

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EGE DENİZİ'NDEKİ *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh
POPULASYONLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN DNA
BARKODLAMA İLE BELİRLENMESİ**

Esra Mine ÜNAL

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2014

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Esra Mine ÜNAL tarafından hazırlanan “**Ege Denizi’ndeki *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh Populasyonlarının Filogenetik İlişkilerinin DNA Barkodlama ile Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 24/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy çokluğu ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Mine UZBİLEK KIRKAĞAÇ

Ankara Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Atila YILDIZ

Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR

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, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

24.12.2014

Esra Mine ÜNAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EGE DENİZİ'NDEKİ *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh POPULASYONLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİLERİNİN DNA BARKODLAMA İLE BELİRLENMESİ

Esra Mine ÜNAL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

Bu çalışmada Ege Denizi'nde dağılım gösteren ve istilacı tür olarak öneme sahip olan *Caulerpa racemosa* türünün genetik karakterizasyonunun gerçekleştirilmesinde DNA barkodlama yöntemi kullanılmıştır. Çalışma kapsamında *C. racemosa*'dan elde edilen doku örneklerinden ITS ve rbcL lokuslarının izole edilerek DNA dizilerinin tür teşhisindeki başarısı, populasyonlar arası uzaklıkların tespiti ve türün diğer ülkelerden örneklerle karşılaştırılarak filocoğrafik ilişkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda çalışmada DNA barkodlamanın tür içi genetik uzaklıkları ortaya koymadaki etkinliği araştırılmış, ortaya çıkan bu genetik uzaklıklar kullanılarak evrimsel ilişki ağaçları oluşturulmuştur.

Çalışma sonunda Ege Denizi'ndeki 12 istasyondan örneklenen *C. racemosa* türüne ait elde edilen sonuçlar, DNA barkodlama yönteminin *C. racemosa*'yı tür seviyesinde tanımlanmasında $\geq 99\%$ doğrulukla sonuç verdiğini ortaya koymuştur. Farklı *C. racemosa* populasyonlarının ayırımında ise uzak coğrafik konumlardan elde edilen örnekler arasındaki tür içi genetik farklılığı ortaya koymada başarılı olduğu ancak yakın coğrafik konumlarda yeterli çözünürlüğü veremediği belirlenmiştir. Ancak bu yetersizliğin, birbirine yakın populasyonların tek bir genetik kaynaktan çoğalan örnekler olması veya sınırlı bir genetik havuzdan yayılım göstermelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Aralık 2014, 113 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Caulerpa racemosa*, DNA barkodlama, Ege Denizi, ITS, rbcL, Türkiye

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIP AMONG *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh POPULATIONS IN AEGEAN SEA USING DNA BARCODING

Esra Mine ÜNAL

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

In this study, DNA barcoding is used in genetic characterization of *Caulerpa racemosa* distribution in the Aegean Sea as an important invasive species. For this purpose, ITS and rbcL loci were isolated from tissue samples of *C. racemosa* specimens and analyzed for the efficiency of DNA sequences in species identification, calculating distance among populations and comparison with other specimens from different countries were conducted in order to determine the phylogeographic relationship. Efficiency of DNA barcoding in terms of detecting intraspecific genetic distance was also investigated and these intraspecific distances were used to construct evolutionary relationship trees.

At the end of the study, results were pointing out that DNA barcoding was successfully identified *C. racemosa* specimens sampled from 12 different stations in the Aegean Sea with an identification rate of $\geq 99\%$. Calculation of intraspecific distance among different *C. racemosa* populations using DNA barcoding was found to be successful among geographically distant locations but resolution was found lower among geographically closer locations. This sufficiency could be related with diversification of close populations from a single genetic source or being spread from a limited genetic pool.

December 2014, 113 pages

Anahtar Kelimeler: *Caulerpa racemosa*, DNA barcoding, Ege Denizi, ITS, rbcL, Turkey

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Lisans öğreniminden bu yana bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, bilgi ve önerileri ile bana her zaman yol gösterip yardımlarını asla esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Hasan Hüseyin ATAR’a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü konuda bilgisini, desteğini ve güvenini hiç esirgemeyen sevgili hocam Dr. Emre KESKİN’e (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü),

Öğrenim hayatım boyunca maddi, manevi tüm desteğini ve teşvikini esirgemeyen, okuma şevkimi körükleyen sonsuz saygı duyduğum babam İlhan ÜNAL’a,

Sıcacık gülümsemesi, büyük sevgisiyle sarmalayan ve en büyük yardımcım olan biricik annem Fatma ÜNAL’a,

Emeklerini asla ödeyemeyeceğim umudum ve bana hep sığınak olan bir tanecik ağabeyim Şehsuvar Mehmet ÜNAL’a,

Bu günlere gelmemde verdikleri desteği ve emeği asla unutmadığım teyzem Ayşe HACIARİFOĞLU’na ve dostum Gülşah AKKAYA’ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, “Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri” tarafından “14H0447004 nolu Hızlandırılmış Destek Projesi” ile desteklenmiştir.

Esra Mine ÜNAL
Ankara, Aralık 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Kuramsal Temeller	4
2.1.1 <i>Caulerpa racemosa</i>	4
2.1.1.1 Sistematığı.....	4
2.1.1.2 Morfolojisi.....	5
2.1.1.3 Biyolojisi.....	7
2.1.1.4 Dünyadaki ve Türkiye’deki dağılımı.....	7
2.1.2 Moleküler taksonomi	8
2.1.2.1 Bitkilerde DNA barkodlama	9
2.1.2.2 Kloroplast DNA (cpDNA) ve rbcL lokusu	12
2.1.2.3 Nükleer DNA (nDNA) ve ITS lokusu	15
2.1.3 DNA barkodlama	16
2.1.3.1 Jel elektroforezi	19
2.1.3.1.1 DNA elektroforezi	21
2.1.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction; PCR)	22
2.1.3.3 DNA dizi analizi	25
2.1.3.4 Filogenetik analiz	28
2.1.3.4.1 Filogenetik ağaçlar	28
2.1.3.4.1.1 Parsimoni	32
2.1.3.4.1.2 Maksimum olasılık ve genetik uzaklık	32

2.1.3.4.1.3 Ağaçların güvenilirlik dereceleri	34
2.2 Kaynak Özetleri.....	36
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	48
3.1 Materyal	48
3.1.1 Örneklerin elde edilmesi.....	49
3.2 Yöntem	51
3.2.1 Morfolojik Karakterlere göre tür tayini.....	51
3.2.2 Doku örneklerinin elde edilmesi	51
3.2.3 DNA izolasyonu	52
3.2.4 DNA'nın spektrofotometrik analizi.....	52
3.2.5 DNA konsantrasyonunun ayarlanması.....	53
3.2.6 Jel elektroforezi	53
3.2.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	53
3.2.8 DNA dizi analizi	55
3.2.8.1 Saflaştırma (Pürifikasyon)	55
3.2.8.2 Dizilerin hizalanması	56
3.2.8.3 Nükleotid kompozisyonu	56
3.2.8.4 Nükleotid çifti frekansı	56
3.2.8.5 Kodon kullanımı.....	56
3.2.8.6 Substitüsyon matrisi ve transisyon/transversiyon oranı (R).....	57
3.2.8.7 Genetik uzaklık	57
3.2.8.8 Evrimsel ilişki analizi.....	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	58
4.1 Veri Analizleri	58
4.1.1 Nükleotid kompozisyonu	58
4.1.2 Nükleotid çifti frekansı	60
4.1.3 Kodon kullanımı.....	60
4.1.4 Nükleotid substitüsyon modelinin belirlenmesi.....	62
4.1.5 Substitüsyon matrisi.....	65
4.1.6 Genetik uzaklık	66
4.2 Evrimsel İlişki Analizleri	68
4.2.1 Filogenetik ağaç çizimleri	68

4.2.2 Network çizimleri.....	71
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	74
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ.....	95

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrad Derece
A	Adenin
C	Cytosin; Sitozin
cm	Santimetre
G	Guanin
l	Litre
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
T	Timin
UV	Ultraviyole
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar

AICc	Akaike Information Criterion
Bç	Baz çifti
BIC	Bayesian Information Criterion
COI	Sitokrom Oksidaz 1
cpDNA	Kloroplast DNA
d	Genetik Uzaklık
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates (Deoksinükleotid Trifosfat)
ITS	Internal Transcribed Spacer

ii	Eş Çiftler
lnL	Maximum Likelihood Benzerlik Değeri
MatK	Megakaryocyte-Associated Tyrosine
nrDNA	Nükleer DNA
Ort.	Ortalama
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
ppt	Parts Per Thousand
rbcL	Ribiloz Bifosfat Karboksilaz
rDNA	Ribozomal DNA
S.H.	Standart Hata
si	Transisyonel Çiftler
sv	Transversiyonel Çiftler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Caulerpa racemosa</i> 'nın basit morfolojisi	5
Şekil 2.2 <i>Caulerpa racemosa</i> türüne spesifik kaide şişkinliği	6
Şekil 2.3 <i>Caulerpa racemosa</i> 'nın Türkiye ve Avrupa'daki dağılımı	8
Şekil 2.4 Bitkilerde bulunan üç genomu ait aday gösterilen barkod genler	12
Şekil 2.5 Kloroplast DNA'sında bulunan rbcL gen bölgesine ait şema	14
Şekil 2.6 Ribozomal nükleer DNA'da bulunan ITS gen bölgesine ait şema	16
Şekil 2.7 DNA barkodlama çalışmalarındaki ana unsurlar ve bunların taksonomi, moleküler filogeni ve popülasyon genetiği çalışmalarındaki rolleri	17
Şekil 2.8 DNA barkodlama iş akış şeması	18
Şekil 2.9 Jel Elektroforezi	19
Şekil 2.10 Farklı boylarda DNA parçaları içeren karışımın, elektroforetik ayrımı	20
Şekil 2.11 Agaroz jel	21
Şekil 2.12 Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) şematik özeti	24
Şekil 2.13 Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemi	25
Şekil 2.14 DNA dizi analizi	26
Şekil 2.15 Elektroforegram	27
Şekil 2.16 Filogenetik ağaç çizimi	29
Şekil 2.17 Vertikal ağaçlar	30
Şekil 2.18 Köksüz ağaç	31
Şekil 2.19 Bitki barkodlama için çalışılan farklı belirteçlerin önemini gösteren başarı şeması	45
Şekil 3.1 Örnekleme yapılan istasyonlara ait harita	50
Şekil 3.2 Örneklerin DNA izolasyonuna hazırlanması	52
Şekil 4.1 ITS lokusu için NJ yöntemi ile K2P modeli kullanılarak çizilen filogenetik ağaç	69
Şekil 4.2 ITS lokusu için NJ yöntemi ile K2P+G modeli kullanılarak dünyada yapılan diğer çalışmalar ve örnekleme istasyonlarını birlikte gösteren filogenetik ağaç	69

Şekil 4.3 rbcL lokusu için NJ yöntemi ile T92+G modeli kullanılarak çizilen filogenetik ağaç	70
Şekil 4.4 rbcL lokusu için NJ yöntemi ile TN93 modeli kullanılarak dünyada yapılan diğer çalışmalar ve örnekleme istasyonlarını birlikte gösteren filogenetik ağaç.....	70
Şekil 4.5 ITS lokusuna ait network çizimi	72
Şekil 4.6 rbcL lokusuna ait network çizimi	73
Şekil 5.1 ITS lokusuna ait 8 farklı populasyonu gösteren filogenetik ağaç çizimi.....	80
Şekil 5.2 rbcL lokusuna ait 9 farklı populasyonu gösteren filogenetik ağaç çizimi	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Caulerpa racemosa</i> türüne ait bilimsel sınıflandırma	4
Çizelge 2.2 Bitki DNA barkodlamasında yapılan çalışmalarda kullanılan gen bölgeleri ve kullanılan bitki türleri.....	47
Çizelge 3.1 Türlerle ait örneklerin istasyonlara göre dağılımı ve sayıları	48
Çizelge 3.2 Örnekleme yapılan istasyonların isimleri ve koordinatları.....	49
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primerler ve PCR protokolleri	14
Çizelge 4.1 Örneklerle ait ITS lokusunun nükleotid kompozisyonu (%)	59
Çizelge 4.2 Örneklerle ait rbcL lokusunun nükleotid kompozisyonu (%).....	59
Çizelge 4.3 ITS lokusuna ait nükleotid çifti frekansı.....	60
Çizelge 4.4 rbcL lokusuna ait nükleotid çifti frekansı	60
Çizelge 4.5 rbcL lokusuna ait kodonlar, frekansları ve RSCU oranları.....	61
Çizelge 4.6 ITS lokusu için nükleotid substitüsyon modelleri, BIC, AICc ve InL değerleri.....	63
Çizelge 4.7 ITS lokusu için nükleotid substitüsyon modelleri, BIC, AICc ve InL değerleri.....	24
Çizelge 4.8 ITS lokusu için ortak veri seti kullanılarak oluşturulan nükleotid substitüsyon matrisi.....	25
Çizelge 4.9 rbcL lokusu için ortak veri seti kullanılarak oluşturulan nükleotid substitüsyon matrisi.....	65
Çizelge 4.10 ITS lokusu için ortak veri setine göre oluşturulan ortalama K2P genetik uzaklık değerleri	66
Çizelge 4.11 ITS lokusu için tüm dünyada yapılan <i>C. racemosa</i> çalışmaları ve örnekleme istasyonlarına ait ortak veri setine göre oluşturulan ortalama K2P+G genetik uzaklık değerleri.....	66
Çizelge 4.12 rbcL lokusu için ortak veri setine göre oluşturulan ortalama T92+G genetik uzaklık değerleri	66
Çizelge 4.13 rbcL lokusu için tüm dünyada yapılan <i>C. racemosa</i> çalışmaları ve örnekleme istasyonlarına ait ortak veri setine göre oluşturulan ortalama TN93 genetik uzaklık değerleri.....	67

Çizelge 4.14 ITS lokusuna ait dizileri karşılaştırılan haplotiplerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance)	67
Çizelge 4.15 rbcL lokusuna ait dizileri karşılaştırılan haplotiplerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance)	68

1. GİRİŞ

Biyolojik istilalar geniş yayılım gösteren ve büyük çoğunluğu insan kaynaklı ekolojik değişimlerdir. İnsanlar gemilerle seyahat etmeye başladığından beri beraberlerinde fareler, hastalıklar ve büyük ölçüde fark etmedikleri denizel canlılar gibi “zararlıları da” yanlışlıkla taşımışlardır. Tarihsel kayıtlar ve yelkenli ahşap gemilerin modern kopyaları üzerinde yapılan çalışmalar yüksek oranda denizel organizmalar ile kaplandığını göstermektedir. 1750 yılında ahşap bir gemiyle 120 zararlı denizel canlının taşınabildiği ve bunlardan 30 tanesinin kuru balast ve çapa zinciri ile taşınabildiği ortaya konulmuştur. Bu canlılar seyahat boyunca durulan her limana ulaşmakta ve ulaştıkları her limanın ekosistemine karışmaktadırlar. Gemi kurdu olarak da bilinen *Teredo navalis* (Linnaeus, 1758) bu nedenle tüm dünya üzerinde yayılım gösteren bir canlı olma özelliği gösterirken ne yazık ki gerçek doğal dağılımı asla bilinemeyecektir. Gemi kurdu gibi dağılım gösteren kaç tane canlı olduğu ve bunların doğal yaşam alanları asla bilinemeyecektir (Bax vd. 2003).

Denizel istilalar sadece tarihsel değildir. Her an yaklaşık 10,000 farklı tür biyocoğrafik bölgeler arasında gemilerin balast suları ile taşınmaktadırlar ki balast suları bu yayılımı sağlayan birçok aracın en başında gelmektedir. Ne var ki en azından bu canlıların birçoğu adaptasyon ve balast tanklarındaki karanlık, kirlilik gibi nedenlerle ölmektedirler (Bax vd. 2003). Balast sularının boşaldığı ekosistemlerde (küresel ısınmanın etkisinin olduğu da düşünülmekte (Hellmann vd. 2007)) hayatta kalmayı başaran, yaşamını sürdürüp, neslini devam ettiren türler ise istilacı olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu yeni yaşam alanlarında türün predatörü yoksa ya da popülasyonunun kontrol altında kalmasını sağlayan etkenler bir arada bulunmuyorsa türün nüfusunda aşırı artış görülmeye başlamaktadır (Hellmann vd. 2007). Bu nedenlerle bölgedeki tür çeşitliliği değişmekte endemik türler yok olma tehlikesiyle karşı karşıya gelmektedir. Bilim adamları ve yetkililer gittikçe artan istilacı tür girişlerini denizel biyoçeşitliliğin ve ekosisteminin en büyük tehditleri olarak görmektedirler (Gurevitch ve Padilla 2004).

1869 yılında Kızıldeniz ile Akdeniz'in birbirine bağlanmasını sağlayan Süveyş Kanalı'nın açılması gerek küresel ısınma (Fama vd. 2000, Hellmann vd. 2007) gerekse ticari nedenler ile canlıların göç etmeleri Akdeniz'de büyük bir biyo-ekolojik değişimin başlamasına neden olmuş ve bununla birlikte adaptasyon seviyesi yüksek birçok canlı grubu Akdeniz'e giriş yapmıştır (Tuvia 1978, Keskin 2007). Süveyş Kanalı'nın açılmasıyla 50'si balık olmak üzere 300'den fazla tür Akdeniz'e göç etmiştir (Por 1978, Boudouresque 1999, Galil 2000, Keskin 2007). Göç eden bu türlere kanalın mühendisinin anısına "Lelepsiye Göçmenler" adı verilmiştir (Mater vd. 1995, Keskin 2007).

İlk olarak 1926 yılında Tunus'ta lelepsiye göçmen olarak rapor edilen *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh potansiyel istilacı tür olarak dikkate alınmamıştır (Hamel 1926, Verlaque 1994, Ribera ve Boudouresque 1995, Nuber vd. 2007). Ancak *Caulerpa racemosa*'nın 1990'larda daha önce hiç görülmediği Libya'da (Nizamuddin 1991, Nuber vd. 2007) ve bütün batı Akdeniz'de kolonize olduğunun tespit edilmesiyle bu durum değişmiştir (Nuber vd. 2007). 2002 yılına kadar ise Akdeniz'de bulunan 11 ülke ve tüm büyük adalarda rapor edilmiştir (Verlaque vd. 2003).

Akdeniz'de 3 farklı morfolojik varyetesinin tespit edildiği *C. racemosa* türü (Fama vd. 2000, Verlaque vd. 2000, Durand vd. 2002) Caulerpaceae (Bryopsidales, Chlorophyta) ailesine ait olup Akdeniz'e lelepsiye göçler (Durand vd. 2002, Verlaque vd. 2003), gemi balast suları (Fama vd. 2000) ve akvaryumlardan (Jousson vd. 1998, Stam vd. 2006) olmak üzere 3 farklı yolla bulaşmış olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada; Türkiye'nin denizel florasına bulaşan *Caulerpa racemosa* türünün Ege Denizi'ndeki varyetelerinin morfolojik ve moleküler düzeyde ayrılmasıyla bu türlerin filogenetik ve filocoğrafik ilişkilerinin DNA barkodlama yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Ege Denizi'nin 12 farklı bölgesinden toplamda 240 adet örnek toplanmış, örneklerin morfolojik ayrımında sıkça kullanılan karakterler incelenmiş ve literatürdeki tür tayin anahtarları yardımıyla morfolojik teşhisleri yapılmıştır. Moleküler

incelemelerde ise örneklerin rbcL ve ITS gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile çoğaltılıp, incelenen varyeteler arasındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya çıkarılması amacı ile dizi analizi uygulanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kuramsal Temeller

2.1.1 *Caulerpa racemosa*

2.1.1.1 Sistematığı

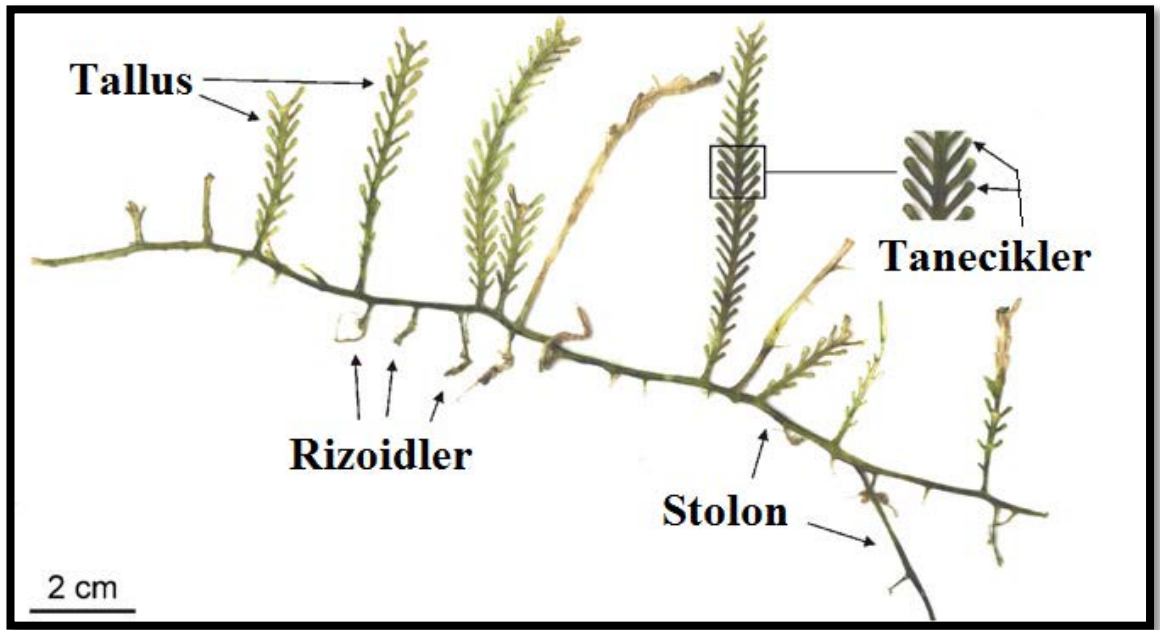
Chlorophyta divizyonunun Bryopsidophyceae sınıfının Bryopsidales takımından Caulerpaceae ailesine ait *Caulerpa* cinsi 85 tür ile temsil edilmektedir (Çizelge 2.1) (Guiry ve Guiry 2014).

