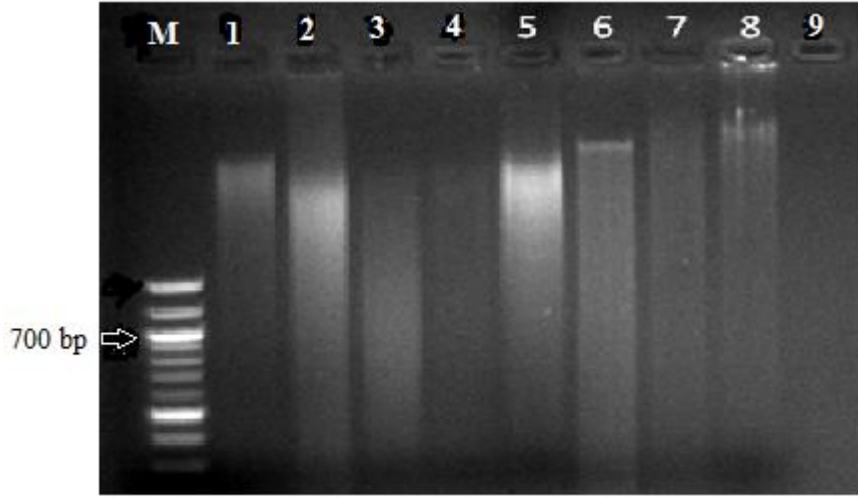
6. Mor spin columnlar atılmıştır, altındaki collection tüpünde eğer pellet varsa dokunmaksızın üstteki filtrat yeni bir eppendorf tüpüne alınmıştır. Yaklaşık 650 µl kadar süzölmüş filtrat elde edilmiştir. Bu filtratın 1.5 katı kadar Buffer AW1' den 975 µl eklenmiş ve mikropipetle alt üst edilmiştir.
7. Sporlara DNeasy mini spin columnlar yerleştirilmiştir. 6. Aşamadaki karışımın yarısı bu spin columnlara aktarılmış, 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Collection tüpündeki sıvı dökülmüştür. Tekrar collection tüpü geri takılarak 6. aşamadaki karışımın kalan yarısı Dneasy mini spin columnlara eklenmiştir, tekrar 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve collection tüpü filtratıyla beraber atılmıştır. DNeasy mini spin columnlar dikkatli bir şekilde yeni collection tüpüne takılmıştır.
8. Üzerine 500 µl Buffer AW2 ilave edilmiştir. 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Collection tüpündeki sıvı atılmış, tekrar collection tüpü geri takılmıştır. Üzerine tekrar 500 µl Buffer AW2 eklenmiştir. 2 dk 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sonra tekrar Buffer AW2 eklemeden 2 dk 14.000 rpm'de tekrar santrifüj edilmiştir.
9. Spin column'lar dikkatli bir şekilde, altındaki collection tüpünde bulunan sıvıya temas etmeksizin alınmıştır. Yeni bir Eppendorf tüpü alınıp spin column'lar içine yerleştirilmiştir. Üzerine 50 µl Buffer AE ilave edilmiştir. 5 dk oda sıcaklığında beklettikten sonra 1 dk 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
10. Elde edilen DNA'lar sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

DNA Ekstraksiyon prosedürü olarak DNeasy Plant Mini Kit kullanıldığında ekstraksiyonun kalitesi ve DNA içeriği elektroforez jelle kontrol edilmiştir. Elde edilen elektroforez jel görüntülerine bakılarak saf bir DNA elde edilemediği düşünülmüştür. Çünkü; tıpkı diğer bitkiler gibi *Artemisia* spp.'de zengin polisakkarit içermesi ve sekonder metabolitlere sahip tıbbi aromatik bir bitki olması nedeniyle DNA izolasyonu zordur. *Artemisia* spp. için literatürlerde pek çok protokol kullanılmıştır. Bunun sonucunda, Haymes'in (1996) CTAB protokolü modifiye edilerek *Artemisia* spp.'nin yapraklarından aşağıda belirtildiği şekilde DNA izole edilmiştir;

1. -80 °C'de muhafaza edilen *Artemisia* spp.'den 0.02 gr tartılmış ve eppendorf tüplerinin içine konulmuştur. Sonra içine sıvı azot ilave edilerek havan eli ile hızlı bir şekilde ezilmiştir.
2. Ezme işlemi bittikten sonra üzerine 500 µl extraction buffer eklenmiş ve vortexlenmiştir.
3. 30dk 65 °C su banyosuna konulmuştur.
4. Su banyosundan çıkardıktan sonra üzerine 200 µl Cloroform/izoamil alkol (24/1) eklenmiş ve 5 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj işlemi bittikten sonra üzerinde kalan sarı şeffaf kısmı mikropipet yardımı ile başka eppendorf tüplerine alınmıştır. Üzerine 600 µl 96/4 Ethanol/Asetat (ETDH/Asetat) eklenmiştir. Daha çok DNA elde etmek için 5 dk -20 °C buzluğa konulmuştur.
6. Buzluktan çıkardıktan sonra tekrar 5 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sonra üzerindeki sıvılar dökülmüştür. Üzerine 300 µl Etanol konulmuş ve 5 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sonra pellet dipte kalacak şekilde üstteki supernatant dökülmüştür. Eppendorf tüpü kurutma kağıdının üstüne ters çevirilerek konulmuştur (yaklaşık 5 dk).
7. Üzerine 50 µl NFW ve 1 µl RNase (100mg/ml) ekledikten sonra 37 °C'de 1 saat tutulmuştur.
8. Elde edilen DNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Elde edilen DNA'ların PZR reaksiyonlarındaki başarısı için konsantrasyonları çok önemlidir. Bu yüzden, DNA örnekleri % 1,4'lük agaroz jel TAE bufferda (0.04 M Tris-acetate, 1Mm EDTA, Ph=8) 100 V'ta 60 dk boyunca elektroforez edilmiştir. Jeller 0.2 µg/ml ethidium bromid'e daldırılarak ve jel dökümantasyon sistemi (Gel DocBioRad 2000) sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Ayrıca, DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmiştir. 1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. İzole edilen DNA çift iplikli olduğunda miktar tayininde bu formülden yararlanılmıştır: $DNA (\mu g/ml) = 260 \text{ nm'deki OD (Absorbans değeri)} \times \text{sulandırma}$

oranı x 50. DNA miktarı ve temizliği spektrofotometre (Biophotometer)'de ölçülmüştür.



Şekil 3.7. *Artemisia* spp. yapraklarından elde edilen genomik DNA'nın agaroz jel içindeki görüntüsü. Kuyucuk M: 100 bp ladder (New England Biolabs), Kuyucuk 1-5: DNeasy Plant Mini Kit ile elde edilen genomik DNA, Kuyucuk 6-8: Haymes'in (1996) CTAB protokolü ile elde edilen genomik DNA.