Çizelge 2.1 *Caulerpa racemosa* türüne ait bilimsel sınıflandırma

BİLİMSEL SINIFLANDIRMA	
Alem:	Plantae
Bölüm:	Chlorophyta
Sınıf:	Bryopsidophyceae
Takım:	Bryopsidales
Familiya:	Caulerpaceae
Cins:	<i>Caulerpa</i>
Tür:	<i>C. racemosa</i>
BİNOMİAL ADI	
<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J.Agardh, 1873	

2.1.1.2 Morfolojisi

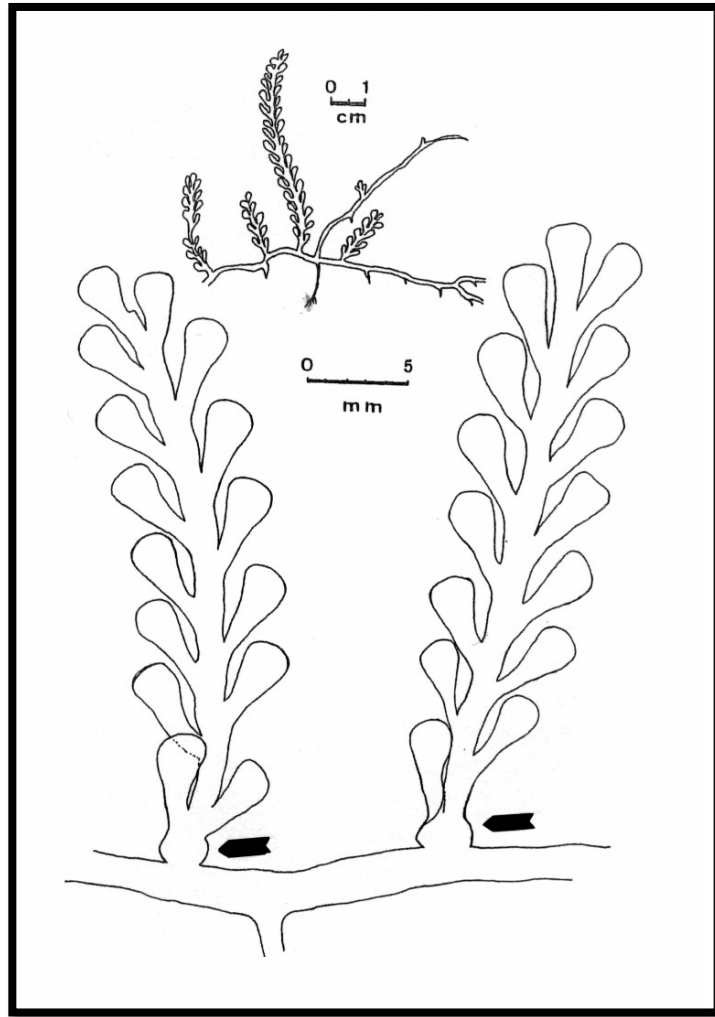
11-19 cm uzunluklarına kadar erişebilen *Caulerpa racemosa* (Klein ve Verlaque 2008) kendi cinsine ait diğer türlerden rizoid, stolon ve talluslarına göre tür seviyesinde ayrılabilir (Verlaque vd. 2003) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 *Caulerpa racemosa*'nın basit morfolojisi (Klein ve Verlaque 2008)

Caulerpa racemosa terminal büyüme özelliği gösteren ve yatay uzanan silindirik şeklindeki stolon, tallusun alt kısmında bitkinin substratına tutunmasını sağlayan renksiz ve çok dallı rizoidler bulunur (Cirik ve Ünlüoğlu 2000). 1-10 (maks. 20) mm uzunluğunda ve 0,3-0,8 (maks. 1,0) mm çapında olan bu rizoidler stolonlara bağlanmaktadır. 0,7-2,0 mm çapında olan stolonlar basit bazen de birbirine dik dallar oluşturacak şekilde gözükebilmektedirler. Bu dallar 1-11 (Akdeniz'de 19 cm'ye kadar) cm yüksekliğinde ve 3-10 mm kalınlığında olabilmektedirler. Bu kolların stolonlarla birleştiği kaidelerde hafif birer şişkinlik bulunmaktadır (Şekil 2.2) (Verlaque vd. 2003). Dik olarak ayrılan bu dallar

üzüm taneleri şeklinde şişkin ve yoğun şekilde sıralanmış dalcıklar (vezikül) ile kaplıdır ve üzüm salkımı görünümündelerdir (Cirik ve Ünlüoğlu 2000). Yukarı kısmın da çok sıkışık olmayan kabarcıklı yapılar silindirik olarak dikey iki sıra halinde veya radyal olarak sıralanmışlardır (bazen her iki durumda görülebilmektedir) (Verlaque vd. 2003). Yaklaşık 3 mm boyundaki bu dalcıkların çapları 1-1,5 mm olup tepe kısımları yassılaştırmıştır (Cirik ve Ünlüoğlu 2000).



Şekil 2.2 *Caulerpa racemosa* türüne spesifik kaide şişkinliği (Gartner 2005)

2.1.1.3 Biyolojisi

0-85 m aralığındaki derinliklerde bulunmakta olan tür 23-28 °C sıcaklıkları arasında yaşadığı bilinmektedir. ‰ 34-37 ppt tuzlulukta 4,2-4,9 ml/l oksijen değerleri olan sularda bulunmaktadır (EOL 2014). Çamurlu veya kumlu sığ sulardan resiflere kadar çok değişik zeminlerde hatta mercanların üzerlerinde bile çoğalabilmektedirler (Marine Species Identification 2014).

Vejetatif olarak çoğalan *C. racemosa* Akdeniz’de Nisan-Eylül ayları arasında büyüyüp gelişir. Bitkiye ait birkaç mm büyüklüğünde bir doku parçasından bile çoğalabilme yeteneğine sahip olan *C. racemosa* halokarpik döllenme ile de üreyebilmektedir (Ruitton vd. 2006, Ceccherelli ve Piazzì 2005, Ohba vd. 1992).

2.1.1.4 Dünyadaki ve Türkiye’deki dağılımı

Düşük sıcaklıklardan tropikal denizlere kadar geniş bir sıcaklık yelpazesinde yetişebilen *C. racemosa* ilk olarak 1926 yılında Tunus’ta rapor edilmiştir. Kızıl Deniz’den göç ettiği düşünülmekte olan *C. racemosa* türü günümüzde tüm Akdeniz’de dağılım göstermektedir (Şekil 2.3). Akdeniz’de en çok dağılım gösteren yosun olan *Caulerpa taxifolia*’dan (M. Vahl) C. Agardh, 1817 bile daha fazla dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Karayip Denizi’nin sığ kesimleri, Bermuda çevresinde, Florida’dan Brezilya’ya (www.europe-alien.org 2014), Afrika’dan Yeni Zelanda ve Avustralya’ya, Avrupa’dan güneybatı Asya’ya kadar dağılım göstermektedir (Guiry ve Guiry 2014).



Şekil 2.3 *Caulerpa racemosa*'nın Türkiye ve Avrupa'daki dağılımı
(www.europe-aliens.org 2014)

2.1.2 Moleküler taksonomi

Yakın bir geçmişe kadar biyoçeşitliliği tespit etmek için yapılan sistematik çalışmalar morfolojik karakterler temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Ancak moleküler genetik alanındaki gelişmeler sonucunda araştırmacılar, tür tanımlamada, türlerin sahip olduğu farklı genetik özelliklerini karşılaştırma yolunu seçmeye başlamışlardır (Klug ve Cummings 2000, Keskin 2007).

Morfolojik tanımlamanın yetersiz kaldığı (sadece tohum, meyve, çiçek gibi canlıya ait bazı parçaların elde edilebildiği durumlar), farklı habitatlarda aynı türe ait bireylerin morfolojik farklılık göstermesi gibi durumlarda veya morfolojik özelliklerine ait farklıların yeterli olmadığı durumlarda moleküler temelli yöntemler kesin ve objektif

sonuçlar verebilmektedir. Morfolojik tanımlama yöntemlerinden daha hızlı ve kesin sonuç alındığı fark edilen moleküler temelli yöntemler hızla yayılmaya başlamıştır. Taksonomik çalışmalarda araştırmacıları genetik özelliklerden faydalanmaya iten en önemli neden de genotipin fenotipten daha üstün, kararlı bir yapıya sahip olmasıdır. Bir karakteri birden fazla lokusun belirlemesi, bir genin birden fazla karakteri etkilemesi ve genotip-evre etkileşimi gibi ilişkiler morfoloji yoluyla elde edilen bilgilerin tek başına yeterli olmasını engellemektedir. Bu sebeple günümüzde bitki taksonomisi ve filogeni çalışmalarında Kloroplast DNA'sını ve nükleer DNA'yı hedef alan moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır (Klug ve Cummings 2000, Keskin 2007, Spies 2013).

2.1.2.1 Bitkilerde DNA barkodlama

DNA barkodlama kavramı, organizmaların genomlarının küçük parçalarındaki DNA dizisi farklılıklarının herhangi bir canlının tür seviyesinde tanımlanmasını sağlayacak biyolojik barkodlar olarak kullanılabilmesidir. Böylece, tanımlanamayan türlerin DNA dizileri ile DNA barkod veri tabanlarındaki DNA dizilerinin eşleştirilmesi yöntemiyle bu türlerin tanımlanmasını sağlayacak evrensel bir tür teşhis anahtarı oluşturulması mümkün olmaktadır (Keskin ve Atar 2013). Yani DNA barkodlama yöntemi “ kısa DNA dizileri ile türleri tanımlama” ifadesi ile özetlenebilir (Stoeckle vd. 2003). Ancak bu yöntem sadece tür tanımlama için kullanılmamaktadır (Kress ve Ericson 2007). Yöntem aynı zamanda filogenetik düzeni yeniden yapılandırma ve yeni türleri tanımlama içinde kullanılmaktadır (Stoeckle vd. 2003).

DNA barkodlamanın avantajları;

- Tür tanımlamayı kolaylaştırmak (Spies 2013),
- Geleneksel tanımlama yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda tanımlama yapabilmek (Keskin 2013, Spies 2013),
- Tür tanımlama üzerine yeni gelişmelere açık olması (Spies 2013),
- Evrimsel süreci ve ilişkileri takip edebilme (Stoeckle vd. 2003, Kress vd. 2009),

- Bitkilerde çok fazla görülen poliploidizasyon ve hibridizasyonu tespit edebilme (Spies 2013),
şeklinde sıralanabilmektedir.

Bitkilerde DNA barkodlamanın etkinliği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu çalışmaların bazıları;

- Sistematikte morfolojik benzerliği nedeni ile aynı tür ismi altında kabul edilen iki canlıdan birinin farklı bir tür olduğunu tespit ederek sistematikteki yerinin düzeltilmesi (Saunders ve McDonald 2010),
- Tanımlaması çok zor olan Bryophyta biyoçeşitliliğin takip edilmesi ve tespit edilmesi (Hajibabaei vd. 2007a, Hausmann vd. 2011, von Crautlein vd. 2011),
- Fosil tohumların tanımlanması (Gismondi vd. 2012),
- Kontrol, kalite ve ticaret: yiyeceklerin içeriklerinin doğrulanması (Baker vd. 2012),
- İlaç sanayii: ilaç içeriğindeki bitkilerin doğrulanması (Xue ve Li 2011),
- Nesli tükenmekte olan türlerin korunması (SAPA 2010, Liu vd. 2011, Wallace vd. 2012),
- Adli Tıp araştırmalarında organik delillerin tür ve lokasyon tespitinin yapılması (Dalton ve Kotze 2011, Kress vd. 2009),
- Özel yapıya sahip kök araştırmalarında: kök morfolojisi ve topraktaki kök artıklarının tanımlanması (Kesanakurti vd. 2011),
- Sistematikte farklı morfolojik farklılıklar nedeni ile farklı varyeteler olarak kabul edilen canlıların aynı tür olduğunu tespit ederek sistematikteki yerinin düzeltilmesi (Keskin 2003)

şeklinde özetlenebilir.

Bitki DNA barkodlama çalışmaları 9-12 Mart 2003 yılında yapılan Cold Spring Harbor Banbury Conference Center’ da yapılan bir çalıştay ile başlamıştır (Stoelke 2003). DNA barkodlamanın hayvanlar üzerindeki başarısı ortaya konulduktan sonra 2004 yılında “Consortium for the Barcode of Life (CBOL)” kurulmuş ve bu alandaki çalışmalar ivme

kazanarak gelişmeye başlamıştır (Anonymous 2014a). CBOL “The Plant Working Group (PWG)” oluşturarak bitkiler içinde evrensel barkod bölgesini bulmayı amaçlayan çalışmaları başlatmıştır (Stoeckle vd. 2004).

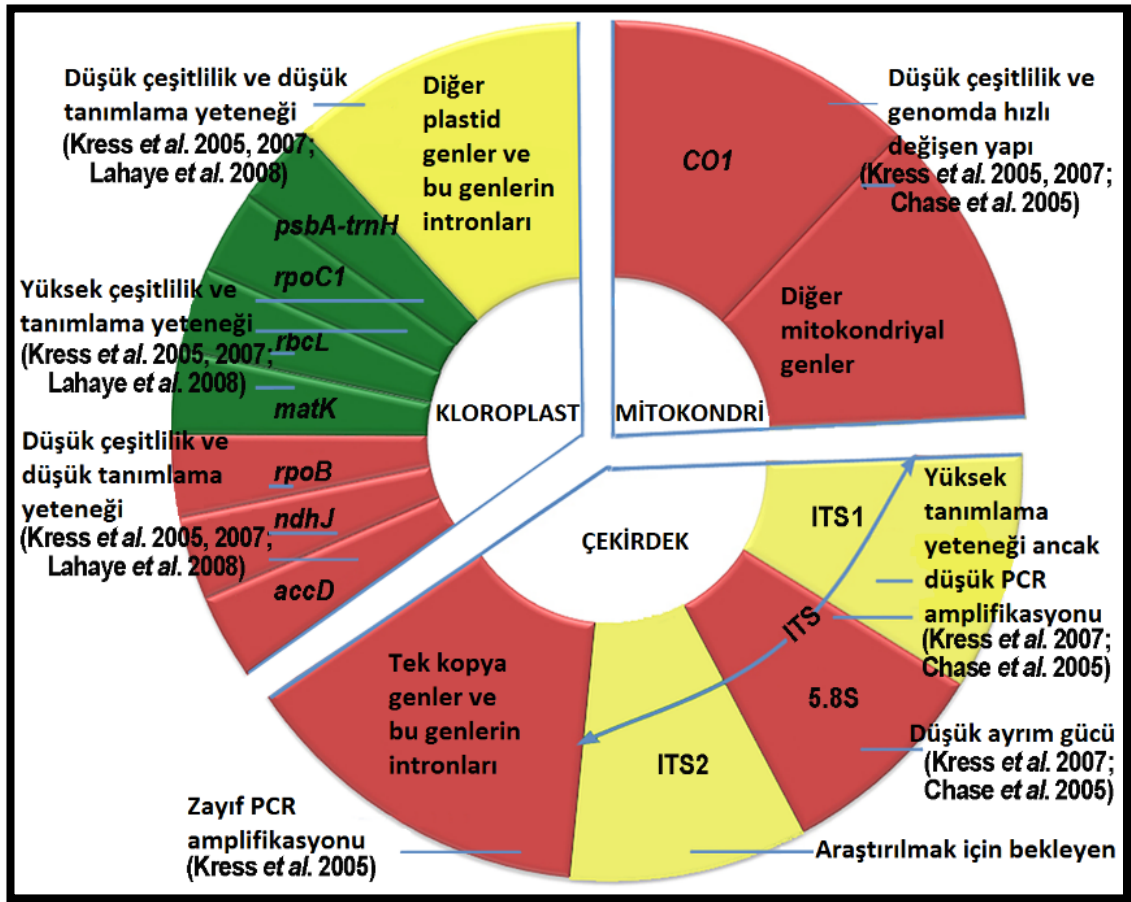
İdeal DNA barkodlama bölgesi bir ya da iki DNA bölgesi ile tür içi ve türler arası farklılıkları ve organizmaya ait tür seviyesinde tanımlamalarını ortaya koyabilmelidir (Hebert vd. 2003, Stoeckle vd. 2003, Kress ve Erickson 2007). Bu barkod bölgeleri kısa (~750 baz çifti (bç)), evrensel ve kolay çoğaltılabilir olmalıdır (Hebert vd. 2003, 2004; Savolainen vd. 2005; Chase vd. 2007; Hajibabaei vd. 2007b).

Hayvanlarda barkod bölgesi olan ve mitokondriyal DNA’da bulunan COI gen bölgesi evrensel olarak kabul görmektedir. Mitokondriyal DNA yapısı, büyüklüğü, yapılanma şekli ve gen düzenindeki hızlı değişimleri nedeniyle hayvanlar için tür düzeyinde kullanılmaya daha uygunken (Liang 1997, Adams ve Palmer 2003, Spies 2013) bitkilerde çok düşük değişkenlik gösterdiği için kullanılamamaktadır (Kress vd. 2005, Chase ve Fay 2009, Hollingsworth vd. 2009). Bu durum araştırmacıları plastid ve nükleer genomlara yönlendirmiştir (Spies 2013). Ancak bitkilerdeki düşük mutasyon oranları nedeni ile araştırmacılar hayvanlardaki gibi tek bir gen bölgesinin bitkiler için evrensel barkod bölgesi olamayacağını, tür seviyesinde tanımlama yapabilmek için en az iki gen bölgesine birden bakılması gerektiğini belirtmişlerdir (Stoeckle vd. 2004, Kress vd. 2005, Rubinoff vd. 2006, Chase vd. 2007). PWG tarafından önerilen ilk barkod bölgeleri ITS, rbcLa ve matK olmuş ve o günden beri bu alanda birçok barkod bölgesi denenmiştir (Stoeckle vd. 2004, Spies 2013).

PWG rbcL ve matK olarak iki barkod bölgesinin kullanımını önermektedir (Hollingsworth vd. 2009). Ancak tüm familyalarda çalışmayan bu kombinasyon evrensel olarak kullanılamamaktadır (Arca vd. 2012, Spies 2013). Bu barkod bölgelerinden biriyle ya da her ikisiyle birlikte ITS lokusunun kullanımının tür seviyesinde tanımlama başarısını %20 arttıracakını belirtilmektedir (Hollingsworth 2011).

2.1.2.2 Kloroplast DNA (cpDNA) ve rbcL lokusu

Kloroplast DNA'sı, bitkilerde gerçekleştirilen, özellikle de tür seviyesinde evrimsel ve filogenetik çalışmalar için en uygun DNA olarak gösterilmektedir (Şekil 2.4) (Liang, 1997).



Şekil 2.4 Bitkilerde bulunan üç genoma ait aday gösterilen barkod genler (Chen vd. 2010)

Yeşil ile işaretlenmiş bölgedekiler potansiyel adaylar, kırmızı ile işaretlenmiş bölgelerdekiler zayıf adaylar ve sarı ile işaretlenmiş bölgelerdekiler ise araştırılmayı bekleyenlerdir

Kloroplastlar kendi genetik materyallerine sahip olması nedeniyle yarı otonom organellerdir. Plastidlerde farklı bir DNA yapısının varlığı Sager ve Ishida (1963) tarafından doğrulanmıştır. Bundan sonra, plastid genom organizasyonu, gen ekspresyonu ve dizi bazlı filogeni üzerinde çalışmalar büyük ölçüde artış göstermiştir. Mitokondriler gibi kloroplastlar da prokaryot orjinlidirler. Serbest yaşamlı, oksijen üreten siyanobakteriler bugünkü kloroplastların ataları olarak kabul edilmektedirler. Mitokondrinin oluşumundan ise oksijen tüketen proteobakteriler sorumludur. Endosimbiont genomların kendi genlerini, genom boyutunda azalma ve bölünme ile sonuçlanan endosimbiyotik gen transferiyle nükleusa aktardığı ve ökaryotik genetik sisteme entegre olduğu büyük ölçüde kabul edilmiştir (Brennicke vd. 1993, Martin ve Herrmann 1998, Race vd. 1999, Timmis vd. 2004, Ravi vd. 2008).