3.2.2.2. Ribozomal DNA (rDNA) İnternal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgesi Analizi

Ribozomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS)gen bölgesi analizinde kullanılacak olan primerlerin konsantrasyonunun belirlenmesi için stok solusyondan her μl 'sinde 10 pmol primerlerden 200 nM olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu stok solusyondan 1, 1.5 ve 2 μl kullanılarak bant oluşumları gözlenmiştir. Mini-Prep Method'u ile elde edilen DNA'ların PZR çalışmaları için ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmıştır. Kullanılan döngü parametreleri ise şu şekildedir. 25 μl 'lik reaksiyon hacminde aşağıdaki maddeleri içeren her bir primerin yardımıyla bu yöntem uygulanmıştır;

PZR reaksiyon karışımı:

Genomik DNA: 1 µl DNA (50 ng/ µl)

ITS1 Primer: 0.5 µl (2.5 mM)

ITS4 Primer: 0.5 µl (2.5 mM)

25 mM MgCl₂: 3 µl

2.5 mM dNTP: 0.4 µl

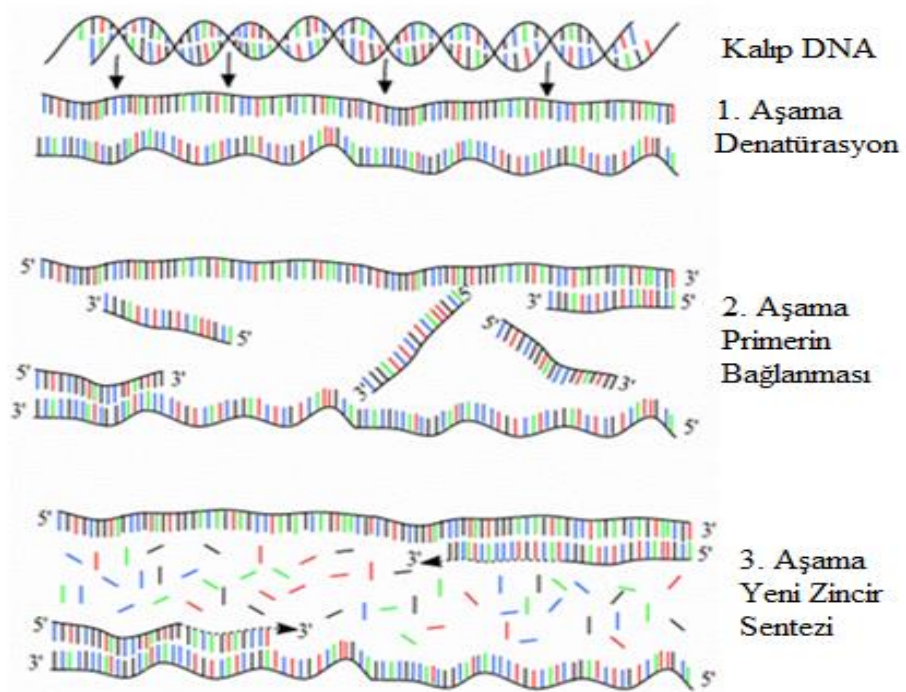
10XPCR Buffer: 2.5 µl

Tag DNA Polimeraz: 0.4 µl (5U/µl)

ddH₂O: 16.7 µl

Reaksiyon Hacmi: 25 µl

Amplifikasyonda, 2400 Perkin Elmer Gene Amp PZR yöntemi şu şekilde uygulanmıştır: 95 °C’de 15 dk, sonrasında 35 döngü; 95 °C’de 1 dk, 48.7 °C’de 2 dk ve 72 °C’de 2 dk. En sonunda reaksiyon 72 °C’de 10 dk inkübe edilmiş ve örnekler cihazdan alınmaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aşamaları (Anonim, 2016b)

3.2.2.3. Agaroz Jel Elektrofrez ve Fotoğraflama

PZR ürünlerinin elektrofrezinde % 1.5'lük agaroz jel TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 1Mm EDTA, Ph=8) kullanılmıştır. Jel için; 1.5 gr agaroz tartılmıştır. Diğer taraftan 50 ml 10xTAE, 450 ml saf su ile tamamlanarak 500 ml 1xTAE elde edilmiştir. Tartılan 1.5 gr agaroz ile 100 ml 1xTAE birleştirilerek 2 dk mikrodalgada eritilmiştir. Karışım mikrodalgadan çıkartıldıktan sonra boya olarak Ethidium Bromür (0.2 µg/ml) ilave edilmiştir. Yatay tipteki elektrofrez cihazının (Shimadzu UV-1800) jel hazırlama tabağına dökülmüştür. Jel tamamen katılaştıktan sonra, içerisinde max çizgisine kadar 1xTAE tampon çözeltisi bulunan elektrofrez cihazının tankına yerleştirilmiştir. PZR tüpleri içindeki reaksiyon karışımından 5 µl, 2 µl yükleme tamponuna (Loading Dye Solution) eklenerek karıştırılmış ve bu karışım 7 µl olarak jeldeki kuyucuklara yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa 1 Kb'lık DNA marker yüklendikten sonra cihaz 100 V'da 60 dk boyunca elektrofrez edilmiştir. Jelde oluşan DNA bantları jel dökümantasyon (Gel DocBioRad 2000) sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

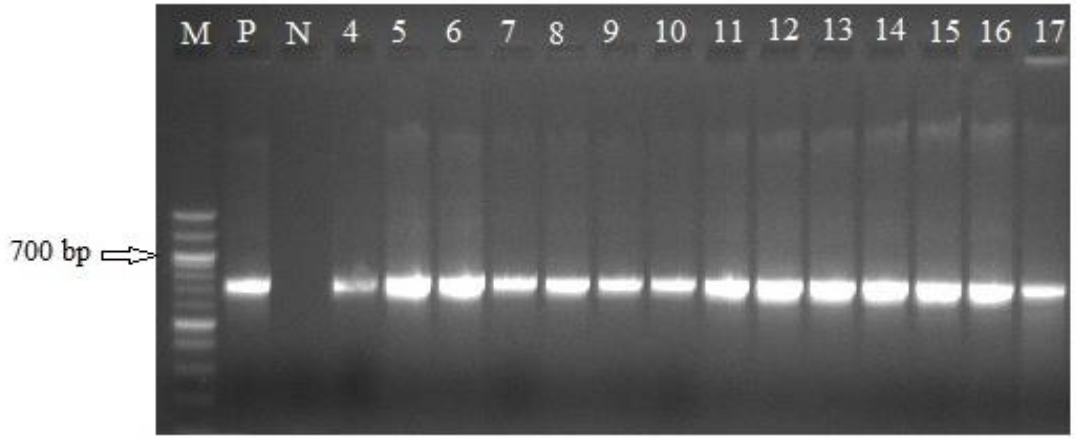
3.2.2.4. PZR Polimorfizmi ve Genetik Farklılığın Hesaplanması

PZR ürünleri sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderilmiştir. Gelen sekans sonuçlarına ait baz dizileri BioEdit (Hall, 1999) programı kullanılarak hizalanmıştır. Daha sonra rDNA-ITS gen bölgesi için GenBank'tan temin edilen referans sekans dizileri ve elde edilen sekans sonuçları ClustalW (Thompson ve ark., 1997) modülü kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen hizalanmış baz dizilerinin haplotipleri DNA Sequence Polymorphism (DnaSP 5.10) programı kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra MEGA version 6 (Tamura ve ark., 2013) paket programı kullanılarak, Neighbor-Joining (NJ; Saitou ve Nei, 1987), Maximum-Parsimony (MP; Eck ve Dayhoff, 1966; Fitch, 1977) ve Maximum-Likelihood (ML) algoritmalarından oluşan filogeni ağaçlarının çizimi sağlanmıştır. Seç bağla testi Bootstrap testi (Efron, 1982; Felsenstein, 1985) MP ve ML için 1000 tekrarla, NJ analizi için 10.000 tekrarla yapılmıştır. Ayrıca tüm sekans dizilerinin % nükleotid benzerlik oranları ve evrimsel genetik uzaklıkları hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Bulgular

Bu çalışmada 17 tane *Artemisia* spp. örneği 2 farklı ITS primeri (ITS1 ve ITS4) kullanılarak incelenmiştir. *Artemisia* spp.'nin nüklear ribozomal DNA ITS analizlerinden elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Bu jel görüntüsü toplanan *Artemisia* spp.'nin DNA'larının ITS primerleri yardımıyla başarılı bir şekilde çoğaltılabildiği anlamına gelmektedir. PZR örneklerinin 600-700 bp civarında çoğaltıldığı görülmüştür.



Şekil 4.1. Doğu Karadeniz Bölgesi'nden toplanan *Artemisia* spp. örneklerinin rDNA-ITS gen bölgesinin agaroz jel içindeki görüntüsü. Kuyucuk M: 100bp ladder (New England Biolabs), Kuyucuk P: Pozitif kontrol (*Artemisia* DNA), Kuyucuk N: Negatif kontrol (steril su), Kuyucuk 4: T1-DNA, Kuyucuk 5: T2-DNA, Kuyucuk 6: T3-DNA, Kuyucuk 7: T4-DNA, Kuyucuk 8: R1-DNA, Kuyucuk 9: R2-DNA, Kuyucuk 10: R3-DNA, Kuyucuk 11: G1-DNA, Kuyucuk 12: G2-DNA, Kuyucuk 13: G3-DNA, Kuyucuk 14: G4-DNA, Kuyucuk 15: G5-DNA, Kuyucuk 16: G6-DNA, Kuyucuk 17: G7-DNA.

4.1.1. 18S-26S rDNA-ITS Gen Bölgesi

4.1.1.1. rDNA-ITS Geni ve Sekans Varyasyonu, Haplotip ve Nükleotit Özellikleri

Araştırma alanından toplanan *Artemisia* spp. örneklerine ait rDNA-ITS gen bölgesi ile Çizelge 4.1’de gösterilen gen bankasından alınan *Artemisia* spp. referans dizileri DNA Sequence Polymorphism (DnaSP 5.10) programı kullanılarak 4 farklı haplotip belirlenmiştir. Çizelge 4.2’de tespit edilen haplotipler gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Genbank’ tan elde edilen *Artemisia* spp.’nin referans numaraları

Referans No	Tür Adı
FJ528302	<i>Artemisia argyi</i>
JX051685	<i>Artemisia sylvatica</i>
KC493083	<i>Artemisia capillaris</i>
KC493072	<i>Artemisia tangutica</i>
KC493086	<i>Artemisia absinthium</i>
AM398922	<i>Artemisia superba</i>
JX051683	<i>Artemisia mangolica</i>
IX051676	<i>Artemisia indica</i>
JX051677	<i>Artemisia montana</i>
JX051678	<i>Artemisia vulgaris</i>
AM398880	<i>Artemisia integrifolia</i>
AM398906	<i>Artemisia princeps</i>
AM398926	<i>Artemisia unalaskensis</i>
AM398884	<i>Artemisia koidzumii</i>

Çizelge 4.2. rDNA-ITS gen bölgesi haplotipleri

Haplotipler	Türler	Örnek Sayıları
Haplotip-I	<i>Artemisia argyi</i>	6
Haplotip-II	<i>Artemisia sylvatica</i>	8
Haplotip-III	<i>Artemisia unalaskensis</i>	1
Haplotip-IV	<i>Artemisia koidzumii</i>	2

DnaSP 5.10 programında elde edilen Haplotip-I tür baz dizilimi esas alınarak diğer haplotipler arasındaki nükleotit değişimleri Çizelge 4.3’de ve Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. DnaSP (5.10) Programı ile elde edilen haplotiplere ait nükleotit değişimleri (Koyu bölgeler türe özgü nükleotit pozisyonlarını göstermektedir)

	2	2	3	4	4	9	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6
	6	7	0	1	4	9	0	5	5	6	8	1	1	3	7	2	2	9	0	0	1	4	5	5	6	6	7	8	9	9	0	0										
							3	1	2	9	3	0	4	6	6	4	7	3	1	7	0	7	8	9	0	9	0	5	4	8	1	2										
Hap-I	C	G	C	C	A	G	T	A	G	A	C	G	C	G	G	A	G	C	G	G	T	C	G	G	G	G	G	T	C	G	C	A										
Hap-II	C	T	C	C	G	G	C	A	G	A	C	G	C	G	G	A	G	C	G	G	T	T	A	G	G	G	G	C	C	G	C	A										
Hap-III	T	G	T	C	A	A	T	G	A	G	T	A	T	A	A	G	A	T	A	C	A	C	G	G	A	A	A	C	C	A	T	C										
Hap-IV	T	G	T	T	A	G	T	A	G	A	T	G	T	G	G	A	G	T	G	G	T	C	A	A	G	A	G	T	T	G	T	C										