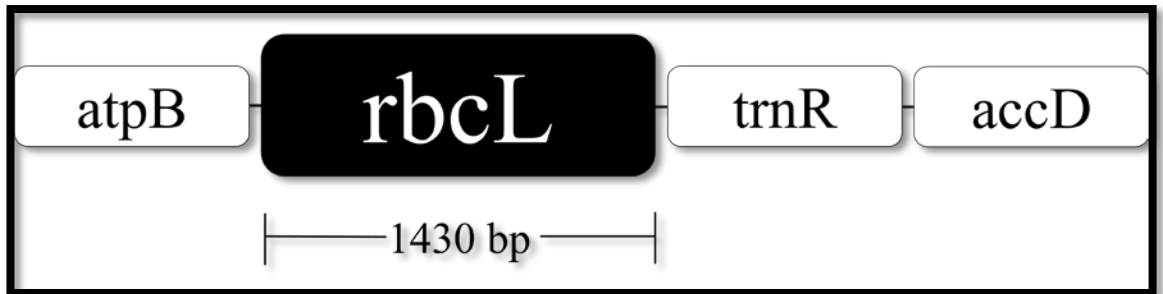
Gelişmiş bitkilerde kloroplast DNA (cpDNA) çift zincirli olup, 35-217 kb aralığında oldukça küçük bir boyutta olmakla birlikte, fotosentetik organizmalarda ortalama 115-165 kb arasında boyutlarda bulunmaktadır. Her hücrede 1000-10000 kopyası mevcuttur. Kloroplast DNA'sı genellikle bir büyük ve bir küçük tekli kopya bölgesi (LSC ve SSC olmak üzere) tarafından ayrılmış tersine çevrilmiş tekrarların (IRA ve IRB) iki kopyasını içerir. Kloroplast DNA'larında bulunan genler genellikle içerik ve sıra bakımından değişik organizma gruplarında korunmuştur (Liang 1997).

Kloroplast DNA'sı;

- Bitki içeriğinde daha fazla olması, böylece DNA ekstraksiyonu ve analizinin daha kolay yapılması,
- Tek kopya gen içermesi,
- Nükleotid içeriğinin daha ölçülü olması,
- Kloroplast genomunun içinde moleküler bilgi için daha geniş bir arka plan mevcut olduğundan, bugüne kadar yapılan bitki sistematiki çalışmalarında daha çok cpDNA kökenli genlerin moleküler verilerinden yararlanılmış olması (Liang 1997), gibi sebeplerden ötürü tercih edilmektedir.

Kloroplast genleri ve genomları filogeni çalışmalarında da kullanılmaktadır. Kloroplast genleri ve genomları bitkiler için oluşturulan soy ağacının çeşitli kısımlarını çözümlemekte etkin rol oynamaktadır. Çeşitli gen bölgeleri filogenetik analizler için geniş ölçüde başarılı ve önemli belirteçler olarak kullanılmıştır. Bunların en önemlileri olarak rbcL, ndhF, matK, atpB, rpl16 ve kodlama yapmayan trnL intron ve trnL- trnF gen bölgeleri gösterilebilir (Ravi vd. 2008).

Bitki filogenetik analizleri için en çok kullanılan gen kodlanmış plastid rbcL genidir (Chase vd. 1993, Donoghue vd. 1992) (Şekil 2.5). Yaklaşık 1430 bp uzunluğunda olan ve 3' ucunda mutasyonlardan arınmış bu tek kopya gen oldukça hızlı evrimleşir. Bu genin fonksiyonu ribuloz 1, 5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RUBISCO ve ya RuBPCase) alt ünitesini kodlamaktır (Doebly vd. 1990). Çoğaltılması ve dizilenmesi kolay olan protein kodlayan bir gendir (Hollingsworth vd. 2009). rbcL geninin nükleotid dizileri verileri tohumlu bitkilerin filogenilerinin yeniden yapılandırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak rbcL geni ile tür seviyesine inmek zaman zaman mümkün olmayabilmektedir (Doebly vd. 1990). Bu nedenle yapılandırmada daha hızlı gelişme sağlamak için başka DNA bölgeleri bulmanın önemli olduğu düşünülmekte ve ITS geninin rbcL geni ile birlikte kullanımının bunu sağlayabileceği düşünülmektedir. Bundan dolayı bitki DNA barkodlama çalışmalarında kullanılmak üzere CBOL'ın önerdiği rbcL ve matK gen bölgelerine ek olarak ITS gen bölgesinin birlikte kullanılmasının tür seviyesinde daha iyi çözünürlük vereceği belirtilmektedir (Fazekas vd. 2008, Hollingsworth 2011).



Şekil 2.5 Kloroplast DNA'sında bulunan rbcL gen bölgesine ait şema

2.1.2.3 Nükleer DNA (nDNA) ve ITS lokusu

Nükleer ribozomal DNA'da bulunan ITS (internal transcribed spacer) geni kloroplast genlerinden 3-4 kat daha fazla değişkenlik gösterdiği için ökaryotlar da yapılan filogeni çalışmalarında daha çok tercih edilmeye başlamıştır (Chase vd. 2007). Nükleer DNA (nDNA) bitkilerde sadece tohumlarla maternal olarak kalıtımı ileten plastid DNA'sıyla karşılaştırıldığında hem polen hem de tohumlarla aktarım yapabilmektedir. Tohumlar polenlerden daha az dağılım göstermektedirler. Bu da ITS gen bölgesinin neden plastid DNA belirteçlerinin daha yüksek çözünürlük gücüne sahip olduğunu açıklayabilmektedir (Hollingsworth vd. 2009). Bu nedenle ITS gen bölgesi daha yüksek amplifikasyon ve ayırım gücüne sahip olduğu için barkod bölgesi olarak önerilmektedir (Stoeckle vd. 2003, Chase vd. 2005, Kress vd. 2005, Spies 2013).

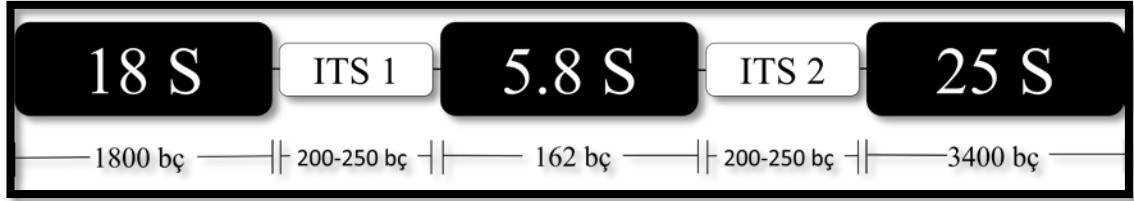
Avantajlarına rağmen ITS genin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar;

- Her hücrede çok fazla kopyasının bulunması bazı bitki türlerinde paralog gen kopyalarının bulunabilmesine neden olmaktadır ve bu durum evrimsel açıdan endişe yaratmaktadır. Dizileme sırasında bu paralog gen kopyaları okunamayan dizi sonuçları verebilmektedir (Hollingsworth 2011),
- Bazı bitki türlerinde dizileme ve amplifiye etme zorlukları çıkmaktadır (Hollingsworth 2011),
- Bitkinin son zamanlarda popülasyondan ayrıldığı durumlarda ayrıldığı popülasyonla arasındaki çeşitlilikte indirgenme görülebilmektedir (Spies 2013),
- ITS bölgesinin ikincil yapılarında düşük amplifikasyonlar görülebilmektedir (Baldwin vd. 1995, Álvarez ve Wendel 2003),

şeklindedir.

Ancak bu problemlerden bazılarının bitkilere spesifik primerlerin geliştirilmesi ile giderilebileceği belirtilmektedir (Cullings ve Vogler 1998). ITS gen bölgesi ile ilgili yapılan tüm çalışma ve yorumlar göz önüne alındığında, ITS gen bölgesinin bitki

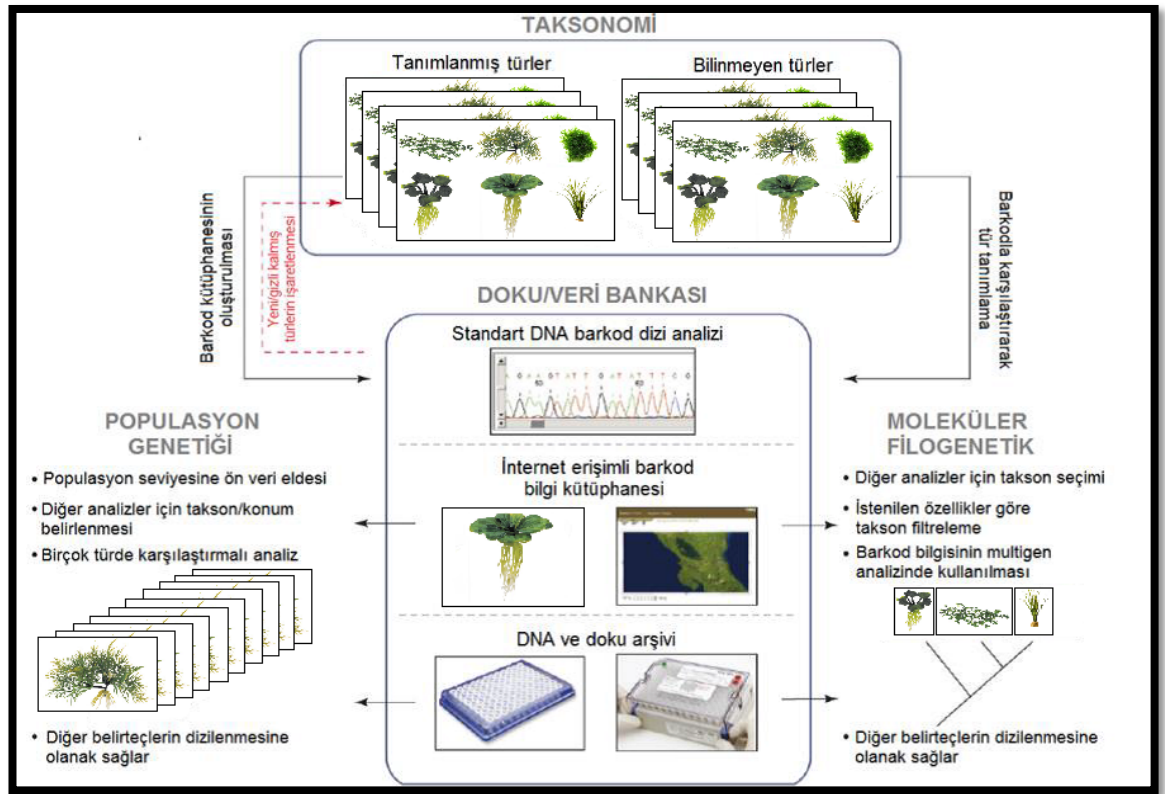
barkodlama çalışmalarında kullanılması için tavsiye edilmektedir (Hollingsworth 2011) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Ribozomal nükleer DNA’da bulunan ITS gen bölgesine ait şema

2.1.3 DNA barkodlama

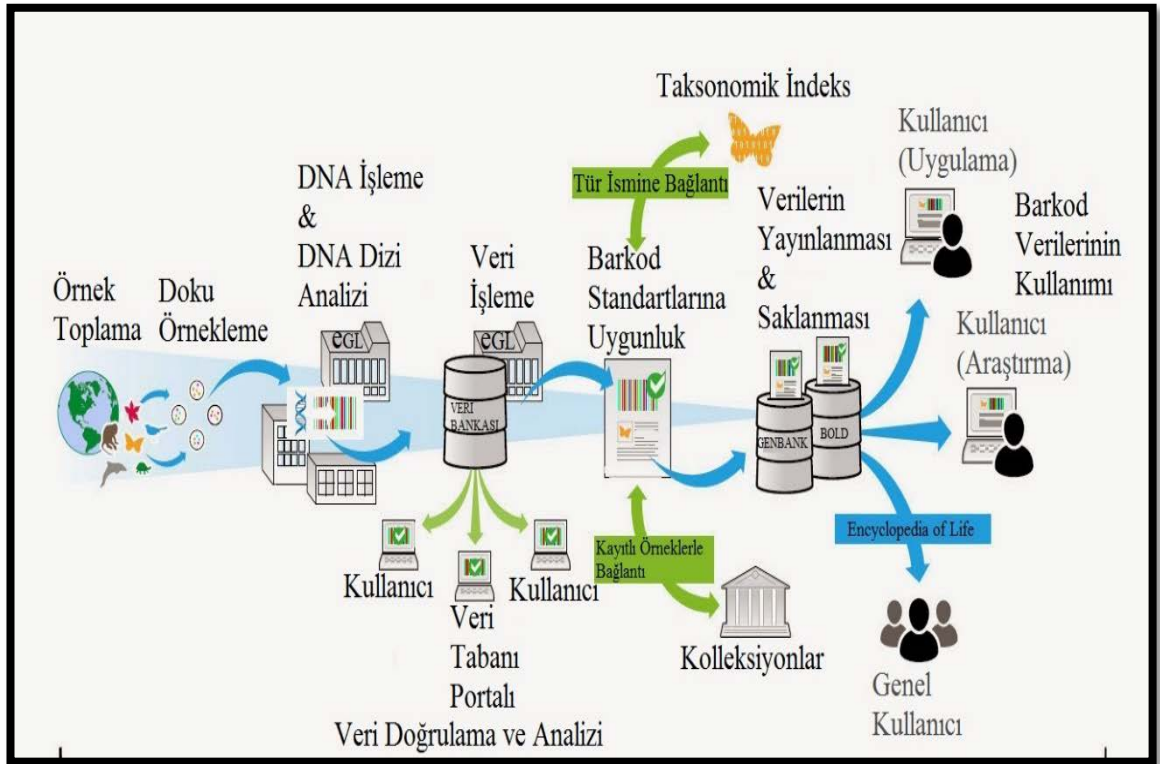
DNA barkodlama yöntemi ile tür tanımlanması genel olarak, elde edilen örneklerden izole edilen DNA’ya ait genomun standart bir kısmından elde edilmiş ve barkod adı verilen kısa DNA dizisinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Hangi tür olduğu bilinmeyen örneklerden elde edilen bu barkod dizileri, tanımlanması gerçekleştirilmiş ve veri tabanına kaydedilmiş barkodlar ile karşılaştırılır ve eşleşme yapılarak tür tanımlaması gerçekleştirilmiş olur. Eşleşme gerçekleşmediği takdirde, benzerlik oranlarına göre, kayıtlı türlere ilişkin yeni bir barkod kaydı olarak (haplotip veya coğrafik varyete) veya potansiyel yeni bir tür olarak değerlendirilir (Keskin 2013) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 DNA barkodlama çalışmalarındaki ana unsurlar ve bunların taksonomi, moleküler filogeni ve populasyon genetiği çalışmalarındaki rolleri (Hajibabaei vd. 2007b'den değiştirilerek alınmıştır)

Örneklemelerin kısıtlı bir taksonomik ve coğrafik kapsamda gerçekleştirilmesi nedeniyle eleştirilen ilk barkodlama çalışmalarından sonra yapılan çalışmalarda tropikal ortamlarda bulunan türleşme bakımından zengin taksonlar (Hajibabaei vd. 2006) ve belirli taksonomik gruplardaki türlerin tamamı hedef alınarak (Meyer ve Paulay 2005) detaylı analizler gerçekleştirilmiştir. Araştırma kuruluşları tarafından oluşturulan uluslararası bir birlik olan ve DNA barkodlamanın tür tanımlanmasında uluslararası bir standart olmasını destekleyen CBOL (Consortium for the Barcode of Life)'un kurulması ve DNA barkodları için küresel, çevrimiçi bir veri yönetim sistemi olan BOLD'un (Barcode of Life Database) geliştirilmesi ile araştırmaların hız kazanması mümkün olmuştur (Ratnasingham ve Hebert 2007).

Barkodlama çalışmaları genel olarak morfolojik karakterler gibi klasik taksonomik yöntemler kullanılarak tanımlanan belirli taksonomik gruplardan elde edilen örneklerle ait DNA barkod dizileri ve diğer bilgiler ile bir araya getirilerek kataloglanması şeklinde yapılmaktadır (Şekil 2.8). DNA barkod verilerinin analizinin son aşamasında neighbor joining (NJ) gibi uzaklık temelli kümeleme yöntemleri kullanılarak (Saitou ve Nei 1987) tür içi ve türler arası uzaklık sonuçları değerlendirilebilmektedir (Hajibabaei vd. 2005).

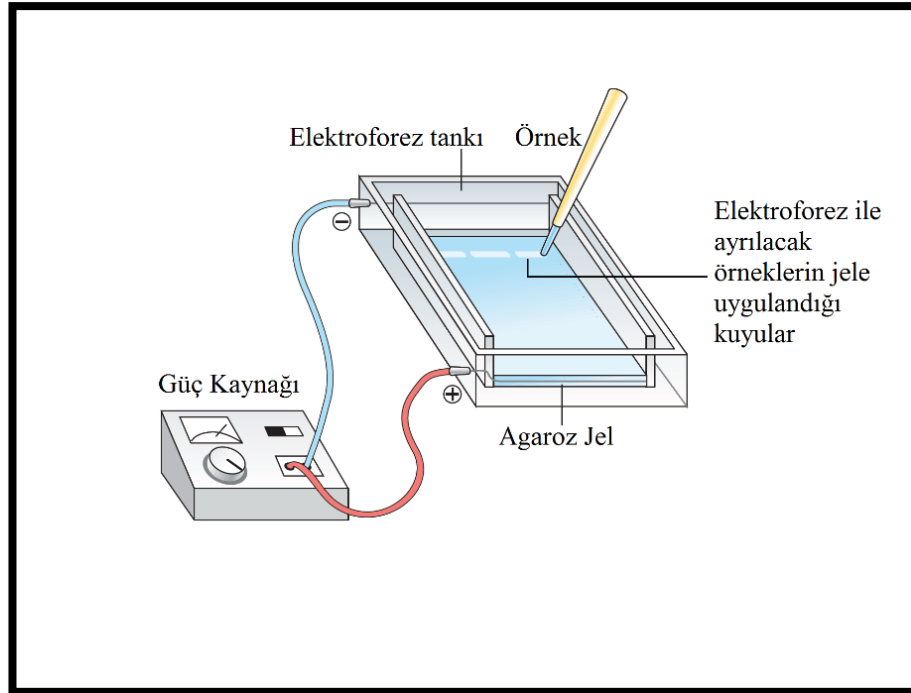


Şekil 2.8 DNA barkodlama iş akış şeması (Anonymous 2014b)

DNA barkodlama yönteminin aşamaları, elde edilen doku örneğinden DNA'nın izolasyonu, uygun primer çiftleri ile seçilen barkod bölgesinin PCR çoğaltılması, çoğaltılan DNA'nın jel elektroforezinde yürütülerek DNA elektroforezinde görüntülenmesi, elde edilen DNA dizi verilerinin filogenetik analizlerinin yapılması ve GenBank ve BOLD veri tabanları ile karşılaştırılarak türe ait filogenetik bilgilerin elde edilmesi şeklinde özetlenebilir.

2.1.3.1 Jel elektroforezi

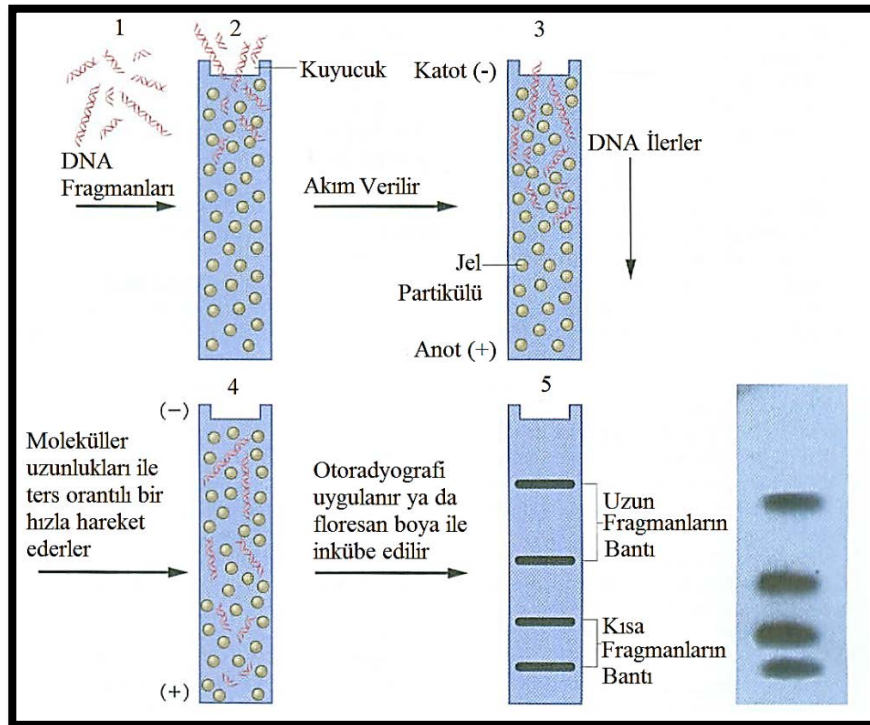
Elektroforez, büyüklük ve elektriksel yük bakımından farklılık gösteren moleküllerin iyonik bir ortamda elektrik alanının etkisiyle hareket hızlarının ölçüldüğü bir yöntemdir (Klug ve Cummings 2000). Temel bir elektroforez seti elektroforez tankı, jel, örneklerin uygulanacağı kuyular ve bir güç kaynağından oluşmaktadır (Şekil 2.9). Ucunda veya ortasında örneklerin koyulduğu kuyucuklar (Özellikle agaroz jel stabil bir yapıda bulunmadığı için örnekler dikey kuyulara koyulmaktadır (Koolman ve Roehm 2005)) bulunan jel, nişasta, agar veya poliakrilamid gibi bileşenlerden oluşmaktadır ve levha benzeri gözenekli jelatin bir yapıdadır (Freeman ve Herron 1999). Ayrıştırılacak molekül karışımı içeren solüsyon pipet aracılığıyla bu kuyulara doldurulur. Daha sonra, ıslak kalmasını ve elektrik akımını iletmesini sağlamak için jel, bir tampon çözelti içerisine yerleştirilir. Elektrotlara bağlanmış olan bir güç kaynağı jel ortamında bir elektriksel alanın oluşmasını sağlar (Freeman ve Herron 1999). Moleküllerden net yükü en fazla olan, zıt kutuplardaki elektroda doğru daha hızlı hareket eder.