Nükleotit dizilimini yorumladığımızda; Haplotip-III ve Haplotip-IV 26. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotitini sahiptir. Haplotip-II 27. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotitine sahipken diğer haplotipler Guanin nükleotitine sahiptir. Haplotip-III ve Haplotip-IV 30. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotitini sahiptir. Haplotip-IV 41. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotitini sahiptir. Haplotip-II 44. nükleotit pozisyonunda Guanin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Adenin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 99. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotitini sahiptir. Haplotip-II 103. Nükleotit pozisyonunda Sitozin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Timin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 151. nükleotit pozisyonunda Guanin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Adenin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 152. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 169. nükleotit pozisyonunda Guanin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Adenin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III ve Haplotip-IV 183. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 210. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III ve Haplotip-IV 214. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 236. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 276. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotitine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotitini sahiptir. Haplotip-III 424. nükleotid

pozisyonunda Guanin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Adenin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III 427. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III ve Haplotip-IV 493. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III 501. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III 507. nükleotit pozisyonunda Sitozin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III 510. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Timin nükleotidini sahiptir. Haplotip-II 547. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotidini sahiptir. Haplotip-II ve Haplotip-IV 558. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-IV 559. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III 560. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III ve Haplotip-IV 569. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III 570. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-II ve Haplotip-III 585. nükleotit pozisyonunda Sitozin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Timin nükleotidini sahiptir. Haplotip-IV 594. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III 598. nükleotit pozisyonunda Adenin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Guanin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III ve Haplotip-IV 601. nükleotit pozisyonunda Timin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Sitozin nükleotidini sahiptir. Haplotip-III ve Haplotip-IV 602. nükleotid pozisyonunda Sitozin nükleotidine sahipken, diğer haplotipler Adenin nükleotidini sahiptir. Haplotip-I içinde; Giresun 6 (Tirebolu), Rize 2 (Çayeli), Rize 3 (Pazar), Trabzon 3 (Akçaabat), Trabzon 4 (Merkez) ve Trabzon 6 (Arsin) isimli örnekler yer almaktadır. Haplotip-II içinde; Giresun 1 (Piraziz), Giresun 2 (Bulancak), Giresun 3 (Merkez), Giresun 4 (Keşap), Giresun 5 (Espiye), Giresun 7 (Eynesil), Trabzon 1 (Beşikdüzü) ve Trabzon 5 (Yomra) isimli örnekler yer almaktadır. Haplotip-III içinde; Trabzon 7 (Araklı) isimli örnek yer almaktadır.

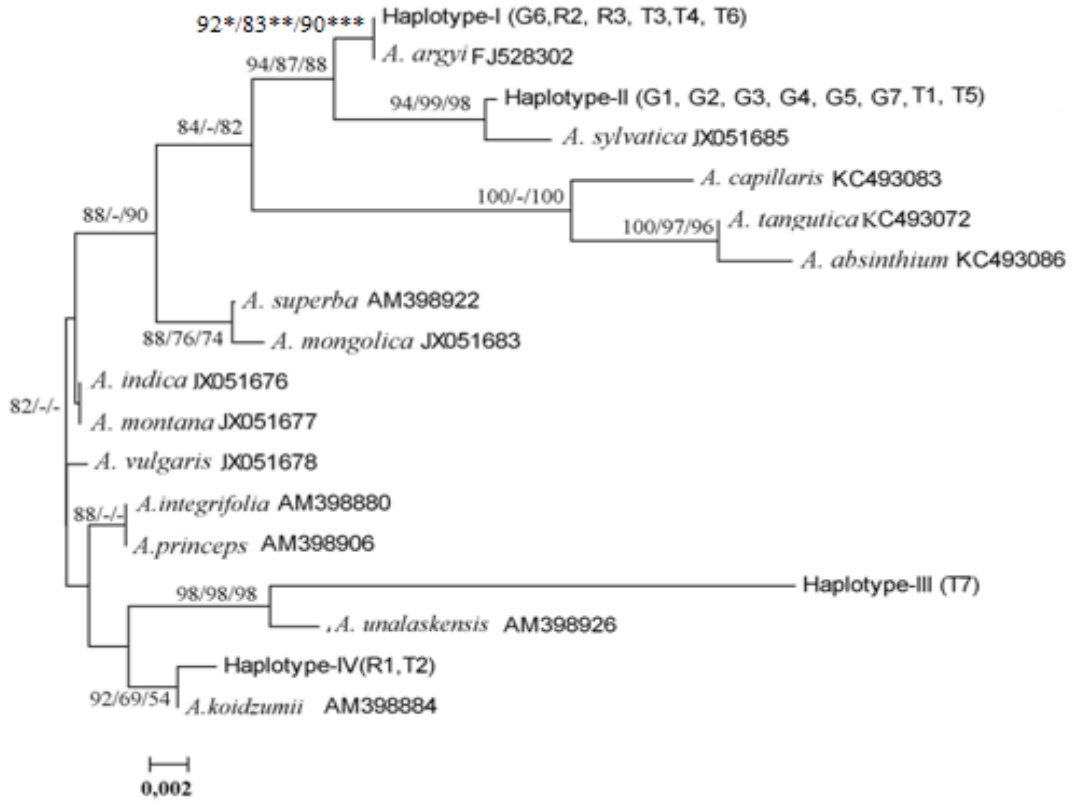
Haplotip-IV içinde; Rize 1 (Derepazarı), Trabzon 2 (Vakfikebir) isimli örnekler yer almaktadır.

4.2. *Artemisia* spp.'nin Filogenetik İlişkisi (Soy Ağacı)

Haplotip-I ve Haplotip-II genotiplerinin *A. argyi* ve *A. sylvatica* türleri ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Haplotip-I'in *A. argyi* ile % 99.6 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Haplotip-II'nin ise, *A. sylvatica* ile % 99.6 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Haplotip-II ile Haplotip-I arasındaki benzerlik oranı % 99 bulunmuştur. Haplotip-III *A. unalaskensis* ile % 98 oranında benzer bulunurken, Haplotip-IV *A. koidzumii* ile % 92 oranında benzer bulunmuştur. Elde edilen referans dizileri ve filogenetik ilişki Çizelge 4.5 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Belirlenen rDNA-ITS haplotipleri arasındaki DNA dizilerinin yüzde (%) benzerlikleri ve ikili genetik mesafeleri (gri ile işaretli) ve Genbank'tan elde edilen *Artemisia* spp.'nin referans dizileri