Şekil 2.9 Jel Elektroforezi (Koolman ve Roehm 2005)

Jel elektroforezi yöntemi özellikle aynı kütle:yük oranına sahip ancak farklı boyutlardaki molekül karışımlarının ayrıştırılmasında etkilidir. Polinükleotidler fosfat grubu taşıdıkları için eksi yüklüdürler. Örneğin farklı uzunluklarda iki polinükleotid zincirinin her ikisi de anoda doğru hareket ederler. Kütle:yük oranı iki zincirde de aynıdır ve elektriksel alana dayanan ayırım minimumdur. Ancak poliakrilamid jel ya da agaroz jel gibi çeşitli gözenek boyutlarında hazırlanan ortamların kullanımı ile bu iki molekül birbirinden ayrılabilirler (Klug ve Cummings 2000, Keskin 2007).

Şekil 2.10'da görüldüğü gibi, küçük moleküller büyük moleküllere göre jelde daha hızlı yol almaktadırlar. Ayrımın kilit noktası jel matriksine (gözeneklere) dayanmaktadır. Gözenekler, büyük moleküllerin hareketlerini küçük moleküllere göre daha fazla kısıtlamaktadır. Ayırma gücü o kadar yüksektir ki aralarında bir nükleotid fark bulunan polinükleotidler bile açıkça ayrılmaktadır.



Şekil 2.10 Farklı boylarda DNA parçaları içeren karışımın, elektroforetik ayrımı (Klug ve Cummings 2000)

Fotoğraf diyagrama göre agaroz jeldeki DNA bantlarını göstermektedir

2.1.3.1.1 DNA elektroforezi

Solüsyon içindeki DNA molekülü her bir nükleotidin fosfat grubu taşıması nedeni ile negatif yüklüdür. Tüm DNA molekülleri uzunluk farklı gözetilmeksizin yaklaşık aynı kütle:yük oranına sahip olsalar da küçük DNA molekülleri jelde daha hızlı hareket etmektedirler. Yani bir jel üzerinde değişik uzunluğa sahip DNA fragmentleri içeren bir karışım yürütülürse, bu DNA fragmentleri büyüklüklerine göre birbirinden ayrılır (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007). Elektroforez tamamlandıktan sonra, çeşitli büyüklüklerdeki molekülleri temsil eden bantlar, ya molekülün bileşenlerinden birinin radyoaktif maddelerle işaretlenmesi ile ya da nükleik asitlere bağlanan floresan bir boya ile görüntülenebilmektedir. Jel üzerindeki bantları boyar veya floresans hale getirerek görünür kılar, böylelikle bu bantlar fragment büyüklüğüne göre ayırt edilebilir hale gelirler (Şekil 2.11) (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).



Şekil 2.11 Agaroz jel (Ferman ve Herron 1990)

Etidyum bromür ile boyanmış ve ultraviyole ışığın altında görüntülenen DNA parçalarının birbirinden ayrımını gösteren agaroz jel

2.1.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction; PCR)

Rekombinant DNA teknolojisi 1970'lerin başında geliştirilmiş, genetik ve moleküler biyoloji araştırmalarında bir devrim yaratmıştır. Bu yöntemler ayrıca, biyoteknoloji endüstrisinde yapılan çalışmalarda artışa neden olmuştur. Diğer yönden vektörler ve konak hücreleri kullanarak klonlama yapmak son derece yoğun çalışma ve çok zaman gerektirmektedir. 1986 yılında, polimeraz zincir reaksiyonu adı verilen bir teknik geliştirilmiştir. Devrim niteliğinde ileri bir rekombinant DNA yöntemidir ve biyolojik araştırmalarda çok daha hızlı bir şekilde yerini almıştır (Klug ve Cummings 2000).

PCR, DNA klonlaması için hızlı bir tekniktir ve bu nedenle rekombinant DNA araştırmalarının gücünü artırarak DNA klonlamasındaki konak hücre gereksinimini ortadan kaldırmıştır. PCR; moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişim, koruma ve adli tıp gibi birçok uygulamada kullanılmak için seçilen bir yöntemdir (Klug ve Cummings 2000).

PCR, bir seri in vitro reaksiyon boyunca özgül bir DNA dizisinin birçok kopyasını yapar ve farklı DNA molekülleri topluluğunda yok denecek kadar az miktarda bulunan hedef DNA dizisini çoğaltabilir. PCR için öne koşul, klonlanacak DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilerin gerekliliğidir. Dizi bilgisi, iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır: klonlanacak DNA dizisinin bir ucu 5' ucu için, bir de 3' ucu için olmak üzere iki primer. Tek zincirli duruma getirilmiş DNA örneğine primerler ilave edilir. Primerler klonlanacak dizideki eşlenik nükleotidlere bağlanır (hibridizasyon). Hibridizasyondan sonra ortama ısıya dayanıklı DNA polimeraz ilave edilir ve DNA'nın ikinci zinciri sentezlenir (Şekil 2.12). Bu adımların tekrarıyla DNA'nın birçok kopyası oluşturulur (Klug ve Cummings 2000).

Pratikte, PCR’da üç adım vardır. Çoğaltılan DNA’nın miktarı teorik olarak sadece bu adımların tekrarlanma sayıları ile sınırlanır (Klug ve Cummings 2000).

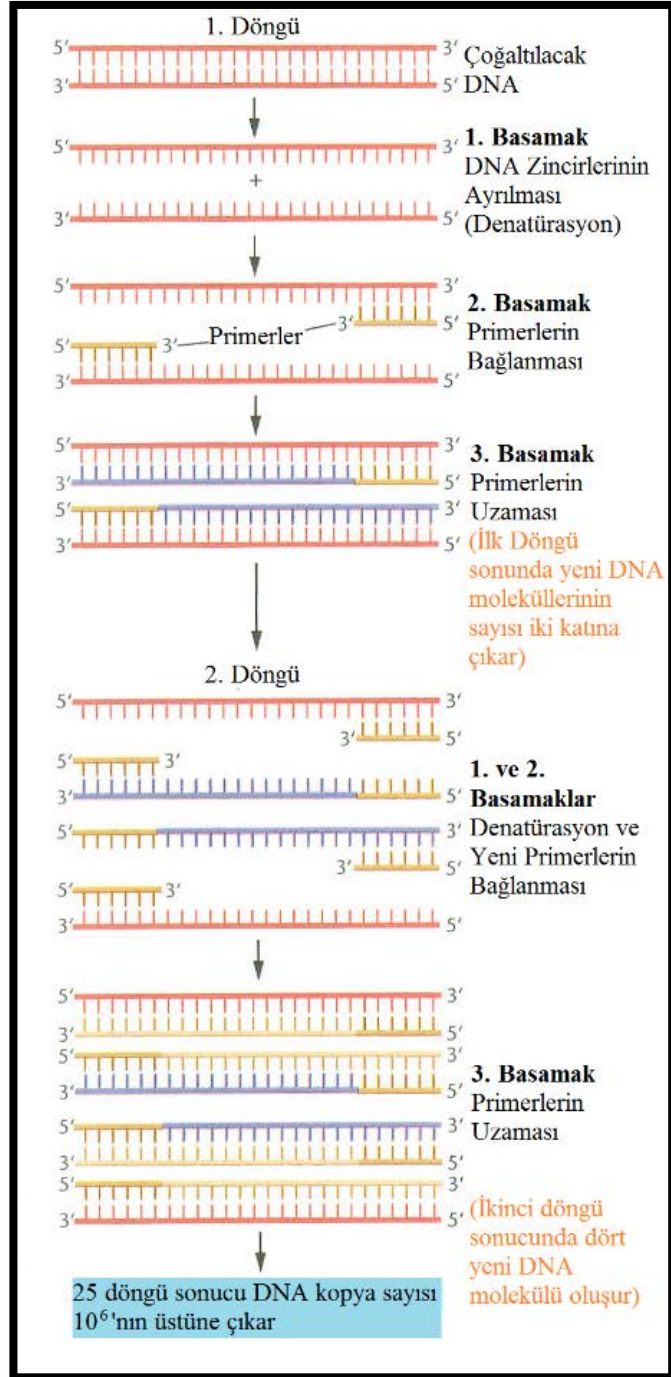
1. Çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bu DNA, temiz olmak zorunda değildir ve genomik DNA değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90-95°C’de, yaklaşık 5 dakika süreyle) (Klug ve Cummings 2000).

2. Sıcaklık 50 ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA’ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotidlerdir (15-30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu, kalıp DNA’nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar (Klug ve Cummings 2000).

3. DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilen enzim, Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70 ila 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5’ den 3’ ne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA’nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Klug ve Cummings 2000).

Bu üç basamaklı her reaksiyon seti için; çift zincirli ürünün tek zincirli hale getirilmesi (denaturation), primerlerin bağlanması (annealing) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extension), bir döngü olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. Yirmi beş-otuz döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık 1.000.000 kez artma olur. İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve

sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir (Klug ve Cummings 2000).

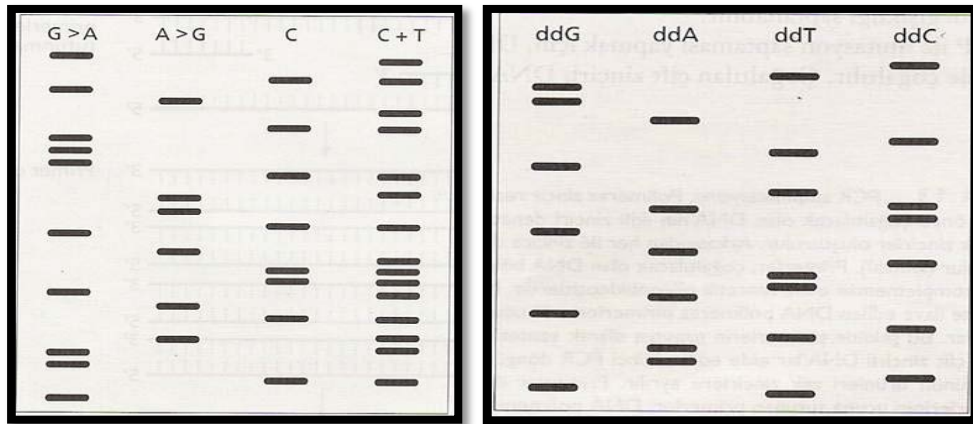


Şekil 2.12 Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) şematik özeti (Klug ve Cummings 2000)

2.1.3.3 DNA dizi analizi

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. 1940’larda DNA baz kompozisyonunu saptama yöntemleri bulunmasına rağmen 1960’larda DNA’daki nükleotid dizilerinin doğrudan kimyasal analizi geliştirilip kullanılmaya başlanmış ve 1970’lerde daha etkin ve doğrudan nükleotid dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır (Klug ve Cummings 2000).

Rekombinant DNA tekniklerinin geliştirilmesi ile birlikte dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır. DNA’nın belirli bazlardan kırılmasına dayanan Allan Maxam ve Walter Gilbert’in kimyasal yöntemidir. Geliştirilen ikinci yöntem ise Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmekte ve iki yöntemde de her baz için bir tane olacak şekilde dizisi belirlenecek DNA’ya dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır. Bu dört reaksiyonun ürünleri, bir nükleotid uzunluğu kadar farklı, bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri jel elektroforezinde ayrılmaktadır. Jel okuması sonunda belirli bir baza karşı gelen her bir bant DNA parçacığının dizisi olarak okunabilmektedir (Şekil 2.13) (Klug ve Cummings 2000).



Şekil 2.13 Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemi (Klug ve Cummings 2000)

Sırasıyla Maxam-Gilbert ve Sanger yöntemi ile elde edilen nükleotid dizileri

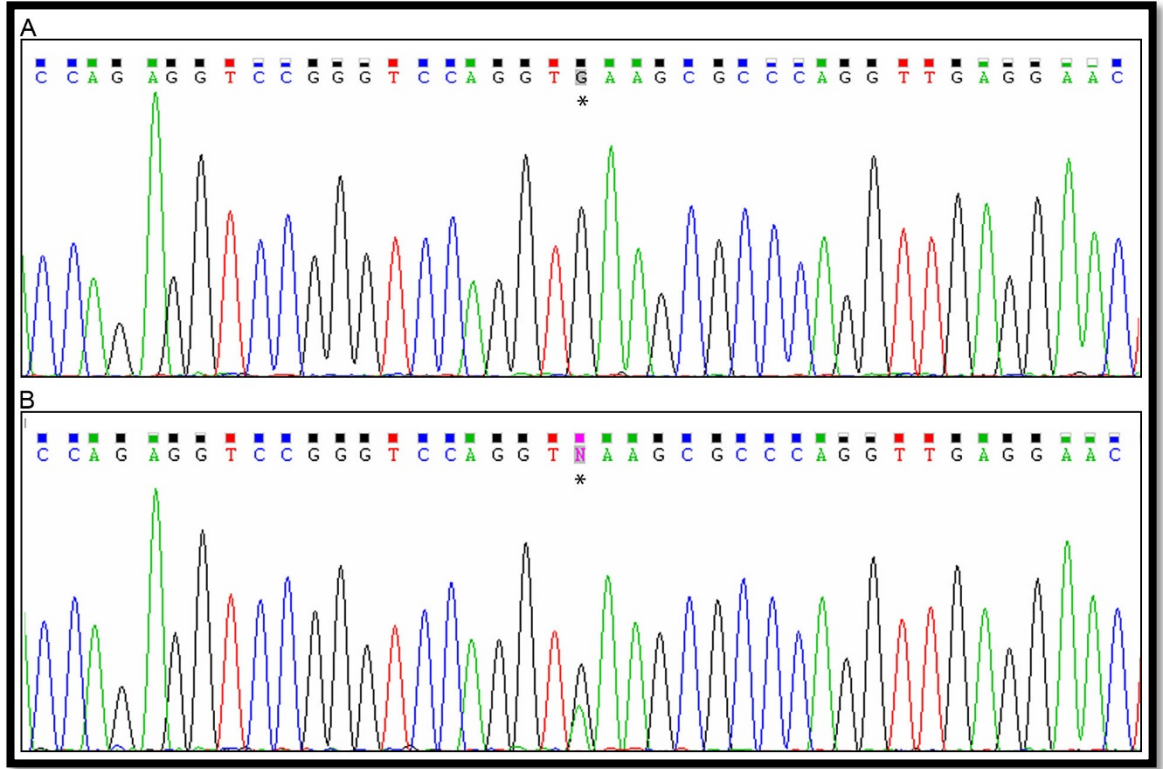
Tek zincirli DNA kalıbının DNA polimeraz enzimi ile 5'den 3'ne doğru sentezlenmesi işlemi DNA dizi analizinde en çok kullanılan yöntemdir. Normal nükleotidler ile birlikte dideoksinükleotid adı verilen özgül baz analogları da DNA dizi analizi reaksiyonlarında kullanılır. Her biri ayrı tüplerde olmak üzere dört reaksiyon seti DNA parçasındaki nükleotid dizisinin tayini için hazırlanır. Her tüpte, dizisi belirlenecek olan tek zincirli bir DNA kalıbı, uygun bir primer, DNA polimeraz, dört nükleotid ve oransal olarak daha az miktarda dört tip dideoksinükleotidlerden sadece biri bulunur. DNA sentezi sırasında, DNA polimeraz, nadiren de olsa uzayan DNA zincirinin yapısına nükleotidlerin yanı sıra dideoksinükleotidleri de yerleştirir. Bu nükleotid analogu 3' hidroksil grubu içermediği için bir sonraki nükleotid ile 3' bağı oluşturamaz ve bu nedenle DNA sentezi sonlanır. Her bir tüpte uzunlukları birbirinden birer nükleotid farklı olan, değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir. Her bir reaksiyon tüpündeki DNA parçaları jel elektroforezine yan yana yüklenerek birbirinden ayrılır. Örneklerin jel üzerinde ki görünimleri merdivene benzer bantlar serisi şeklinde ortaya çıkar. Aşağıdan yukarı doğru okunması ile baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının nükleotid dizisi belirlenmiş olur (Şekil 2.14) (Klug ve Cummings 2000).



Şekil 2.14 DNA dizi analizi (Klug ve Cummings 2000)

Dört ayrı DNA dizi reaksiyonu (her bir hatta) sonucu oluşan bazların ayrımını gösteren DNA dizi analizi jelinin fotoğrafı

Genomların dizi analizi için, otomatik DNA dizi analizi aletleri ve radyoaktif izotop yerine flüoresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılır ve sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Şekil 2.15) (Klug ve Cummings 2000).



Şekil 2.15 Elektroforegram (Klug ve Cummings 2000)

DNA dizi analizi her bir baz için ayrı flüoresan boyaların kullanıldığı makinelerde otomatik olarak yapılabilir; ayrılan bazlar yatay eksen boyunca soldan sağa doğru okunur

Prokaryotik ve ökaryotik genlerde yer alan kontrol bölgelerinin organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin aminoasit dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılan DNA dizi analizi; proteinlerle genler arasındaki birlikteliğin kesin göstergesi olan mutasyonların sayısı, yeri ve çeşidi ile ilgili bilgiler verirken, genlerin organizasyonu ve doğasına ait bilgilerde verir (Klug ve Cummings 2000).

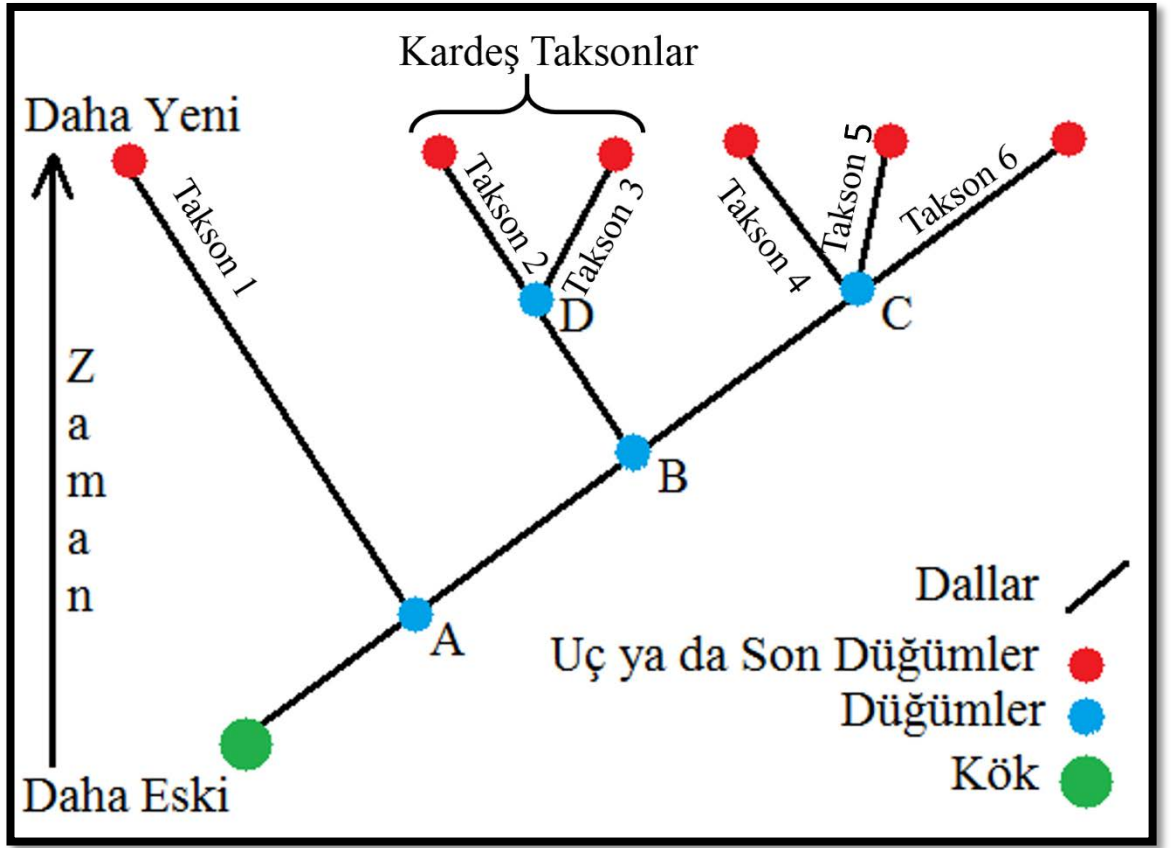
2.1.3.4 Filogenetik analiz

Filogeni, organizmaların evrimsel tarihi olarak bilinmekte ve farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla da filogenetik analizlerden yararlanılmaktadır. Genler ile organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yönelik olan filogenetik çalışmalar, DNA ve proteinlerde meydana gelen değişikliklerin hızını ve karakterini belirlemek için kullanılmakta ve moleküler düzeyde gerçekleştirilmektedir. Filogenetik analizlerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya koymada en uygun yaklaşım, elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizler yoluyla filogenetik ağaçlara dönüştürülmesidir (Saitou ve Imanishi 1989).

2.1.3.4.1 Filogenetik ağaçlar

Dallanma olaylarının modelini ve zamanını (bazı durumlarda) tanımlayan filogenetik ağaç, türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Temel olarak bir düğüm ve dallardan oluşan ağaçta; dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını, düğümler ise bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir (Freeman ve Herron 1999).