	Haplotype-III	<i>A.unalaskensis</i>	Haplotype-I	<i>A.argyi</i>	Haplotype-IV	<i>A.koidzumii</i>	Haplotype-II	<i>A.sylvatica</i>	<i>A.superba</i>	<i>A.mongolica</i>	<i>A.integrifolia</i>	<i>A.princeps</i>	<i>A.vulgaris</i>	<i>A.indica</i>	<i>A.montana</i>	<i>A.tangutica</i>	<i>A.absinthium</i>	<i>A.capillaris</i>
Haplotype-III	ID	0,975	0,96	0,96	0,966	0,968	0,953	0,953	0,961	0,96	0,965	0,965	0,966	0,968	0,968	0,945	0,941	0,945
<i>A.unalaskensis</i>	0,0252	ID	0,975	0,975	0,988	0,99	0,971	0,968	0,983	0,981	0,986	0,986	0,988	0,99	0,99	0,961	0,958	0,963
Haplotype-I	0,0407	0,0252	ID	0,996	0,98	0,981	0,99	0,99	0,985	0,986	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,975	0,971	0,975
<i>A.argyi</i>	0,0407	0,0252	0,0033	ID	0,98	0,981	0,99	0,99	0,985	0,986	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,975	0,971	0,975
Haplotype-IV	0,0338	0,0117	0,0201	0,0201	ID	0,998	0,973	0,97	0,985	0,983	0,995	0,995	0,991	0,991	0,991	0,963	0,96	0,965
<i>A.koidzumii</i>	0,0321	0,0100	0,0184	0,0184	0,0017	ID	0,975	0,971	0,986	0,985	0,996	0,996	0,993	0,993	0,993	0,965	0,961	0,966
Haplotype-II	0,0476	0,0286	0,0100	0,0100	0,0269	0,0252	ID	0,996	0,981	0,983	0,978	0,978	0,98	0,981	0,981	0,968	0,965	0,968
<i>A.sylvatica</i>	0,0476	0,0321	0,0100	0,0100	0,0304	0,0286	0,0033	ID	0,978	0,98	0,975	0,975	0,976	0,978	0,978	0,968	0,965	0,968
<i>A.superba</i>	0,0390	0,0168	0,0151	0,0151	0,0151	0,0134	0,0184	0,0218	ID	0,998	0,99	0,99	0,991	0,993	0,993	0,97	0,966	0,971
<i>A.mongolica</i>	0,0407	0,0184	0,0134	0,0134	0,0168	0,0151	0,0168	0,0201	0,0017	ID	0,988	0,988	0,99	0,991	0,991	0,971	0,968	0,973
<i>A.integrifolia</i>	0,0355	0,0134	0,0151	0,0151	0,0050	0,0033	0,0218	0,0252	0,0100	0,0117	ID	1	0,996	0,996	0,996	0,968	0,965	0,97
<i>A.princeps</i>	0,0355	0,0134	0,0151	0,0151	0,0050	0,0033	0,0218	0,0252	0,0100	0,0117	0,0000	ID	0,996	0,996	0,996	0,968	0,965	0,97
<i>A.vulgaris</i>	0,0338	0,0117	0,0151	0,0151	0,0083	0,0067	0,0201	0,0235	0,0083	0,0100	0,0033	0,0033	ID	0,998	0,998	0,97	0,966	0,971
<i>A.indica</i>	0,0321	0,0100	0,0151	0,0151	0,0083	0,0067	0,0184	0,0218	0,0067	0,0083	0,0033	0,0033	0,0017	ID	1	0,971	0,968	0,973
<i>A.montana</i>	0,0321	0,0100	0,0151	0,0151	0,0083	0,0067	0,0184	0,0218	0,0067	0,0083	0,0033	0,0033	0,0017	0,0000	ID	0,971	0,968	0,973
<i>A.tangutica</i>	0,0564	0,0390	0,0252	0,0252	0,0372	0,0355	0,0321	0,0321	0,0304	0,0286	0,0321	0,0321	0,0304	0,0286	0,0286	ID	0,996	0,988
<i>A.absinthium</i>	0,0599	0,0424	0,0286	0,0286	0,0407	0,0390	0,0355	0,0355	0,0338	0,0321	0,0355	0,0355	0,0338	0,0321	0,0321	0,0033	ID	0,985
<i>A.capillaris</i>	0,0564	0,0372	0,0252	0,0252	0,0355	0,0338	0,0321	0,0321	0,0286	0,0269	0,0304	0,0304	0,0286	0,0269	0,0269	0,0117	0,0151	ID



Şekil 4.2. Sekanslar sonucunda elde edilen *Artemisia* spp.'ler arasındaki filogenetik ilişki (soy ağacı) (*: Neighbor-Joining (NJ), **: Maximum-Parsimony (MP), ***: Maximum-Likelihood (ML))

Haplotip-I, *Artemisia argyi* ile sırasıyla % 92, % 83 ve % 90 (NJ, MP ve ML) oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-II, *Artemisia sylvatica* ile sırasıyla % 94, % 99 ve % 98 (NJ, MP ve ML) oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-III, *Artemisia unalaskensis* ile sırasıyla % 98, % 98 ve % 98 (NJ, MP ve ML) oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-IV, *Artemisia koidzumii* ile sırasıyla % 92, % 69 ve % 54 (NJ, MP ve ML) oranında benzer bulunmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Artemisia spp. farklı ve benzer morfolojik özellikleri sahip olan büyük bir taksondur. Bu yüzden, taksonomiciler hala *Artemisia* spp.'nin sınıflandırılması ile ilgili problemlerle karşı karşıya kalmaktadırlar. Pek çok moleküler yöntem *Artemisia* spp.'nin farklı türleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için kullanılmıştır. Örneğin; kloroplast ribozomal proteini kodlayan bir gen analizi PZR-RFLP, moleküler filogeni için kullanılan nükleer ribozomal DNA'yı analiz eden ITS (internal transcribed spacer) ve ETS (external transcribed spacer) gen bölgeleri.

Türkiye'de bugüne kadar *Artemisia* spp. ile ilgili bazı karyolojik çalışmalar bildirilmiştir. Tabur ve ark., (2014) çalışmalarında, Türkiye'de Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanan *Artemisia* örneklerinden altcinsi olan *Seriphidium* (Bess.) Rouy, (Asteraceae) rapor etmişlerdir. *Artemisia bashkalensis*, Doğu Anadolu'da Hakkari'de Kürşat ve ark., (2015) tarafından tanımlanmıştır. Mennan ve ark., (1999), Karadeniz Bölgesi fındık bahçelerinde sorun olan yabancı ot türlerini belirledikleri çalışmalarında, *Artemisia vulgaris* türünün rastlama sıklığını % 51.85 oranında bildirmişlerdir.

Kolören ve ark., (2016), Türkiye'nin Ordu ilinden topladıkları 19 *Artemisia* spp. örneğinin rDNA ITS gen bölgelerini analiz yaparak filogenisini bildirmişlerdir. Datalar sonucunda iki haplotip belirlemişlerdir. Haplotip-I içerisinde; Fatsa 2 isimli örnek yer almaktadır. Haplotip-II içerisinde; Gülyalı 1, Gülyalı 3, Gülyalı 4, Gülyalı 6, Fatsa 4, Fatsa 5, Fatsa 6, Perşembe 4, Perşembe 5, Perşembe 6, Ünye 1, Ünye 2, Ünye 3, Ünye 4, Ordu 1, Ordu 3, Ordu 4 ve Ordu 6 isimli örnekler yer almaktadır. Haplotip-I *Artemisia sylvatica* ile % 98.6 oranında benzer bulunurken, Haplotip-II *Artemisia sylvatica* ile % 98.8 oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-I ve Haplotip-II ise, birbirlerine % 99.7 oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-I ve Haplotip-II sırasıyla; *Artemisia argyi* türüne % 99.5 ve % 99.7 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia verlotionum* türüne % 99.5 ve % 99.7 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia vulgaris* türüne % 97.7 ve % 97.9 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia indica* türüne % 97.9 ve % 98.1 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia montana* türüne % 97.9 ve % 98.1 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia opulenta* türüne % 98.1 ve % 98.3 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia lavandulifolia* türüne % 98.1 ve

% 98.3 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia mangolica* türüne % 98.3 ve % 98.6 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia superba* türüne % 98.1 ve % 98.3 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia obscura* türüne % 98.6 ve % 98.8 oranında benzer bulunmuş, *Artemisia integrifolia* türüne % 97.4 ve % 97.7 oranında benzer bulunmuş ve *Artemisia princeps* türüne % 97.4 ve % 97.7 oranında benzer bulunmuştur.

Haghighi ve ark., (2014) çalışmalarında, *Artemisia* (Asteraceae) spp.'nin taksonomik ve filogenetik ilişkilerini tartışmışlardır ve 1'den 8'e *Artemisia*'nın farklı türlerinin olduğunu düşünmektedirler. Çalışmada, *Artemisia* spp.'nin filogenetik ilişkilerini nüklear ribozomal ITS ve kloroplast DNA gen bölgelerini kullanarak yeniden incelemişlerdir. İnceledikleri cinsler; *Artemisia*, *Dracunculus* ve *Serphidium*'dur. İran Tebriz ve Trabzon Horasan bölgelerinden toplamda 39 tane populasyon örneği toplamışlardır. Bu 39 populasyon örneği içerisinde 15 tane türün *Artemisia*, *Serphidium* ve *Dracunculus* içinde olduğunu belirlemişlerdir. Bunlar; *Artemisia fragrans*, *A. scoparia*, *A. incana*, *A. spicigera*, *A. austriaca*, *A. vulgaris*, *A. annua*, *A. absinthium*, *A. sieberi*, *A. biensis*, *A. diffusa*, *A. campestris*, *A. chamaemelifolia*, *A. kopetdaghensis* ve *A. aucheri*'dir. ITS sekansları sonucunda 672 bp'de *Artemisia vulgaris* tanımlanırken, 707 bp'de *Artemisia biennis* tanımlanmıştır. Fakat, kloroplast DNA sekanslarında 420-465 bp'de *Artemisia kopetdaghensis* ve *A. scoparia* türlerini tanımlamışlardır. *Artemisia*, *Serphidium* ve *Dracunculus* türleri arasındaki varyasyon oranlarını ITS gen bölgelerini kullanarak % 55.29 bulurken, kloroplast DNA gen bölgelerini kullanarak % 41.52 oranında bulmuşlardır.

Nazar ve Mahmood, (2011) çalışmalarında, üç tür bitki örneği toplamışlardır. Bunlar; *A. vulgaris*, *A. roxburghiana* ve *A. absinthium*'dur. Bu türlerin morfolojik ve genetik çeşitliliklerini analiz etmişlerdir ve *Artemisia* spp.'nin farklı türleri ile aralarında yakın bir akrabalık olduğunu bildirmişlerdir.

Tıbbi aromatik bir yabancı ot olan *Artemisia* spp.'nin yedi doğal populasyonu arasındaki genetik çeşitliliğe bakan Badr ve ark., (2012), Mısır'da Güney Sinai'nin farklı noktalarından *Artemisia judaica* örnekleri toplamışlardır. RAPD yöntemi kullanarak örnekleri incelenmişlerdir. Toplamda 87 bant çoğaltmış, bunun 50'sinin

polimorfik olduğunu ortaya koymuşlardır ve polimorfizm oranını % 57.47 olarak belirlemişlerdir. Bu demektir ki, incelenen örnekler genetik çeşitlilik göstermektedir.

Yürütülen çalışmamızda ise, Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde *Artemisia* spp.'nin rDNA ITS gen bölgeleri analizi yapılarak filogenisi kaydedilmiştir. 18S-26S rDNA ITS gen bölgeleri filogenetik sıralamada yaygın olarak kullanılır. Çünkü, bu çalışmalarda kullanılan primerler evrenseldir ve daha hızlı ve kolay yollarla çoğaltılabilirler. Yapılan çalışmada Türkiye' de Doğu Karadeniz Bölgesi'nden toplanan *Artemisia* örneklerinden 18S-26S rDNA-ITS gen bölgeleri yaklaşık olarak 600-700 bp civarında bant vererek çoğaltılmıştır.

rDNA ITS gen bölgelerinin PZR ürünleri elde edildikten sonra, gen bankasından elde edilen *Artemisia* sekansları ile bizim elde ettiğimiz sekanslar NJ, MP, ML algoritmaları hesaplanarak filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Türkiye'de incelediğimiz örneklerden 4 haplotip saptanmıştır. Bunlar; Haplotip-I (G6, R2, R3, T3, T4, T6); Haplotip-II (G1, G2, G3, G4, G5, G7, T1, T5); Haplotip-III (T7) ve Haplotip-IV (R1,T2). Bu haplotiplerin, *Artemisia* türlerinin alt cinsleri ile olan ilişkileri BLAST sonuçları kullanılarak ve veri seti oluşturularak belirlenmiştir. Haplotip-I ve Haplotip-II, *A. argyi* ve *A. sylvatica* türleri ile benzerlik göstermektedir. Haplotip-I, *A. argyi* ile % 99.6 oranında benzerlik göstermektedir. Haplotip-II ise, *A. sylvatica* ile % 99.6 oranında benzerlik göstermektedir. Haplotip-II ile Haplotip-I, arasında benzerlik oranı % 99 bulunmuştur. Sırasıyla, Haplotip-III (T7) *A. unalaskensis* ile % 97.5 oranında benzer bulunurken, Haplotip-IV (R1, T2) *A. koidzumii* ile % 99.8 oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-III ise Haplotip-IV' e % 96.6 oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-III, Haplotip-I'e % 96 oranında benzer bulunurken, Haplotip-II'ye % 95.3 oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-II, Haplotip-IV'e % 97.3 oranında benzer bulunmuştur. Haplotip-I, Haplotip-IV'e % 98 oranında benzer bulunmuştur.

Büyük türlerde altcinsleri sınıflandırmak hala sorun olmaktadır. Kapsamlı moleküler çalışmalar *Artemisia* spp.'nin altcinsini belirlemede ve sistematüğini yeniden tanımlamada yardımcı olmaktadır. rDNA-ITS bazı *Artemisia* spp.'nin altcinslerinin moleküler farklılıkları için bazen uygun olmamasına rağmen, potensiyel yeni türlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. rDNA-ITS gen bölgeleri *Artemisia* spp.

altcinsinde büyük ölçüde korunmuş olduğundan, incelenen bitki örneklerinin filogenetik yakınlıklarını temsil eden bölgeler çoğaltılabilir.