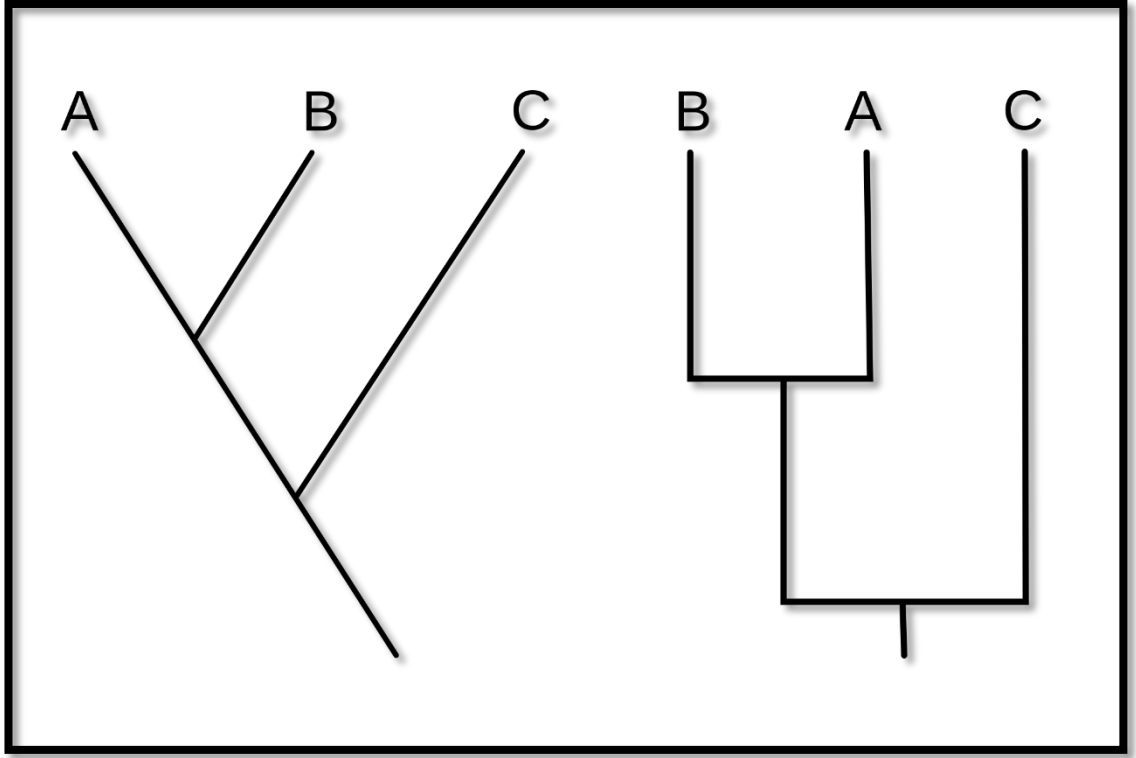
Filogeniler çizmenin yolunu gösteren şekil 2.16'daki ağaçta Takson 1'den Takson 6'ya kadar işaretlenen dal uçları önemli bir noktayı açıklamaktadır: Bir filogeni üzerinde dal ucu, dal veya düğümler popülasyondan veya türden, şube ya da aleme kadar herhangi bir taksonomik düzeydeki canlı popülasyonlarını temsil edebilmektedir (Freeman ve Herron 1999).



Şekil 2.16 Filogenetik ağaç çizimi (Freeman ve Herron 1999)

Bu ağacı okumak için en alttan başlanıp yukarıya doğru devam edilir. A ile gösterilen düğümde bulunan populasyon 1-6 taksonlarının ortak atasıdır. Bu gruplardan biri Takson 1'e evrimleşmiş; diğeri ise 1-5 taksonlarının ortak atası olan düğüm B'de ki populasyona evrimleşmiştir

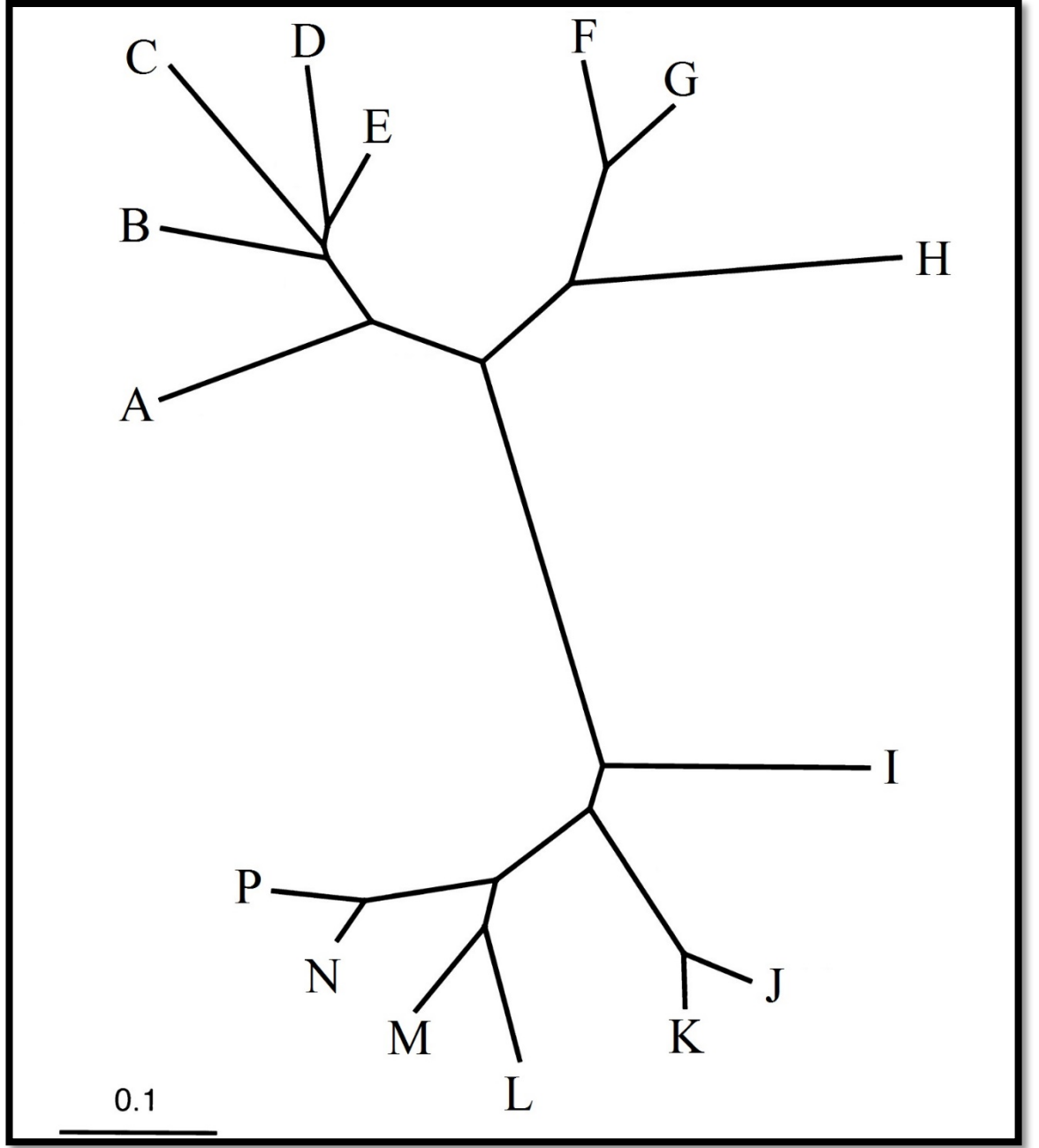
Ağaçlar, kökleri tabanda, uçları tepede vertikal olarak ya da kökleri solda, uçları sağda horizontal olarak konumlanmış olarak iki şekilde okunabilmektedir. Diyagonal ya da içi boş çizgilerden oluşabilen dallar (Şekil 2.17), eğer dal uzunlukları zaman ya da taksonların ayrılmasından sonraki genetik değişim miktarı ile orantılıysa, bir ölçek ya da etiketli eksen ile birlikte verilir. Aksi halde, dal uzunluğu keyfi olup okumayı kolaylaştırmak için çizilmektedirler (Freeman ve Herron 1999).



Şekil 2.17 Vertikal ağaçlar (Mayden ve Wiley 1992)

Bu diyagramlar, aynı evrimsel ilişkileri temsil eden altı farklı yolu göstermektedir. Burada tüm ağaçlar vertikal olarak konumlanmış köklü ağaçlar olup, bazal taksonlar aşağıda, türemiş olanlar ise uca doğru yer alırlar

Köklü ya da köksüz olabilen evrimsel ağaçlardan köklü ağaçlar inceleme altındaki soy hattının nereden köklendiğini tanımladığı için ayrılma olaylarının açığa çıkma sırasını da ortaya koyarken, köksüz ağaçlar, türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymakla birlikte, hangi düğüm ya da dalların tarihte önce ya da sonra açığa çıktıklarına işaret etmezler (Şekil 2.18) (Freeman ve Herron 1999).



Şekil 2.18 Köksüz ağaç (Freeman ve Herron 1999)

Bu köksüz ağaç şekil 2.17’de çizilmiş olan ağaçların taksonları arasındaki aynı ilişkiyi göstermektedir. Ancak bir kökü yoktur, yani evrimsel süreçte hangi dalın önce hangisinin sonra açığa çıktığı konusunda bilgi vermez

Filogeni tahmini yaparak ağaç çizimi yapmak için, genetik farklılıklara ait verileri kullanan çeşitli yöntemler vardır.

2.1.3.4.1.1 Parsimoni

Bir gözlemin en az karmaşık haliyle açıklanması parsimoni olarak tanımlanabilir. Her bir türün en az evrimsel değişikliklerine dayanan ağaçları karşılaştırma ve en basit muhtemel ağacı seçme parsimoni yöntemleridir (Klug ve Cummings 2000). Parsimoniye göre en iyi ağaç, tüm karakterler için en az karakter durum değişimini ifade eden ağaçtır. Kelime olarak tutumluluk anlamına gelen parsimoni, evrimsel süreçte neler olduğuna ilişkin sonuca varılırken, karmaşık yerine basit açıklamaların seçilmesi olarak açıklanabilir (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

Birçok olasılık arasından hangi dallanma modelinin evrimsel tarihi en doğru biçimde yansıttığını tanımlamada bir yaklaşım sağlayan parsimoniye göre tercih edilen ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır. Parsimoni mantığı basit ve zorlayıcıdır. Birçok durumda, konvergans ve geriye dönüşün, ortak bir atadan gelen değişime bağlı olan benzerliğe oranla daha az olacaklarını varsayabiliriz (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

2.1.3.4.1.2 Maksimum olasılık ve genetik uzaklık

Joseph Felsenstein 1981’de elde edilen bilgiyi daha etkili kullanmak ve olası birçok ağaç içerisinde en iyi ağacı seçmede istatistiksel testler kullanma olanağını yaratmak için, maksimum olasılık tahmini olarak bilinen yeni ve güçlü bir yaklaşım sunmuştur (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

Olasılık yaklaşımının temeli moleküler filogeniler için “Farklı tipteki nükleotid değişikliğinin açığa çıkma olasılıklarını tanımlayan bir matematiksel formül ve dal uzunlukları bilinen belli bir ağaç verildiğinde, bu belli DNA dizisi setini elde etme

olasılığı nedir?” sorusunu sormaktadır. Bu stratejiyi hayata geçirmek için, bir bilgisayar programı her ağaç topolojisini değerlendirir veya gözlenen verinin oluşturulması olasılığını hesaplar (verilen belirlenmiş bir karakter modeli altında). Eğer ağaç doğruysa her dalın oluşturulma olasılıkları toplamı, gözlenen verinin oluşturulması olasılığını temsil eder. Bu olasılık ağaçların olasılığı olarak rapor edilir. Öyleyse, yarışan ağaç topolojilerinin kabul ya da reddi için kriter en yüksek olasılığı olan ağacı seçmektir. Maalesef, olasılık metotları hesaplamada yavaşlırlar ve bu teknikle çok büyük veri setleri, daha hızlı parsimoni metotları kullanılarak yapıldığı kadar, kapsamlı analiz edilemezler (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

Oldukça radikal bir yaklaşım, ayrık karakterler verisini (morfolojik bir özelliğin varlığı veya yokluğu ya da bir gendeki homolog bir bölgede bir nükleotidin kimliği gibi) bir uzaklık değerine dönüştürmektedir (Swofford vd. 1996). Örneğin, iki takson arasında nükleotid pozisyonu yüzdesi farklılıkları hesaplanabilir (%10 farklılık, 100 baz başına ortalama 10 nükleotidin değiştiği anlamına gelir). Ayrık karakterlerin tek bir uzaklık ölçüsüne dönüştürülmesi, spesifik bilginin kaybı ile sonuçlanır, fakat taksonlar arasındaki toplam benzerlik derecesini ifade edebilir (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

Olasılık metotlarında olduğu gibi, uzaklık analizleri de araştırmacıların çoklu karakterlerden gelen bilgiyi iki takson arasındaki tek bir bütün uzaklığın ölçümüne çevirmek için bir karakter evrim modeli öngörmelerine gereksinim duyar. DNA dizileri için yaygın biçimde kullanılan bir formül, aynı yerdeki çoklu baz değişimleri için transisyon ve transversiyon baz değişimlerinin frekansındaki farklılıkları düzeltir (Kimura 1980, Wakely 1996, Keskin 2007).

Uzaklık verisinden bir filogeni tahmini yapmak için, taksonları kümeleyen bir bilgisayar programı kullanılır; yani, en benzer formlu sonuçlar arasında biri diğerine yakın bulunur. Taksonları kümelemeyi benzerlikler temelinde yapan bu genel stratejiye fenetik yaklaşım adı verilir (Sneath ve Sokal 1973). Tercih edilen ağaç, taksonlar arasında toplam mesafeyi

en aza indirgeyen ağaçtır. Birkaç farklı kümeleme algoritması yaygın biçimde kullanılmakta olup, analiz edilen mesafenin doğası konusunda az ya da çok sınırlayıcı öngörülerde bulunabilirler (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

2.1.3.4.1.3 Ağaçların güvenilirlik dereceleri

En tutumlu ağaçların güvenilirlik derecelerini istatistiksel olarak değerlendirmek mümkündür (Bremer 1994, Swofford vd 1996, Huelsenbeck ve Rannala 1997). Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri seç-bağla testi (bootstrapping) olarak adı verilir. Seç-bağla testi belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir. Seç-bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Örneğin, çalışmada 300 baz çiftlik bir dizi bulunuyorsa, bilgisayar bu pozisyonlardan birini rastgele seçmek ve bunu yeni veri setinde ilk öge olarak kullanmakla seç-bağla testine başlar. Daha sonra, rastgele seçtiği bir pozisyon, yeni veri setinin ikinci veri noktasını oluşturur (ikinci veri noktasının birincisinin aynı olma şansı 1/300'dür). Bilgisayar orijinal verinin rastgele bir örneklemesini temsil eden, 300 baz çifti içeren yeni bir veri seti oluşturuncaya kadar bu işleme devam eder. Sonra, bu yeni veri seti filogeniyi hesaplamak için kullanılır. Bu işlemi tekrarlamak suretiyle araştırmacı, yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belli bir dalın açığa çıkma yüzdesini %50, %80 ya da %100 şeklinde ortaya koyabilir. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, bu dalın gerçekte var olduğu konusundaki güvenimiz artmaktadır. Eğer belli bir dal için seç-bağla desteği az ise, %50'nin altında diyelim, araştırmacı genellikle ağacın bu kısmındaki dallanma modelini belirleyemediği sonucuna varacak ve bunun sonucunda da yayınladığı ağaçta bu dalı tek düğümden çok çatallı (politomi) (belirsizlik noktası) olarak verecektir (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

İkinci bir yaklaşım ise sade parsimoniden başka bir filogenetik metod kullanmaktır. Maksimum olasılık (maximum likelihood) ve genetik uzaklık (genetic distances) gibi

alternatif metodlar kullanılabilir. Bu metodlar, karakterlerin nasıl evrimleştikleri konusunda farklı varsayımlar ve en iyi filogeni araştırmasında benzer taksonları bir araya getirmede farklı metodlar kullanılır. Oldukça farklı olan bu metodlar, aynı en iyi filogeni üzerinde anlaşılırsa, bu durum en iyi ağacın gerçekten de bulunduğu konusunda bir dereceye kadar güven vermektedirler (Huelsenbeck ve Hillis 1993, Hillis vd. 1994). Çatıştıkları zaman, analiz edilen durumun ağaçları içerisinde en geçerli olanın seçilmesinde, hangi kriterlerin kullanılacağı üzerinde bir yargıya varmak durumunda kalınmaktadır. Benzer bir durumla, tamamen farklı veri setlerinden çizilen ağaçları karşılaştırırken de yüz yüze kalırız. Farklı çalışmalardan elde edilen ağaçlar, yarışan tahminler olarak işlem görürmektelerdir. Çatışmaları durumunda, araştırmacılar karakterleri homoplasiye daha az açık olduğu düşünülen ve daha büyük veri setlerinden hesaplanan ağaçlara daha fazla güvenmektelerdir (Freeman ve Herron 1999, Keskin 2007).

2.2 Kaynak Özetleri

Jousson vd. (1998), yaptıkları çalışmada *Caulerpa racemosa*'nın hangi kaynaktan Akdeniz'e giriş yaptığını araştırmışlar ve moleküler olarak türün 1970'lerde Avrupa'daki bir akvaryum tesisinden Akdeniz'e bulaştığını ortaya koymuşlardır.

Fama vd. (2000) Batı Akdeniz, Panama, Kanarya Adaları ve Batı Avustralya'da *Caulerpa racemosa*'ya ait 11 popülasyonun her birinden aldıkları 21 bireyde ITS1 lokusunu analiz ederek popülasyon içi ve popülasyonlar arası polimorfizm oranını incelemişlerdir. Popülasyonlar arası polimorfizmin popülasyon içinden yüksek olduğunu ve Akdeniz'deki *C. racemosa* bulaşıklığının Avustralya ve Kanarya Adaları'ndan gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır.

Durve vd. (2002), Akdeniz'de *C. racemosa*'nın köken hibritini bulmak için yaptıkları çalışmada elde ettikleri örneklerden ITS lokusunu çoğaltmışlar ve Akdeniz'de 3 farklı varyetesi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Verlaque vd. (2003), Akdeniz'de yaptıkları *C. racemosa* türünü tanımlamaya ve kökenini tespit etmeye yönelik çalışmada örneklerden elde edilen dokulardan izole ettikleri DNA dizisinde ITS lokusunu incelemişler ve türe ait varyasyonları başarı ile tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda Akdeniz'deki *C. racemosa* varyasyonlarının kökeninin Avustralya olduğunu belirtmişlerdir.

Kress vd. (2005), *Nicotiana tabacum* L. ve *Atropa belladonna* L. ile yaptıkları bir çalışmada çiçekli bitkilerde DNA barkodlarının kullanılabilirliğini araştırmışlardır. İki türde plastid genomlarının kullanılabilirliğini karşılaştırmış ve daha sonra 53 bitki ailesinden 80 cins içerisinde bulunan 99 türün üzerinde aday barkod bölgeleri test etmişlerdir. Yapılan çalışmada iki umut verici bölge önerilmiştir, plastid nükleer

intergenic spacer (trnH-psbA) ve RNA kodlayan nükleer genler için internal transcribed spacer (ITS). Araştırma sonuçlarına göre, trnH-psbA bölgesi yüksek ayrılma seviyeleri sergilemiştir, fakat sadece 450 bp uzunluğunda olduğundan 600-800 bp uzunluğunda olan tipik hayvan barkodlarından daha kısa olduğu belirtilmiştir. trnH-psbA angiospermelerde kullanılabilir ve kolay çoğaltılabilir bir bölge olmasına rağmen, kısalığı evrensel bir kullanım için yeterli veri sağlamayabileceği dile getirilmiştir. İkinci aday olarak gösterdikleri ise, rbcL kloroplastını da içeren diğer plastid bölgelerine göre daha hızlı evrimleşen ITS bölgesi olmuştur. ITS'nin kullanılabilirliği özellikle fiziksel bariyerlerle ayrılmış taksonlarda, birçok kopyanın klonlanmasını gerektiren değişken paraloglar ve düşük dizi kalitesiyle sonuçlanan ikincil yapı problemlerini azalttığını ve bu bölgenin bir takım kısıtlamalara sahip olsa da ITS ve trnH-psbA bölgelerinin birlikte kullanılmasının bitki barkodlaması için en iyi çözüm olabileceğini önermişlerdir.

Kara bitkilerindeki sorunu çözmek için Newmaster vd. (2006), tek bir barkodlama geni altında yüksek derecede değişkenlik gösteren lokusların yerleştirilmesi yönünde sıralı bir yöntemin benimsenmesini önermişlerdir. Araştırmacılar rbcL geninin umut vaat ettiğine işaret ederek bu genin tür seviyesinde tanımlama amacına hizmet edip edemeyeceğini araştırmışlardır. rbcL genini gen bankasında bütün büyük gruplarda geniş gösterimi ile en çok karakterize edilen plastid kodlayan bölge olması nedeniyle seçtiklerini, çalışmalarında bu gen üzerine odaklandıklarını ve diğer plastid genleriyle karşılaştırma bakımından iyi bir temel olacağını söylemişlerdir. Gen bankasından aldıkları 10,000'in üzerinde rbcL dizisinden yola çıkarak gerçekleştirdikleri analizler sonucunda bu bölgenin tür seviyesinde ayırmda kullanılabileceğini gösterilmiştir. Bu bölgenin, hem cins seviyesinde ikili gruplar halinde yapılan karşılaştırmaların yaklaşık %85'inde hem de türler arasında ayırım yapabilmek için yeterli varyasyon gösterdiği bulunmuştur. Araştırmacılar, bu genin kara yosunlarının barkodlama çalışmalarında da tek bir lokus olarak hizmet edebileceği, bununla birlikte diğer kodlama yapan plastid bölgeleri ile birlikte değerlendirildiğinde bütün kara bitkilerinde barkodlama çalışmaları için çok daha iyi bir adayın ortaya çıkabileceğini önermişlerdir.