Bu çalışmada Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki *Artemisia* spp. içinde olan filogenetik ilişkinin anlaşılması için rDNA ITS gen bazlı filogenetik analiz çalışması yapılmıştır. *Artemisia* spp.'de yer alan 4 haplotip, rDNA-ITS sekansları kullanılarak doğrulanmış ve aynı soydan oldukları belirlenmiştir. Bunlar; *A. sylvatica*, *A. argyi*, *A. unalaskensis* ve *A. koidzumii*. Yani, *Artemisia* genotipleri arasındaki genetik benzerliğin yüksek oranda bulunması demek bu türlerin yakın akraba oldukları anlamına gelmektedir.

Sonuç olarak;

1. Türler arasındaki akrabalıkları belirlemek genetik karakterizasyon, ıslah çalışmalarına ve aynı zamanda genetik materyallerinin değerlendirilmesi açısından son derece önem taşımaktadır.
2. Ayrıca yabancı otların zararlı yönlerine bakıldığında ise, hangi bölgede hangi türün yaygınlık gösterdiği yani genetik haritalaması çıkarıldığında bu uygulanacak mücadele şekli konusunda yol gösterecektir.
3. *Artemisia* spp.'ye ait moleküler düzeyde ileride yapılacak olan daha geniş kapsamlı çalışmalara yol gösterip yardımcı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ak, K., Sezer, A., Işık, D., Köse, Ç.B., Duran, H., Akyol, H., Özdem, A., Bozkurt, V., Beytut, B., Atlamaz, A., Karahan, A., Akbaş, B., Caner, Ö.K., Özenç, N., Altundağ, Ş., Velioglu, S., Erdoğan, C. 2011. Fındık Entegre Mücadele Teknik Talimatı. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, Ankara.
- Akalın, Ş. 1954. Büyük Bitkiler Klavuzu. Ankara Basım ve Cilt Evi. Sayfa 752. Ankara.
- Anonim, 1990. Bitki Koruma El Kitabı. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, İzmir İl Müdürlüğü, Yayın No:6. İzmir.
- Anonim, 1995. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt 4. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Ankara.
- Anonim, 2016a. <http://www.pittaayurveda.com/ayurvedic-herbal-encyclopedia-alphabet-> (Erişim tarihi: 05.07.2016).
- Anonim, 2016b. <http://www.rroj.com/open-access/pcr-technique-with-its-application.php-> (Erişim tarihi: 03.06.2016).
- Atalay, İ. 1994. Türkiye Vegetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, 230 s., İzmir.
- Badr, A., El-Shazly, H.H., Helail, N.S., El Ghanim, W., 2012. Genetic diversity of *Artemisia* populations in central and North Saudi Arabia based on morphological variation and RAPD polymorphism. *Plant Systematics and Evolution*. 298(5):871-886.
- Chapman, T. 2006. Evolutionary conflicts of interest between review males and females. *Current Biology* 16, R744–R754, DOI 10.1016/j.cub.2006.08.020.
- Çelik, S. 2003. *Centaurea* L. Cinsi psephelloidea (Boiss) sosn. Seksiyonuna Ait Türlerin Ekolojik Özellikleri. Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Danquash, E.T., Johnson, D.E., Riches, C., Arnold, G.M., Karp, A. 2002. Genetic diversity in *Echinochloa* spp. collected from different geographic origins and within rice fields in Cote d'Ivoire. *Weed Research*, 42 (5): 394.
- Davis, P.H. 1975. Flora of Turkey. University of Edinburg, Vol 5., 1068 s., England.
- Duke, S.O., Vaughn, K.C., Croom, E.M., Elsohly, H.N. 1988. *Artemisia*, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*) is a selective phytotoxin. *Weed Science*, Volume 35: 499-505.
- Eck, R.V., Dayhoff, M.O. 1966. Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring.
- Efron, B. 1982. The jackknife, the bootstrap and other resampling plans: CBMS-NSF MA, Monograph 38, Philadelphia (PA): SIAM.
- Eserkaya-Güleç, T., Yıldırım, A., Ateş-Sönmezoğlu, Ö. 2010. Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3(2): 67-79.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.
- Filiz, E., Koç, İ. 2011. Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler. *GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi*. 28(2), 207-214.
- Fitch, W. 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *American Naturalist*. 111, 223-257.

- Fogelfors, H. 1984. Useful weeds. Part 4. Nyttiga ogras, Del 4, Lantmannen, 105: 5, 52.
- Gormer, G., Debraux, G. 1961. Ressources medicinales de la flore Française. Tome 2, 1394-1396.
- Haghighi, A.R., Beldüz, A.O., Vahed, M.M., Coşkunçelebi, K., Terzioğlu, S. 2014. Phylogenetic relationships among *Artemisia* species based on nuclear ITS and chloroplast *psbA-trnH* DNA markers. *Biologia* 69/7: 834-839. Section Botany. DOI: 10.2478/s11756-014-0379-3.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Hasan, S.M.Z., Shafie, M.S.B., Shah, R.M. 2009. Analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Artemisia capillaris* (Wormwood capillary) in East Coast of Peninsular Malaysia. *World Applied Science Journal*. 6, 976-986.
- Haymes, K.M. 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14 (3), 280-284.
- Heywood, H.V., Humphries, C.J. 1977. Anthemideae-systematic review. *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Volume 2, (Chapter 31) Edit by Heywood, H.V., Harborne, J.B., Turner, B.L., Academic Press London.
- Hoffmann M.P., Frodsham, A.C. 1993. Natural enemies of vegetable insect pests. cooperative extension, Cornell University, Ithaca, NY, 63 p.
- Holm, L., Doll, J., Holm, E., Pancho, J., Herberger, J. 1996. *Worlds weeds. Natural Histories and Distribution*. John Wily and Sons. Inc, 70-79 p., U.S.A.
- Kasa, M. 1995. Karadeniz Bölgesi Meyve Fidanlıklarındaki Yabancı Otların Tespiti Üzerine Araştırmalar. TC Tarım ve Köy İşleri Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Bitki Koruma Araştırmaları Daire Başkanlığı Zirai Mücadele Araştırmaları Yıllığı No: 26-27.
- Koloren, O., Koloren, Z., Eker, S. 2016. Molecular phylogeny of *Artemisia* species based on the internal transcribed spacer (ITS) of 18S-26S rDNA in Ordu Province of Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. DOI: 10.1080/13102818.2016.1188674.
- Kornkven, A.B., Watson, L.E., Estes, J.R. 1998. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section Tridentatae (Asteraceae) based on sequences from the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 85(12): 1787–1795.
- Kurşat, M., Civelek, Ş. 2011. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen *Artemisia* L. (Asteraceae) Cinsine Ait Üç Türün Morfolojik Özellikleri Bakımından İncelenmesi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 12 (19): 15-25 s.
- Kurşat, M., Civelek, Ş., Türkoğlu, İ., Tabur, S., Gür, N. 2015. A new species of subgenus *Seriphidium* of *Artemisia* L. (Asteraceae) from Turkey. *Turkish Journal of Botany*. 39, 88-95.
- Mennan, H., Kutbay, H.G., Işık, D. 1999. Karadeniz Bölgesi Fındık Bahçelerinde Sorun Olan Yabancı Ot Türlerinin Saptanması. *Türkiye Herboloji Dergisi*. Cilt 2, Sayı 2, 13-21 s.
- Michiels, A., Van den Ende, W., Tucker, M., Van Riet, L. 2002. Extraction of high quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*. 315, 85–89 p.
- Misra, L.N., Singh, S.P. 1986. Alpha-Thujone, the major component of the essential oil from *Artemisia vulgaris* growing wild in Nilgiri hills. *Journal-of-Natural-Products*, 49: 5,