Stam vd. (2006), Florida sahillerinde *C. racemosa* üzerine yaptıkları filogenetik çalışmada 27 bölgeden 256 bireyde ITS ve tufA gen bölgelerini incelemişlerdir. Çalışma kapsamında akvaryum örnekleri dahil internet üzerinden satılan *C. racemosa* türleride incelenmiş ve %12'den fazlası yanlış morfolojik tanımlama ile satılan bu türlerin satışının yasaklanmasını önermişlerdir. Yanlış tanımlanan ve istilacı bir tür olan *C. racemosa*'nın güvenilir bir şekilde ancak moleküler yöntemlerle tespit edilebileceğini öne sürmüşlerdir.

Chase vd. (2007) yapmış oldukları çalışmada, tüm kara bitkilerinin barkodlaması için standart protokol olarak plastid DNA'sının 3 bölgesini karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Aynı zamanda daha önceden avantajları ve dezavantajları tartışılmış, önerilmiş diğer belirteçleri de yeniden gözden geçirmişlerdir. Çalışmalarında plastid DNA'sındaki düşük varyasyon seviyeleri sonrasında, üç bölgeyi birden analiz etmeleri gerekmiştir. Bu bölgeler; hayvanlardaki mitokondrial DNA kadar hızlı evrimleşebilen plastid olmayan bölgeler, kodlanan bölgeler ve kodlanmayan bölgelerdir. Chase vd. (2007), kara bitki barkodlaması için uygun belirteçler olarak 1) rpoC1, rpoB ve matK veya 2) rpoC1, matK, psbA-trnH gibi üçlü bölge seçeneklerini içeren iki farklı kombinasyon taslağı oluşturmuştur.

Kress ve Erickson (2007) kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri içeren barkod lokusu varsayılan 9 bölgenin tekli veya çiftli halde filogenetik olarak farklı 48 cins karşısında (her cins için iki tür) evrimsel uygulamalarını ve dizi farklılığı derecelerini karşılaştırarak, evrensel bir barkod sistemini değerlendirmişlerdir. Tek lokus, cinslerin çiftler halinde olan türleri arasında %79'dan fazla ayrım yapamazken, kodlanmayan bölge trnH-psbA spacer rbcL'yi de içeren 3 kodlanan bölgelerden biriyle birleştiği zaman ayrım %88'e yükselmiştir. *In silico* denemelerde gen bankasından DNA dizileri kullanarak bu lokusların bir alt kümesinin ayırıcı gücünü daha fazla değerlendirmek için yürütülmüştür. Bu denemeler daha önceki gözlemler gibi rbcL ile eşleşmiş trnH-psbA bölgesinin akraba türler arasında doğru tanımlamayı ve ayrımı yapabildiğini desteklemiştir. Sonuç olarak, kodlama yapmayan trnH-psbA bölgesi ve kodlama yapan

rbcl gen kombinasyonunu gerekli evrenselliği ve tür ayrımını sağlayan iki lokuslu evrensel bitki lokusu olarak önermişlerdir.

Nuber vd. (2007), Adriyatik Denizi'nde 35 farklı bölgeden topladıkları *C. racemosa* örneklerinden ITS lokusunu izole etmişlerdir. Çalışma sonunda Adriyatik Denizi'ndeki örnekler ile Akdeniz'deki *C. racemosa* varyetesinin eşleştiğini belirlemişler ve Adriyatik Denizi'ndeki bulaşıklığın Akdeniz kaynaklı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Newmaster vd. (2007), yaptıkları araştırmada altı kodlama yapan (Universal Plastid-UPA, rpoB, rpoC1, accD, rbcL, matK) ve bir kodlama yapmayan (trnH-psbA) kloroplast lokusunun *Compsonura* cinsinde kullanılabilirliğini hem tek hem de çoklu bölge yöntemlerini kullanarak göreceli olarak belirlemeyi amaçlamışlardır. Test ettikleri 5 bölgenin (UPA, rpoB, rpoC1, accD, rbcL) türler karşısında değişken olmadığını, bölgelerden iki tanesinin (matK ve trnH-psbA) önemli derecede varyasyon gösterdiğini ve hindistan cevizinde barkodlama çalışmalarında umut verici olduğunu göstermişlerdir. Kısmen değişken bölge matK ve biraz daha değişken bölge olan trnH-psbA kullanılarak meydana getirilmiş ikili gen yönteminin, örnek olarak denedikleri henüz evrimleşmiş *Compsonura sprucei* (A.DC.) Warb. ve *Compsonura mexicana* (Hemsl.) Janovec türlerini de içeren bütün *Compsonura* cinsi arasında çözüm sağladığını göstermişlerdir.

Schneider ve Schuettpelz (2006), yaptıkları çalışma ile eğrelti otu gametofitlerinin tanımlanmasında DNA barkodlama yönteminin kullanımını ortaya koymuşlardır. Eğrelti otlarının tanımlanmasında, morfolojik karakterlerindeki düşük değişkenlik nedeniyle zor olduğunu belirten araştırmacılar, yapmış oldukları çalışmada, bilinmeyen bir kökenin kısır bir gametofitinden plastid rbcL dizisini elde edip, bu dizinin etkinliğini belirlemek için BLAST yazılımından faydalanmışlardır. Bu yöntemi kullanarak gametofiti *Osmunda regalis* L. olarak tanımlamış, bu tanımlamanın geçerliliğini ve türler arasında farklılığın belirlenmesinde rbcL'nin kullanılabilirliğini değerlendirmek için *Osmunda* eğrelti otu dizilerinin filogenetik analizlerini de gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda elde ettikleri

sonuçlar, DNA temelli tür tanımlamanın, eğrelti otu gametofitlerinin ekolojisinin keşfedilmesinde büyük bir potansiyele sahip olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Vischi vd. (2006) *Helianthus annuus* L., *Helianthus argophyllus* Torr. & A. Gray, *Helianthus debilis* Nuttall, *Helianthus tuberosus* L. adlı dört ayçiçeği örneğini plastid trnH-psbA intergenic spacer kullanarak moleküler seviyede karakterize etmişlerdir. trnH-psbA plastid bölgesini spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltmışlar ve ABI Prism 3730 Automated DNA dizileyicisi ile dizilemişlerdir. Tür içi ve türler arası dizi varyasyonunu DNA barkod sistemi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Dizi düzenlemesinden sonra, tür içi varyasyonu ya çok az ya da yok denecek kadar az, buna karşın SNP, indel, SSR uzunluklarına bağlı olarak türler arası varyasyonu her bir türün belirgin alarak tanımlanabilmesi için yeterli bulmuşlardır. Kısaca araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışmada analiz edilen dört ayçiçeği türünün her birinin doğru bir tanımlanması için trnH-psbA intergenic spacer bölgesindeki değişkenliği yeterli bulmuşlardır.

Sass vd. (2007), yapmış oldukları çalışmada ‘Plant Working Group (PWG) of the Barcoding of Life (CBOL), tarafından önerilen kloroplast bölgeleri ve iki alternatif, kloroplast trnH-psbA spacer ve nükleer ribozomal internal transcribed spacer (nrITS) bölgenin, *Cycadales* üyeleri için uygun bir belirteç olarak etkinliğini test etmişlerdir. PCR kolaylığını, evrensel primerlerle dizi üretimini ve reaksiyon şartlarını, önerilen her bir yedi belirteç için belirleyen araştırmacılar, buna karşın önerilen hiçbir belirtecini test edilen hiçbir tür için uygun bir belirteç kriterini sağlamadığına karar vermiştir. Dizileme zorlukları nr(ITS) için bir dezavantaj olarak kalsa da nr(ITS) genetik değişkenliği bakımından en umut verici belirteç olarak önerilmiştir.

Edwards vd. (2008), *Aspalathus* L. (*Fabaceae: Crotalarieae*) bitki genusu için üç potansiyel barkod bölgesini (nükleer ribozomal ITS, plastid trnH-psbA ve trnT- trnL intergenic spacer) araştırmışlardır. *Aspalathus* filogenetik çalışmalarda düşük DNA dizi

varyasyonu ortaya koyan büyük bir genustur (278 tür). psbA- trnH ve ITS bölgeleri için 51 türe ilişkin veri kümesinde sırasıyla dizilerin %45'i ve %16'sı en az bir başka türün dizisiyle benzerlik göstermiştir, iki türde ise her iki bölge kombine halde olduğunda bile ayırım gözlenememiştir. Tam tersi trnT- trnL, bu veri kümesindeki bütün türler arasında ayırım yapabilmiştir. Daha geniş, 82'den fazla türü kapsayan 5 pairwise karşılaştırılmasında 7 tür, iki bölge kombine hale getirildiğinde bile tanımlanamaz olarak kalmıştır. Dizi verisi ile tanımlanamayan 5 türün 4'ü kalitatif ve kantitatif morfolojik verinin kombinasyon halinde kullanılmasıyla ayırt edilebilmiştir. Bu grupta barkodlamanın zorluğu her üç bölgede de tür içi varyasyon tarafından arttırılmıştır. trnH-psbA bölgesi durumunda, üç tür içi örneğin en az bir başka türle aynı diziye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bitki barkodlaması için aday olarak gösterilen trnH-psbA'nın, yapmış oldukları çalışmada en az ayırım yapabilen bölge olduğu ortaya çıkmıştır.

Ferri vd. (2008), yılında yapmış oldukları çalışmada, 30 farklı bitki türü için iki farklı intergenic spacer bölgesi seçmişlerdir. Araştırmacılar trnH-psbA ve trnL- trnF bölgelerine özgü evrensel primerleri kullanmışlar ve her iki bölge için PCR ve dizileme aşamaları oldukça kolay gerçekleşmiştir. Araştırmacılar BLAST programından yararlanarak (E value, Maximum Identity value gibi değerleri ele alarak) iki gen birlikte analiz edildiğinde doğru tür tanımlama olasılığının oldukça yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Klein ve Verlaque (2008), 169 makale üzerinden yaptıkları derlemede Akdeniz'de bulunan *C. racemosa* türüne ait varyetelerin morfolojik ayırımının çok zor olduğu yapılan bazı çalışmalarda yanlış tanımlandığını belirterek moleküler tanımlama yapan çalışmalarla bu karışıklığın giderildiğini ortaya koymuşlardır.

Biyçeşitlilik için sıcak nokta olarak kabul edilen iki bölgedeki (Orta Amerika ve Güney Afrika) floraların DNA barkodlamasını inceleyen Lahaye vd. (2008a), 1600'den fazla örnekte 8 potansiyel barkod bölgesini karşılaştırmışlardır. Önceki çalışmalarda elde

edilen diziler ile de karşılaştırarak her tür için birden fazla barkod bölgesine bakmışlardır. Yaptıkları çalışma sonunda matK geninin evrensel barkod bölgesi olabileceğini belirten araştırmacılar bu genin aynı zamanda analiz edilen Orta Amerika orkidelerinde tek başına kriptik türleri tanımlamada kullanışlı olduğunu da ileri sürmüşlerdir.

Lahaye vd. (2008b), yapmış oldukları çalışmada Afrika'nın güneyinde yer alan Kruger Ulusal Parkı'nın biyoçeşitlilik kısmını içeren yoğun tarla koleksiyonlarındaki ağaç ve çalılıklar üzerine odaklanmışlardır. Ağaçların ve çalılıkların seçiminden yola çıkarak, yüksek potansiyele sahip barkodları karşılaştırmışlardır. Bunlardan 6 tanesi 'Plant Working Group' tarafından, 2 tanesi ise Kress vd. (2007) tarafından önerilmiştir. Önceki bitki çalışmalarıyla karşılaştırmalar yaparak, tür başına çoklu lokus kalıtlarından da yararlanarak tür içi ve türler arasında mevcut olan varyasyonları hangi DNA barkod bölgesinin ortaya çıkardığını değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda, plastid matK genini çiçekli bitkiler için evrensel barkod olarak tanımlamışlardır. Bu genin tekli lokus olarak da kullanılabilirliğini, aynı zamanda trnH-psbA ile kombinasyon halinde kullanılması durumunda performansında bir miktar artma olduğunu belirtmişlerdir.

Selvaraj vd. (2008), yapmış oldukları araştırmada Zingiberaceae familyasında matK geni ile çalışmışlardır. matK gen dizilerini gen bankasından sağlamışlar ve moleküler analizler için kullanmışlardır. Araştırmacılar haplotiplerin transisyon/transversiyon oranlarını hesaplayıp ve filogenetik analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Aynı zamanda matK geninin DNA barkodlaması için kullanımıyla ilgili sorulara da açıklama getirmişlerdir. Araştırmacılar matK geninin Zingiberaceae familyasının DNA barkodlaması için yeterli varyasyon içerdiğini ve DNA barkodlamada önemli bir gen olduğu sonucunu çıkartmışlardır. Çalışmanın sonunda, Zingiberaceae familyasının üyelerinin tür seviyesinde ayrılabilmesi için barkod olarak matK genine ait 115-130., 680-690. ve 1455-1465. nükleotid pozisyonlarından bir bölge seçilebileceğini önermişlerdir.

Du vd. (2010), yaptıkları çalışmada Çin'deki *Potamogeton* türlerinin hibritlerinde ITS ve rbcL genlerinin DNA dizi verilerini DNA barkodlama yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Çalışmada yedi farklı, geniş dağılım gösteren *Potamogeton* cinsine ait örnekleri sekiz farklı bölgeden elde etmişlerdir. Çalışma sonunda *Potamogeton perfoliatus* L. türünün yeni bir hibritini bulmuşlardır.

Wang vd. (2010), tek çenekli sucul bitkilerden olan Lemnaceae ailesindeki türlerin DNA barkodlama tekniği ile teşhisini yapmışlardır. Morfolojik olarak birbirlerine genellikle benzeyen yaklaşık 38 türük bir aile olduğunu belirten araştırmacılar toplamda 31 türden 2 ile 8 adet arasında aldıkları numunelerde kodlama yapan plastid genleri olan rpoB, rpoC1, rbcL ve matK lokusları ile kodlama yapmayan plastid genleri olan atpF-atpH, psbK-psbI ve trnH-psbA lokuslarına DNA barkodlama yöntemini uygulayarak hangilerinin evrensel barkod bölgesi olarak kullanılabileceğini araştırmışlardır. Çalışma sonunda su mercimekleri için kodlanamayan plastid gen grubundan atpF-atpH lokusunun tür seviyesinde evrensel DNA barkod bölgesi olabileceğini bildirmişlerdir.

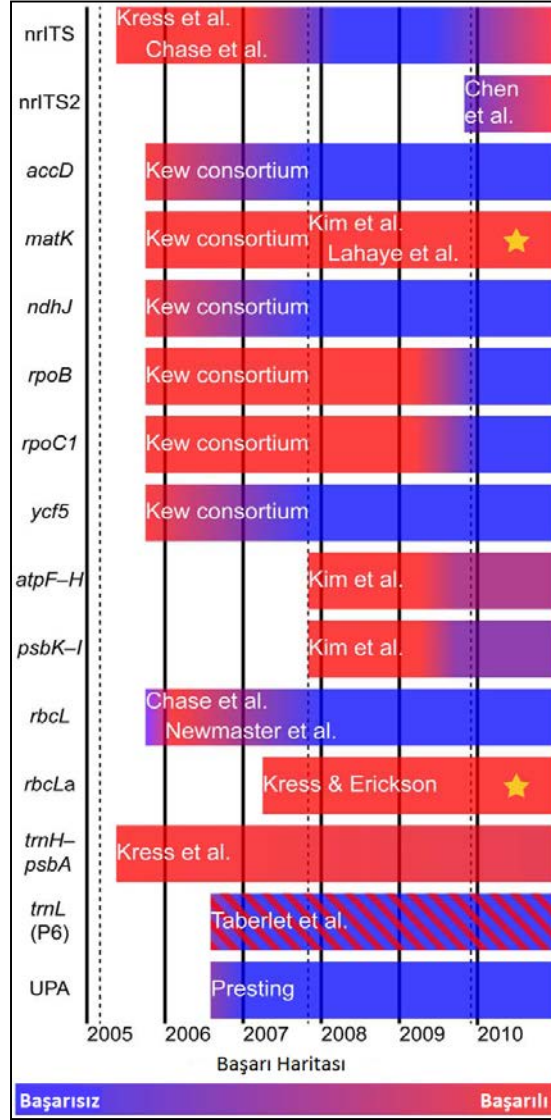
Burgess vd. (2011), yaptıkları çalışmada sıcak kuşak florasındaki çeşitli familyalarda literatürde önerilen hangi gen bölgesinin tür seviyesinde tanımlamada daha başarılı olduğunu araştırmışlardır. Çalışmada örneklerin herbaryum tekniğine uygun olarak morfolojik tayinleri içinde saklandığı belirtilmiştir. Çalışma sonunda rbcL ve matK genlerinin birlikte kullanımı halinde tür seviyesinde tanımlamalarda, familyaya göre değişkenlik göstermiş olsa da %92 ile %100 arasında başarı sağladıklarını bildirmişlerdir.

Hollingsworth vd. (2011), "Bitkiler için DNA barkodunu seçmek ve kullanmak" konulu makalelerinde hayvanlar için evrensel DNA barkod bölgesi olan *COI* geninin başarılı sonuçlar verdiğini ancak bitkilerde DNA barkodlamanın daha zor olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle araştırmacılar bitkiler için kullanılan DNA barkodlarını yeniden incelemiş ve hangi barkod bölgesinin ya da barkod bölgelerinin seçilmesi gerektiğini araştırmışlardır. Yaptıkları derlemede Hollingsworth vd. (2011) rbcL ve matK genlerinin

birlikte kullanımının, tür seviyesinde tanımlamada DNA barkodlama için en uygun yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 2.19).

Lucas vd. (2012) deniz çayırları üzerine yaptıkları çalışmada, DNA barkodlamanın zorluk ve kolaylıklarını açıklamışlardır. Deniz çayırlarının bazı cinslerinin taksonomide hala açığa kavuşmamış olduğu ileri süren araştırmacılar hem eşeyli hem eşeysiz üredikleri, vejatatif olarak yayıldığı, kısa ömürlü oldukları ve karşılaştırılacak referans olmadığı için bu türün çalışılmasının zor olduğunu ileri sürmüşlerdir. Amaçlarının deniz çayırlarını tanımlayabilecek uzman taksonomist olmadığına bu türlerin tespit edilmesini sağlamak olduğunu belirten araştırmacılar, çalışma sonunda rbcL geninin aile bazında iyi sonuçlar vermesine rağmen tür bazında başarı sağlanamadığını, tür bazında başarının sadece matK geni ile sağlandığını ileri sürmüşlerdir.

Vere vd. (2012), Galler bölgesinde çiçekli ve kozalaklı 1143 adet bitki türünün DNA barkodlamasını yapmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada rbcL ve matK genlerini birlikte kullanarak %89,7, rbcL genini kullanarak %97,7 ve matK genini kullanarak %90,2 başarı elde etmişlerdir. Birçok bireyden örnekleme yaptıklarını belirten araştırmacılar örneklerden rbcL geni için 3304 ve matK geni için 2419 DNA dizi analizi yapmışlardır. DNA izolasyonunun %85'i herbaryum örneklerinden yapılmıştır. Çalışma sonunda gen bölgelerinin tür seviyesindeki tanımlanma sonuçları, genlerin tek tek kullanımında %69,4 ile %74,9 arasında çıkarken iki barkod bölgesinin birlikte kullanımında bu başarı oranı %98,6 ile %99,8 arasında değişmekte olduğunu bildirilmiştir.



Şekil 2.19 Bitki barkodlama için çalışılan farklı belirteçlerin önemini gösteren başarı şeması (Hollingworth vd. 2011)

Resmi olmayan bir ölçüm yöntemi ile renkler (Kırmızı: Başarılı; Mavi: Başarısız) CBOL ve International Barcode of Life Project (iBOL) tarafından kabul edilen farklı belirteçler için sistematik araştırmacılarının DNA barkodlama başarılarının arasındaki ilişkiyi temsil etmektedirler

Kazi vd. (2013), yaptıkları çalışmada Hindistan sahillerindeki *C. racemosa* türünün filogenetik analizini ve DNA barkodlamasını gerçekleştirmişlerdir. *C. racemosa* türünde MatK lokusunun olmadığını belirten araştırmacılar, çalışma sonunda tufA geninin tür seviyesinde daha iyi çözünürlük verdiğini belirterek ITS geninin de desteklemek amacı ile kullanılması gerektiğini önermişlerdir.

Sauvage vd. (2013), Yeni Kaledonya’da yaptıkları çalışmada *C. racemosa*’da tufA genini çoğaltarak moleküler analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda *C. racemosa*’ya ait 5 farklı varyasyon tespit ettiklerini ve bu çalışmayla Yeni Kaledonya’da ki *C. racemosa*’ya ait ilk istilacı kaydının yapıldığını belirtmişlerdir.