- 941; 8 ref. Phytochemistry Division, Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow 226 016, India.
- Nazar, N., Mahmood, T. 2011. Morphological and molecular characterization of selected *Artemisia* species from Rawalakot, Azad Jammu and Kashmir. *Acta Physiol Plant*, 33: 625-633.
- Önen, H. 1999. Pelin (*Artemisia vulgaris* L.)'in Bazı Biyolojik Özellikleri İle Savaşım Olanakları Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Özer, Z., Önen, H., Uygur, F.N., Koch, W. 1996. Farklı Kültürlerde Sorun Olan Yabancı Otlar ve Kimyasal Savaşimleri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 15, Kitaplar Serisi No:8, Tokat.
- Parmaksız, İ. 2004. *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonunun Türkiye'de Yetişen Türlerinde Genetik Çeşitliliğin RAPD Markörleri İle Analizi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Pellicer, J., Garcia, S., Canela, M.A., Garnatje, T., Korobkov, A.A., Twibell, J.D., Valles, J. 2009. Genome size dynamics in *Artemisia* L. (Asteraceae): following the track of polyploidy. *Plant Biology*. ISSN 1435-8603, 820-830.
- Plevnes, D.R., Smolik, M., Urbanek, K. 2009. Morphological and Genetic Variability in Some *Artemisia* Species. *Acta Horticulturae*. 830, 687-694.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*. 4, 406-425.
- Tabur, S., Kurşat, M., Öney, S., Özmen, S., Civelek, Ş. 2014. New or rare data on chromosome numbers and karyomorphology of some taxa in the subgenus *Seriphidium* (Bess.) Rouy. (*Artemisia*, Asteraceae) in Turkey. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 67, 305- 313.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*. 30, 2725-2729.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25, 4876-4882.
- Tübives, 2014. <http://www.tubives.com/index.php?sayfa>-(Erişim tarihi: 01.02.2015).
- Valles, J., McArthur, E.D. 2001. *Artemisia* systematics and phylogeny: cytogenetic and molecular insights. *Sfrubland Ecosystem Genetics and Biodiversity*, 67-74 .

EK 1.

1. Laboratuvar Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

1.1. Ethanol-Asetat (pH: 5.2)

Bu çözelti DNA ekstraksiyon aşamasında kullanılmaktadır. Çözelti maddeleri için 3 M NaAc'dan 24.61 gr tartılmıştır. 70 ml ethanol ile eritilerek pH: 5.2'ye ayarlanmıştır.

1.2. Extraction Buffer (pH: 8)

Bu çözelti DNA ekstraksiyon aşamasında kullanılmaktadır. Çözelti maddeleri için 100 mM TrisHCl'den 1.58 gr tartılmıştır. 1.4 M NaCl'den 8.182 gr tartılmıştır. 20 mM EDTA'dan 0.745 gr tartılmıştır. % 2'lik CTAB'dan 2 gr tartılmıştır. Bütün kimyasallar tartıldıktan sonra yaklaşık 12.507 gr çözelti 50 ml saf su ile çözdürülmüştür. Sonrasında % 4'lük B-mercaptaetanol'den 0.4 ml alınarak 50 ml'lik saf su ile çözdürülen karışıma eklenmiştir. pH:8'e ayarlanmıştır.

1.3. Chloroform-İsoamilalkol (24: 1)

Bu çözelti DNA ekstraksiyon aşamasında kullanılmaktadır. Çözelti maddeleri için 24 ml Chloroform ile 1 ml İsoamil alkol birleştirilmiştir.

1.4. TAE Buffer

PZR ürünlerinin elektroforezinde kullanılmaktadır. Çözelti maddeleri için 0.04 M Tris-acetate ve 1 mM EDTA, pH:8'e ayarlanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seçil EKER

Doğum Yeri : Bulancak/GİRESUN

Doğum Tarihi : 08.04.1986

Yabancı Dili : İngilizce

E-mail : secileker@odu.edu.tr

İletişim Bilgileri : Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü-
ORDU

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Bitki Koruma Bölümü	Ondokuzmayıs Üniversitesi	2006-2010
Y. Lisans	Bitki Koruma Bölümü	Ordu Üniversitesi	2013-2016

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Bozok Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü	2011-2012
Araştırma Görevlisi	Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü	2013-

Yayınlar :

1. Koloren, O., Koloren, Z., Eker, S. 2016. Molecular phylogeny of *Artemisia* species based on internal transcribed spacer (ITS) of 18S-26S rDNA in Ordu province of Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, ISSN: 1310-2818.

2. Eker, S., Koloren, O. 2016. Genetic diversity of *Artemisia* species by sequencing rDNA internal transcribed spacer (ITS) in Black Sea of Turkey. Fresenius Environmental Bulletin, Vol 25 – No 8, 3251-3257.

3. Eker, S., Koloren, O. Yabancı Otların Moleküler Teşhisinde Ribozomal RNA (rRNA) İnternal Transcribed Spacer (ITS) Gen Bölgelerinin Kullanımı. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi 5-8 Eylül 2016 Konya, TÜRKİYE, 884 s.

4. Eker, S., Aydınli, G., Mennan, S. Çeltik Beyaz Uç Nematodu (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942)'nun Karadeniz Bölgesi Çeltik Alanlarındaki Yayılışı ve Bulaşıklık Alanı. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi 5-8 Eylül 2016 Konya, TÜRKİYE, 478 s.

Projeler:

1. Proje Adı: Doğu Karadeniz’de Yayılış Gösteren *Artemisia* Türlerinin Nükleer Ribozomal DNA ITS Polimorfizmi. Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi. Proje No: TF-1459. 2015-2016.

2. Proje Adı: Ordu İli ve İlçelerinde Yayılış Gösteren *Urtica* Türlerinin Nükleer Ribozomal DNA ITS Polimorfizmi. Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi. Proje No: AR-1649. 2016-