Çizelge 2.2 Bitki DNA barkodlamasında yapılan çalışmalarda kullanılan gen bölgeleri ve kullanılan bitki türleri

Referans	Kodlamayan Plastid Bölge	Kodlayan Plastid Bölge	Nükleer Bölge	Barkodlanan Bitki
Armenise vd. (2012)	trnH-psbA	rbcL		Kozalaklı Bitkiler
CBOL PWG (2009)		rbcL, matK		Tüm Bitkiler
Chase vd. (2005)	trnH-psbA	rbcL	ITS	
Chase vd. (2007)		rpoC1, rpoB, matK		Tüm Bitkiler 1
Chase vd. (2007)	trnH-psbA	rpoC1, matK		Tüm Bitkiler 2
Chen vd. (2010)			ITS2	Tüm Bitkiler ve Tıbbi Bitkiler
de Groot vd. (2011)	trnL-F	rbcL		Eğrelti Otları
De Mattia vd. (2011)	trnH-psbA	matK		Lamiaceae
de Vere vd. (2012)		rbcL, matK		Çiçekli Bitkiler
Ferri vd. (2008)				Adli Tıp Botaniği
Fu vd. (2011)		rbcL, matK	ITS	<i>Tetrastigma</i> cinsi
Guo vd. (2011)	petD		ITS	<i>Hedyotis</i> cinsi
Han vd. (2012)			ITS/ITS2	Tıbbi Bitkiler
Hollingsworth (2011)	trnH-psbA	rbcL, matK	ITS	Tüm Bitkiler
Jeanson vd. (2011)		rbcL, matK	ITS2	Palmiyeler
Kress ve Erickson (2007)	trnH-psbA	rbcL		Tüm Bitkiler
Kress vd. (2005)	trnH-psbA		ITS	Tüm Bitkiler
Li vd. (2011)		rbcL, matK	ITS/ITS2	Tüm Bitkiler
Li vd. (2012)		ITS		<i>Ficus</i> (Moraceae)
Li vd. (2011)	trnL-F	rbcL, matK		Eğrelti Otları
Liu vd. (2010)				Yosunlar
Liu vd. (2011)	trnL-F		ITS	Porsuk Ağaçları
Luo vd. (2010)			ITS2	Yeşil Bitkiler
Shi vd. (2011)			ITS2	Zingiberaceae
Starr vd. (2009)		matK		Tüm Bitkiler
Sun vd. (2012)		matK		<i>Dioscorea</i> (China)
Theodoridis vd. (2012)	trnH-psbA	matK		<i>Labiatae</i>
Wang vd. (2011)	trnH-psbA	rbcL, matK	ITS	Tüm Bitkiler
Xiang vd. (2011)		matK	ITS	<i>Holcoglossum</i>
Yao vd. (2010)			ITS2	Tüm Bitkiler

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada, Ege Denizi'nden belirlenen istasyonlardan, toplamda 240 adet, *Caulerpa racemosa* türüne ait örnekler kullanılmıştır. Türler'e ait örneklerin istasyonlara göre dağılımı ve sayıları çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Türler'e ait örneklerin istasyonlara göre dağılımı ve sayıları

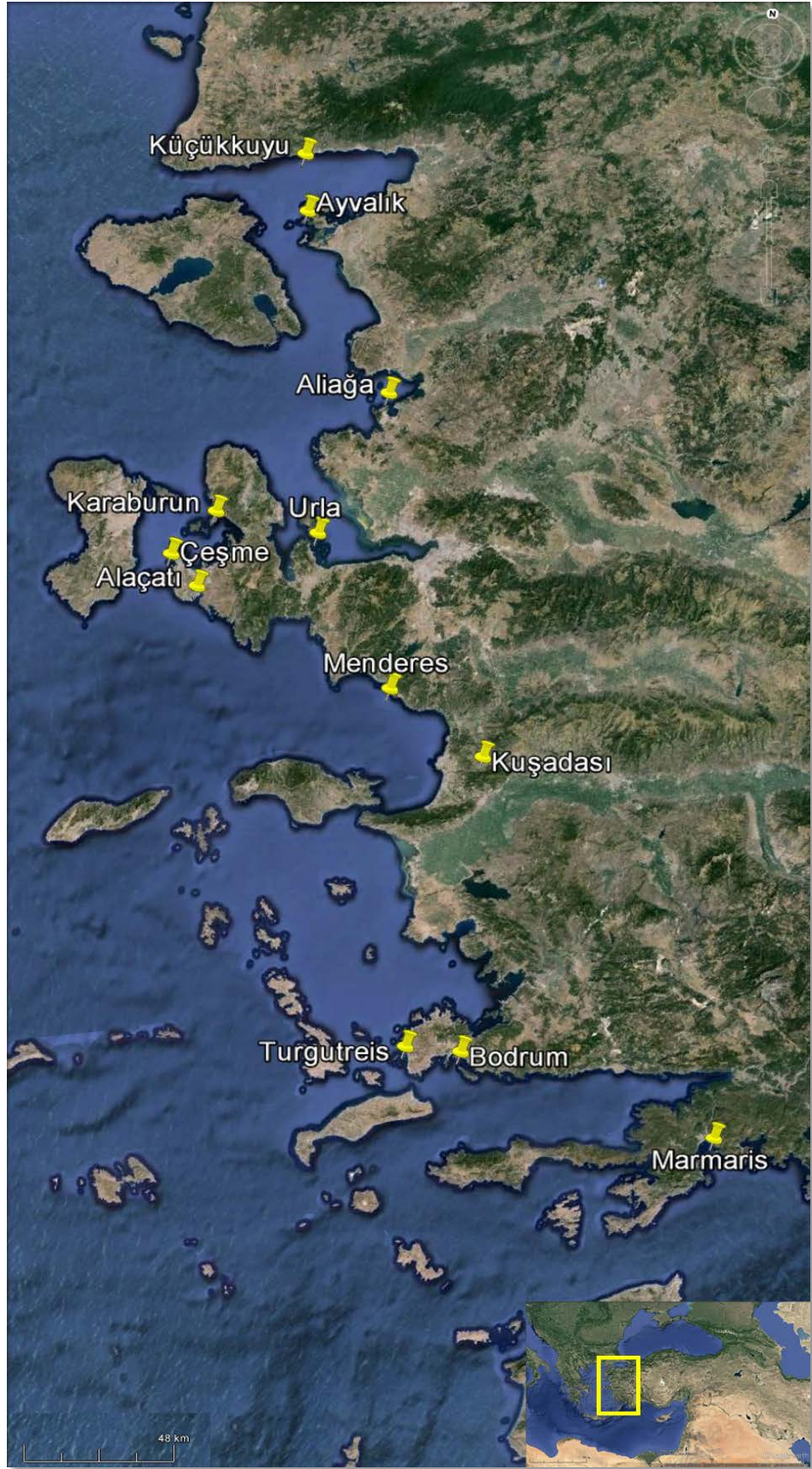
İstasyon Adı	Örnek Sayısı
Küçükkuyu	20
Ayvalık	20
Aliağa	20
Urla	20
Karaburun	20
Çeşme	20
Alaçatı	20
Menderes	20
Kuşadası	20
Turgutreis	20
Bodrum	20
Marmaris	20

3.1.2 Örneklerin elde edilmesi

Örnekler istasyonlara yapılan tüplü dalışlarla elde edilmiştir (Çizelge 3.2 ve Şekil 3.1). Elde edilen örnekler tekneye çıkarılıp ve %70 etanol içerisine alınmışlardır. Morfolojik ve genetik incelemelerin yapılacağı laboratuvara ulaştırılana kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2 Örnekleme yapılan istasyonların isimleri ve koordinatları

İstasyon No	İstasyon Adı	Koordinatlar
1	Küçükkuyu	39°30'K-26°33'D
2	Ayvalık	39°20'K-26°35'D
3	Aliağa	38°50'K-26°56'D
4	Urla	38°25'K-26°45'D
5	Karaburun	38°27'K-26°24'D
6	Çeşme	38°19'K-26°16'D
7	Alaçatı	38°14'K-26°22'D
8	Menderes	38°00'K-27°03'D
9	Kuşadası	37°50'K-27°13'D
10	Turgutreis	37°00'K-27°14'D
11	Bodrum	37°00'K-27°25'D
12	Marmaris	36°49'K-28°17'D



Şekil 3.1 Örnekleme yapılan istasyonlara ait harita

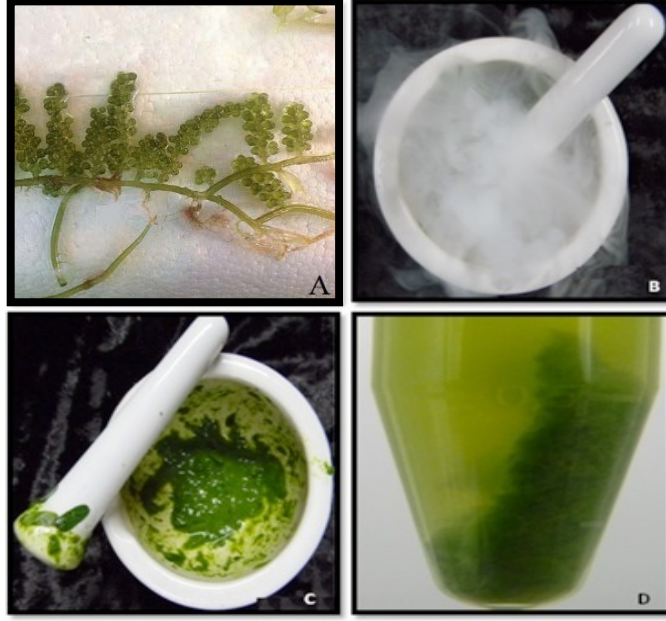
3.2. Yöntem

3.2.2 Morfolojik karakterlere göre tür tayini

%70 etanol içerisinde soğuk zincir bozulmadan laboratuvara getirilen örneklerin morfolojik tanımlamaları Gartner (2005), Verlaque vd. (2003), Weber-van Bosse (1898), Taylor (1960), Womersley (1984), Coppejeans ve Prud'homme van Reine (1992), Litter ve Litter (2000) ve Kazi vd. (2013)'a göre yapılmıştır. Elde edilen veriler internet üzerinden erişilebilen veri tabanlarındaki (<http://species-identification.org> 2014, <http://www.europe-aliens.org> 2014, <http://www.algaebase.org> 2014) değerler ile de karşılaştırılmıştır.

3.2.3 Doku örneklerinin elde edilmesi

Morfolojik tanımlamalar tamamlanarak DNA izolasyonunda kullanılmak üzere örnekler sıvı nitrojenle dondurulup toz haline getirilmiştir (Şekil 3.2). DNA izolasyonu yapılana kadar örnekler -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2 Örneklerin DNA izolasyonuna hazırlanması
Taze örnek (A), Sıvı Nitrojende Dondurma (B), Homojen Hale Getirme (C), DNA İzolasyonu için Saklama (D)

3.2.4 DNA izolasyonu

DNA izolasyonları örneklerin tamamından elde edilecek bitki dokularından gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonları ticari, bitki dokusundan DNA izolasyon kiti (GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit) kullanılarak, üretici tarafından önerilen protokol ve Vere vd. (2012) tarafından bitki DNA izolasyonunda başarıyı artıran modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri, izole edildikten sonra PCR aşamasında kullanılabilecek kadar -20°C 'de saklanmıştır.

3.2.5 DNA'nın spektrofotometrik analizi

İzole edilen DNA'nın miktar ve saflık analizleri spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000) gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu 260 nm 'de 1 OD 'nin 50 ng/ml çift zincir DNA'nın absorpsiyon değeri olduğu göz önüne alınarak hesaplanmıştır. DNA'nın

saflığını değerlendirirken 260 nm/280 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/ protein'in absorpsiyon değeri) ve 260 nm/230 nm (DNA'nın absorpsiyon değeri/Fenol'ün absorpsiyon değeri) değerleri göz önünde bulundurulmuştur.

3.2.6 DNA konsantrasyonunun ayarlanması

Spektrofotometrik analiz ile konsantrasyonları belirlenecek örnekler, ana stoklarının kontamine olmaması ve tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının standardize edilmesi amacı ile DNA konsantrasyonu 50 ng/μl olacak şekilde sulandırılarak saklanmıştır.

3.2.7 Jel elektroforezi

DNA varlığını görüntülemek için jel elektroforezi yönteminden yararlanılmıştır. %1'lik agaroz jel içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirilir ve 2 μl DNA, 4 μl 6X Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Jel'deki ilk kuyuya DNA Ladder yüklenir. Örnekler 100 voltta 30 dakika yürütülmüştür ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine aktarılmıştır. Burada UV ışık altında görüntülenerek bütünlüğü saptanan DNA'nın görüntüsü kontrol edilmiştir. DNA izolasyonunun ardından tüm örnekler bir DNA indeks numarası verilmiştir.

3.2.8 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

İzole edilen kalıp DNA'lar ve bitkilerde kullanılan rbcL ve ITS bölgelerine spesifik evrensel DNA barkodlama primerleri (Çizelge 3.3.) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Gradient termal döngü cihazında farklı bağlanma sıcaklıkları ve farklı MgCl₂ konsantrasyonları ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda uygun döngü

koşulları ve kullanılacak reaktif miktarları saptanmıştır. Belirtilen şartlarda negatif kontrol kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında çoğaltılan DNA'lar %2'lik agaroz jele yüklenerek 100 voltta 30 dakika yürütülmüştür. Ardından UV görüntüleme sisteminde uygun bant boyu ve negatif kontrol bakımından değerlendirilerek saflaştırma işlemi öncesinde 4°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan primerler ve PCR protokolleri (Kress ve Erikson 2007, Fama vd. 2002, 2010)

Hedef Gen	rbcL		ITS	
Primer Çiftleri	rbcLa_f & rbcLa_rev		ITS 1 & ITS 4	
Primer Dizileri	F: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC		F: TCCGTAGGTGAACCTGCGG	
	R: GTAAAATCAAGTCCACCRCG		R: TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Çoğaltılan Kısım	599 baz çifti		700 baz çifti	
PCR Protokolü	Termal Döngü Profili	Reaksiyon	Termal Döngü Profili	Reaksiyon
	95°C 4dakika 94°C 30 saniye 55°C 1 dakika x 35 72°C 1 dakika 72°C 10 dakika	2 µl 10X Buffer 1 µl MgCl ₂ 0.8 µl dNTPs 0.1 µl Forward primer 0.1 µl Reverse primer 0.2 µl Taq polimeraz 1 µl Kalıp DNA	94 °C 5 dakika 94 °C 1 dakika x 35 55 °C 1 dakika 72 °C 2 dakika 72 °C 7 dakika	4 µl 10X Buffer 5 mM MgCl ₂ 1.6 µl dNTPs 0.2 µl Forward primer 0.2 µl Reverse primer 0.5 U Taq polimeraz 2 µl Kalıp DNA

3.2.9 DNA dizi analizi

DNA dizi analizini gerçekleştirmek için ön denemelerde Beckman platformunda Beckman Coulter CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit ve ABI 3130XLGenetic Analyser platformunda Big Dye Cycle Sequencing Kit V.3.1 kullanılarak Dideoksinükleotid zincir sonlanması reaksiyonu için protokoller ve döngü koşulları optimize edilmiştir. Çalışma kapsamındaki tüm DNA dizileme reaksiyonları, üretici tarafından önerilen ve çalışmamıza göre optimize edilmiş protokollere göre yapılmıştır.

Nükleotid dizileri DNA dizi analizi yöntemi ile ortaya çıkarılan ve elde edilen nükleotid dizileri GenBank ve BOLD veri tabanında kayıtlı referans diziler ile karşılaştırılarak hizalanacak ve filogenetik analizlerde kullanılmak üzere standart hale getirilecektir. Daha sonra nükleotid kompozisyonu, nükleotid çifti frekansı ve transisyon/transversiyon oranı hesaplanacak dizilerin, son aşamada DNA barkodlama yönteminin standart modeli olan Kimura 2-parameter modeline göre genetik uzaklık matrisleri oluşturulacak ve neighbor joining ağaçları aralarındaki ilişki ortaya koyulacaktır.

3.2.9.1 Saflaştırma (Pürifikasyon)

Dizi analizinde kullanılan PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kolon yöntemi temelli ticari DNA pürifikasyon kiti (Promega Wizard® SV Gel ve PCR Clean-Up System) üretici firma tarafından önerilen protokol takip edilerek kullanılmıştır. Saflaştırılan PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde, 100 voltta 30 dakika yürütülecek ve UV görüntüleme sistemi yardımı ile görüntülenmiştir.

3.2.9.2 Dizilerin hizalanması

Tüm örneklere ilişkin DNA dizileri GenBank ve BOLD veri tabanlarından elde edilen referans diziler yardımı ile ClustalW (Thompson vd. 1994), MEGA 5.2 (Tamura vd. 2011) ve Sequencher 5.0 yazılımları kullanılarak hizalanmıştır.

3.2.9.3 Nükleotid kompozisyonu

Hizalanması gerçekleştirilen DNA dizilerinin nükleotid kompozisyonları ve ortalama A-T/G-C içerikleri yüzde olarak analiz edilmiştir. Analizlerin gerçekleştirilmesinde MEGA 5.2 ve Sequencher 5.0 yazılımları kullanılmıştır.

3.2.9.4 Nükleotid çifti frekansı

DNA dizilerinin nükleotid çifti frekansı analizleri her istasyon için değerlendirilmiş ve her bir istasyon için sonuç tabloları oluşturulmuştur. Analizler MEGA 5.2 ve Arlequin 3.5 (Excoffier vd. 2005) yazılımları ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.5 Kodon kullanımı

DNA dizilerinin oluşturduğu kodonlar analiz edilmiş ve kodon frekansları ile RSCU (relative synonymous codon usage) oranları tespit edilmiştir. RSCU oranları, gözlenen kodon frekanslarının beklenen kodon frekanslarına (aynı amino asit için kullanılan tüm eş kodonların eşitliği durumunda) oranı olarak hesaplanmıştır (Sharp ve Li 1986). Analizler MEGA 5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.6 Substitüsyon matrisi ve transisyon/transversiyon oranı (R)

Substitüsyon modelinin ve oranlarının hesaplanmasında, ITS için DNA barkodlama yönteminin standart uygulaması olan Kimura 2 Parameter modeli ve rbcL için Tamura 3 Parameter modeli kullanılmıştır (Kimura 1980). Bir bazdan diğerine substitüsyon ihtimalleri transisyonlar ve transversiyonlar olarak MEGA 5.2 yazılımında hesaplanmıştır.

3.2.9.7 Genetik uzaklık

Türler arası ortalama genetik uzaklık analizleri ITS için DNA barkodlamada standart model olan Kimura 2 Parameter ve rbcL için Tamura 3 Parameter kullanılarak MEGA 5.2 ve Arlequin 3.5 yazılımları ile gerçekleştirilmiştir. Uzaklık değerlerinin standart hata hesaplamalarında 1000 tekrarlı bootstrap analizleri kullanılmıştır.

3.2.9.8 Evrimsel ilişki analizi

Evrimsel ilişki analizlerinin gerçekleştirilmesinde MEGA 5.2, PAUP 4.0 (Swofford, 2002) ve PHYLIP (Felsenstein, 1993) yazılımları kullanılmıştır. Örnekler arasındaki evrimsel ilişkinin hesaplanmasında kullanılan yöntemin sonuca etkisinin değerlendirilebilmesi için, ITS için DNA barkodlama yönteminin standart uygulaması olan Kimura 2 Parameter modeli ve rbcL için Tamura 3 Parameter modeli kullanılmıştır. Çalışmada DNA barkodlaması gerçekleştirilen türün popülasyonları arasındaki ilişkilerini gösteren ağaçlar oluşturulmuştur. Ağaçların güvenilirliğinin kontrolünde 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden yararlanılmıştır. Network 4.6.1.2 programı kullanılarak elde edilen verilerin network ilişkileri çizilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Veri Analizleri

Analizler yapılırken 12 istasyonun her birindeki DNA dizilerinin aynı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle her istasyondaki 20 adet örneğe ait DNA dizilerinden birer haplotip alınarak analizlere devam edilmiştir.

4.1.1 Nükleotid kompozisyonu

Farklı uzunluklarda elde edilen DNA dizileri istasyonlar arasındaki en az dizi uzunluğuna sahip haplotip ile aynı olacak şekilde hizalanmıştır. Hizalamadan sonra haplotiplerin ITS ve rbcL lokusları için nükleotid kompozisyonları, G+C ve A+T değerleri çizelge 4.1-4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Örneklere ait ITS lokusunun nükleotid kompozisyonu (%)

İstasyonlar	A	C	G	T	G+C	T+A
Ayvalık	25,0	20,6	26,0	28,4	46,7	53,3
Küçükkuyu	25,0	21,0	25,9	28,1	46,9	53,1
Urla	24,8	21,0	26,1	28,1	47,1	52,9
Aliğa	24,7	21,1	26,2	28,0	47,3	52,7
Çeşme	25,1	20,9	25,8	28,2	46,7	53,3
Alaçatı	25,1	20,9	25,8	28,2	46,7	53,3
Karaburun	25,1	20,9	25,8	28,2	46,7	53,3
Menderes	25,0	21,0	25,9	28,1	46,8	53,2
Kuşadası	25,0	21,0	25,9	28,1	46,8	53,2
Bodrum	25,1	20,7	25,9	28,2	46,7	53,3
Turgutreis	25,1	20,7	25,9	28,2	46,7	53,3
Marmaris	25,1	21,3	25,9	27,7	47,2	52,8
Ortalama	25,0	20,9	25,9	28,1	46,8	53,2

Çizelge 4.2 Örneklere ait rbcL lokusunun nükleotid kompozisyonu (%)

İstasyonlar	A	C	G	T	G+C	T+A
Ayvalık	28,2	15,9	21,9	34,0	37,8	62,2
Küçükkuyu	28,1	16,4	21,8	33,6	38,2	61,8
Urla	28,3	16,1	21,9	33,7	38,0	62,0
Aliğa	28,3	16,1	21,9	33,7	38,0	62,0
Çeşme	28,6	15,6	21,6	34,2	37,2	62,8
Alaçatı	28,6	15,6	21,6	34,2	37,2	62,8
Karaburun	28,6	15,6	21,6	34,2	37,2	62,8
Menderes	28,1	16,4	21,9	33,6	38,3	61,7
Kuşadası	28,3	15,7	21,9	34,2	37,6	62,4
Bodrum	28,3	16,2	21,9	33,6	38,1	61,9
Turgutreis	28,3	15,6	21,9	34,2	37,6	62,4
Marmaris	28,3	16,1	21,8	33,9	37,9	62,1
Ortalama	28,3	16,0	21,8	33,9	37,8	62,2

4.1.2 Nükleotid çifti frekansı

Örneklerin nükleotid kompozisyonları çıkarıldıktan sonra ITS ve rbcL lokusları için nükleotid çifti frekansları hesaplanmıştır. ITS lokusu protein kodlamayan bir gen bölgesi olduğu için kodon verileri verilmemektedir. Veriler çizelge 4.3-4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 ITS lokusuna ait nükleotid çifti frekansı

	ii*	si*	sv*	R*
Ortalama	1212,00	10,00	5,00	2,02

*ii, Eş Çiftler; si, Transisyonel Çiftler; sv, Transversiyonel Çiftler; R, si/sv

Çizelge 4.4 rbcL lokusuna ait nükleotid çifti frekansı

	ii*	si*	sv*	R*
Ortalama	1322,00	15,00	7,00	2,27
1.Kodon	445,00	2,00	1,00	3,45
2.Kodon	447,00	0,00	0,00	2,45
3.Kodon	430,00	13,00	6,00	2,15

*ii, Eş Çiftler; si, Transisyonel Çiftler; sv, Transversiyonel Çiftler; R, si/sv

4.1.3 Kodon kullanımı

Dizi analizi sonucunda elde edilen 1226 baz çiftlik nükleotid dizilerinin veri analizi sonucunda rbcL lokusu için kodon frekansları ve RSCU oranları çizelge 4.5.’de verilmiştir. ITS lokusu protein kodlamayan bir gen bölgesi olduğu için kodon kullanımına ait veriler verilmemiştir.

Çizelge 4.5 rbcL Lokusuna ait kodonlar, frekansları ve RSCU oranları

Kodon	Frekans	RSCU	Kodon	Frekans	RSCU
UUU(F)	12,2	1,28	UCU(S)	7	2,3
UUC(F)	6,8	0,72	UCC(S)	0,2	0,05
UUA(L)	25	3,67	UCA(S)	8,1	2,66
UUG(L)	0,2	0,02	UCG(S)	0	0
CUU(L)	15	2,2	CCU(P)	13,8	2,96
CUC(L)	0,6	0,09	CCC(P)	0	0
CUA(L)	0,2	0,02	CCA(P)	4,8	1,04
CUG(L)	0	0	CCG(P)	0	0
AUU(I)	18,4	2,62	ACU(T)	13,8	2,19
AUC(I)	2,7	0,38	ACC(T)	1,2	0,18
AUA(I)	0	0	ACA(T)	10,3	1,62
AUG(M)	9	1	ACG(T)	0	0
GUU(V)	15,1	2,23	GCU(A)	32,8	2,81
GUC(V)	0,3	0,05	GCC(A)	1,3	0,11
GUA(V)	10,3	1,52	GCA(A)	11,5	0,98
GUG(V)	1,3	0,2	GCG(A)	1,1	0,09
Kodon	Frekans	RSCU	Kodon	Frekans	RSCU
UAU(Y)	16,1	1,78	UGU(C)	9	2
UAC(Y)	2	0,22	UGC(C)	0	0
UAA(*)	0	0	UGA(*)	0	0
UAG(*)	0	0	UGG(W)	6,9	1
CAU(H)	10,5	1,54	CGU(R)	19,8	4,21
CAC(H)	3,2	0,46	CGC(R)	0,6	0,12
CAA(Q)	9,6	1,6	CGA(R)	2,6	0,55
CAG(Q)	2,4	0,4	CGG(R)	0,3	0,05
AAU(N)	12,3	1,72	AGU(S)	3	0,99
AAC(N)	2	0,28	AGC(S)	0	0
AAA(K)	19,7	1,87	AGA(R)	5	1,07
AAG(K)	1,3	0,13	AGG(R)	0	0
GAU(D)	22,6	1,75	GGU(G)	24,3	2,1
GAC(D)	3,2	0,25	GGC(G)	1,4	0,12
GAA(E)	25	1,85	GGA(G)	18,3	1,58
GAG(E)	2	0,15	GGG(G)	2,3	0,2

*Stop kodonlar koyu olarak gösterilmiştir.

4.1.4 Nükleotid substitüsyon modelinin belirlenmesi

Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere substitüsyon modeli belirlenebilmesi için tüm modellerin BIC, AICc ve InL değerleri hesaplanmıştır. Düşük BIC (Bayesian Information Criterion) değerli modellerin en iyi substitüsyon yapısını açıkladığı kabul edilmektedir. Veri setinin substitüsyon yapısını en iyi temsil edecek model ITS için K2P ve rbcL için T92+G olarak belirlenmiştir. Analiz değerleri ve modellere ilişkin bilgiler  izelge 4.6.-4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 ITS lokusu için nükleotid substitüsyon modelleri, BIC, AICc ve lnL değerleri

Model	Parametre	BIC	AICc	lnL
K2	22	4447,32	4280,26	-2118,10
K2+G	23	4448,92	4274,28	-2114,10
T92	23	4452,52	4277,88	-2115,90
T92+G	24	4453,98	4271,75	-2111,83
K2+I	23	4455,31	4280,67	-2117,30
K2+G+I	24	4458,51	4276,28	-2114,10
T92+I	24	4461,99	4279,76	-2115,84
T92+G+I	25	4463,58	4273,75	-2111,83
HKY	25	4464,79	4274,97	-2112,44
HKY+G	26	4466,15	4268,74	-2108,32
JC	21	4473,03	4313,57	-2135,75
TN93	26	4474,01	4276,60	-2112,25
HKY+I	26	4474,08	4276,67	-2112,29
JC+G	22	4475,00	4307,95	-2131,94
TN93+G	27	4475,33	4270,33	-2108,12
HKY+G+I	27	4475,75	4270,75	-2108,32
JC+I	22	4482,55	4315,50	-2135,71
TN93+I	27	4483,25	4278,25	-2112,08
JC+G+I	23	4484,60	4309,95	-2131,94
TN93+G+I	28	4484,93	4272,34	-2108,12
GTR	29	4500,25	4280,07	-2110,98
GTR+G	30	4500,26	4272,49	-2106,18
GTR+I	30	4509,85	4282,08	-2110,98
GTR+G+I	31	4509,86	4274,50	-2106,18

*GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor; +G: Gama dağılımı; +I: Evrimsel sabit

Çizelge 4.7 rbcL lokusu için nükleotid substitüsyon modelleri, BIC, AICc ve lnL değerleri

Model	Parametre	BIC	AICc	lnL
T92+G	24	4776,81	4592,37	-2272,15
T92	23	4779,47	4602,71	-2278,32
HKY+G	26	4779,89	4580,08	-2264,00
TN93+G	27	4779,93	4572,44	-2259,17
TN93	26	4781,78	4581,97	-2264,94
HKY	25	4782,39	4590,27	-2270,09
T92+G+I	25	4785,93	4593,81	-2271,86
T92+I	24	4789,11	4604,67	-2278,30
HKY+G+I	27	4789,49	4582,00	-2263,95
TN93+G+I	28	4789,54	4574,37	-2259,14
TN93+I	27	4791,31	4583,81	-2264,86
HKY+I	26	4791,87	4592,06	-2269,99
GTR+G	30	4806,58	4576,05	-2257,96
GTR	29	4808,62	4585,77	-2263,83
GTR+G+I	31	4815,24	4577,02	-2257,45
GTR+I	30	4817,10	4586,57	-2263,22
K2+G	23	4850,37	4673,60	-2313,77
K2	22	4852,51	4683,43	-2319,68
K2+G+I	24	4859,85	4675,41	-2313,67
K2+I	23	4862,19	4685,43	-2319,68
JC+G	22	4874,76	4705,68	-2330,81
JC	21	4876,19	4714,79	-2336,37
JC+I	22	4882,60	4713,52	-2334,73
JC+G+I	23	4884,38	4707,62	-2330,77

*GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor; +G: Gama dağılımı; +I: Evrimsel sabit

4.1.5 Substitüsyon matrisi

Elde edilen DNA dizi verilerine göre ITS için K2P ve rbcL için T92 modelleri kullanılarak substitüsyon matrisi oranları hesaplanmıştır. Sonuçların kolay anlaşılabilir olması için substitüsyon değerlerinin toplamı 100 olacak şekilde düzenlenmiştir. Değerler çizelge 4.8- 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.8 ITS lokusu için ortak veri seti kullanılarak oluşturulan nükleotid substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	3,65	3,65	17,71
T	3,65	-	17,71	3,65
C	3,65	17,71	-	3,65
G	17,71	3,65	3,65	-

*Hesaplama da kullanılan nükleotid frekansları A: % 25, T: % 25, C: % 25 ve G: % 25 şeklindedir. Transisyonel substitüsyon farklılıkları olan değerler kalın ve transversiyonel substitüsyonlar italik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 rbcL lokusu için ortak veri seti kullanılarak oluşturulan nükleotid substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	4,48	2,72	13,44
T	4,48	-	13,44	2,72
C	4,48	22,15	-	2,72
G	22,15	4,48	2,72	-

*Hesaplama da kullanılan nükleotid frekansları A: % 31,12, T: % 31,12, C: % 18,88 ve G: % 18,88 şeklindedir. Transisyonel substitüsyon farklılıkları olan değerler kalın ve transversiyonel substitüsyonlar italik olarak gösterilmiştir.

4.1.6 Genetik uzaklık

Genetik uzaklık ortak veri setinden 1000 tekrarlı bootstrap ile ITS için K2P ve rbcL için T92+G modelleri kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler çizelge 4.10- 4.12’de verilmiştir. Ayrıca *C. racemosa* türüne ait genbankta kayıtlı diğer tüm ITS ve rbcL DNA dizi verilerinin örnekleme yapılan istasyonlarla karşılaştırılabilmesi için ortak veri setiyle yapılan genetik uzaklık analizleri hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.13’te verilmiştir.

Çizelge 4.10 ITS lokusu için örnekleme istasyonlarına ait ortak veri setine göre oluşturulan ortalama K2P genetik uzaklık değerleri

	d	S.H.
<i>Caulerpa racemosa</i>	0,012	0,002

d: Genetik Uzaklık, S.H.: Standart Hata

Çizelge 4.11 ITS lokusu için tüm dünyada yapılan *C. racemosa* çalışmaları ve örnekleme istasyonlarına ait ortak veri setine göre oluşturulan ortalama K2P+G genetik uzaklık değerleri

	d	S.H.
<i>Caulerpa racemosa</i>	0,066	0,005

d: Genetik Uzaklık, S.H.: Standart Hata

Çizelge 4.12 rbcL lokusu için ortak veri setine göre oluşturulan ortalama T92+G genetik uzaklık değerleri

	d	S.H.
<i>Caulerpa racemosa</i>	0,017	0,002

d: Genetik Uzaklık, S.H.: Standart Hata

Çizelge 4.13 rbcL lokusu için tüm dünyada yapılan *C. racemosa* çalışmaları ve örnekleme istasyonlarına ait ortak veri setine göre oluşturulan ortalama TN93 genetik uzaklık değerleri

	d	S.H.
<i>Caulerpa racemosa</i>	0,019	0,003

d: Genetik Uzaklık, S.H.: Standart Hata

“Pairwise Distance” yöntemi kullanılarak, dizi analizi yapılan *C. racemosa*’nın bölgesel varyeteleri, birbirlerine olan uzaklıkları ve ortalama değerleri ITS ve rbcL lokusları için çizelge 4.14-4.15’te verilmiştir.

Çizelge 4.14 ITS lokusuna ait dizileri karşılaştırılan haplotiplerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,004
2	0,009		0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004
3	0,009	0,010		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004
4	0,015	0,016	0,012		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004
5	0,014	0,014	0,012	0,017		0,000	0,000	0,001	0,001	0,003	0,003	0,004
6	0,014	0,014	0,012	0,017	0,000		0,000	0,001	0,001	0,003	0,003	0,004
7	0,014	0,014	0,012	0,017	0,000	0,000		0,001	0,001	0,003	0,003	0,004
8	0,014	0,014	0,012	0,017	0,002	0,002	0,002		0,000	0,003	0,003	0,004
9	0,014	0,014	0,012	0,017	0,002	0,002	0,002	0,000		0,003	0,003	0,004
10	0,015	0,015	0,012	0,017	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011		0,000	0,003
11	0,015	0,015	0,012	0,017	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011	0,000		0,003
12	0,022	0,022	0,018	0,024	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,013	0,013	

İstasyonlar arası en yüksek ve en düşük genetik uzaklık değerleri koyu olarak işaretlenmiştir. Standart hata değerleri kırmızı olarak gösterilmiştir. 1: Ayvalık, 2: Küçükkuyu, 3: Urla, 4: Aliğa, 5: Çeşme, 6: Alaçatı, 7: Karaburun, 8: Menderes, 9: Kuşadası, 10: Bodrum, 11: Turgutreis, 12: Marmaris

Çizelge 4.15 rbcL lokusuna ait dizileri karşılaştırılan haplotiplerin birbirlerine olan uzaklık indeksleri (Pairwise Distance)

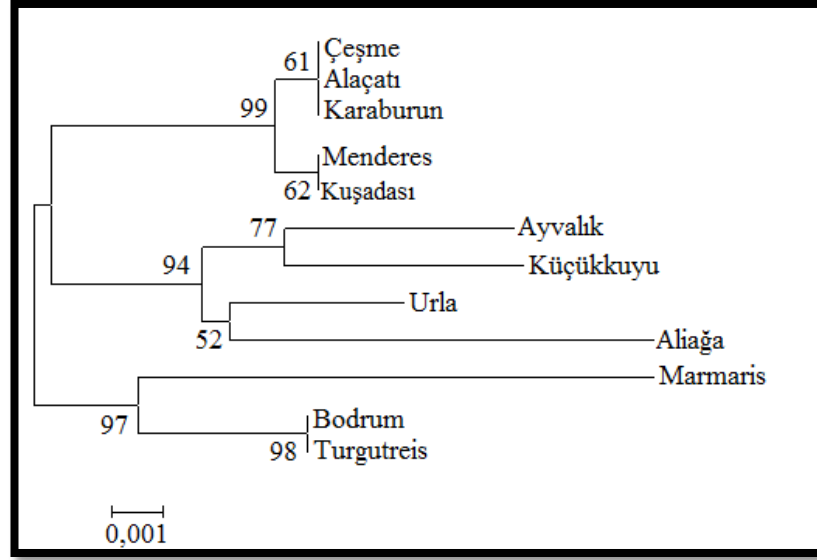
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0,003	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,002
2	0,013		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,001	0,004	0,004	0,004	0,003
3	0,022	0,022		0,000	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,001	0,004	0,004
4	0,022	0,022	0,000		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,001	0,004	0,004
5	0,018	0,021	0,022	0,022		0,000	0,000	0,004	0,002	0,004	0,003	0,003
6	0,018	0,021	0,022	0,022	0,000		0,000	0,004	0,002	0,004	0,003	0,003
7	0,018	0,021	0,022	0,022	0,000	0,000		0,004	0,002	0,004	0,003	0,003
8	0,014	0,002	0,023	0,023	0,022	0,022	0,022		0,004	0,004	0,004	0,003
9	0,018	0,020	0,019	0,019	0,010	0,010	0,010	0,021		0,004	0,001	0,003
10	0,024	0,024	0,001	0,001	0,024	0,024	0,024	0,025	0,021		0,004	0,004
11	0,019	0,021	0,020	0,020	0,011	0,011	0,011	0,022	0,001	0,022		0,003
12	0,005	0,010	0,019	0,019	0,014	0,014	0,014	0,011	0,015	0,021	0,016	

İstasyonlar arası en yüksek ve en düşük genetik uzaklık değerleri koyu olarak işaretlenmiştir. Standart hata değerleri kırmızı olarak gösterilmiştir. 1: Ayvalık, 2: Küçükkuyu, 3: Urla, 4: Aliağa, 5: Çeşme, 6: Alaçatı, 7: Karaburun, 8: Menderes, 9: Kuşadası, 10: Bodrum, 11: Turgutreis, 12: Marmaris

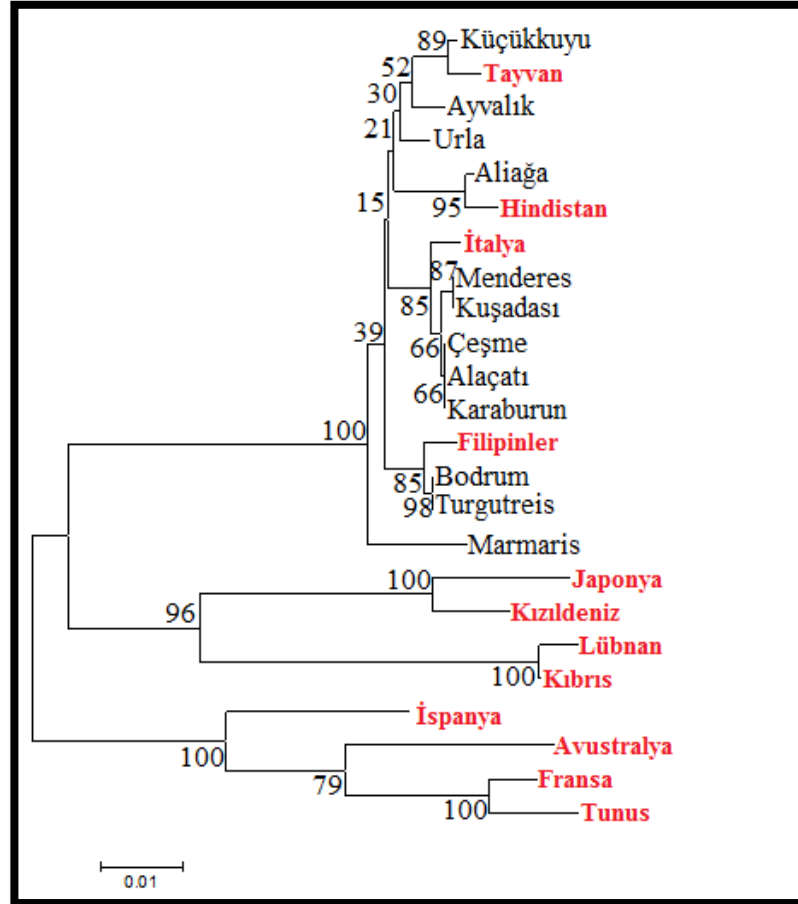
4.2. Evrimsel İlişki Analizleri

4.2.1 Filogenetik ağaç çizimleri

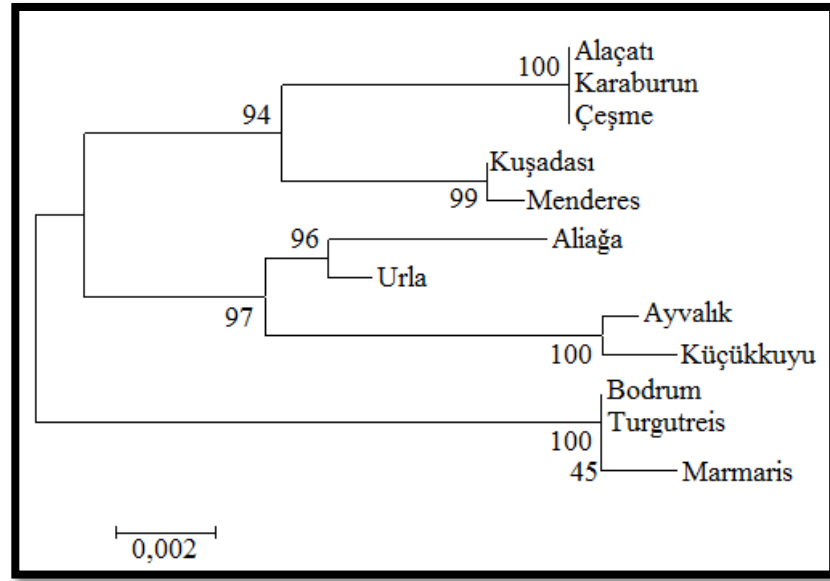
Neighbor Joining (NJ) yöntemi ile ITS için K2P ve rbcL için T92+G modelleri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar şekil 4.1-4.3'te verilmiştir. Ayrıca örnekleme istasyonlarından elde edilen örneklerin dünyada *C. racemosa* türü ile ilgili yapılan tüm çalışmalarla olan ilişkisini gösteren filogenetik ağaç çizimleri NJ yöntemi kullanılarak ITS ve rbcL için sırasıyla K2P+G ve TN93 modelleri kullanılarak yapılmıştır. Ağaçlar şekil 4.2-4.4'te verilmiştir.



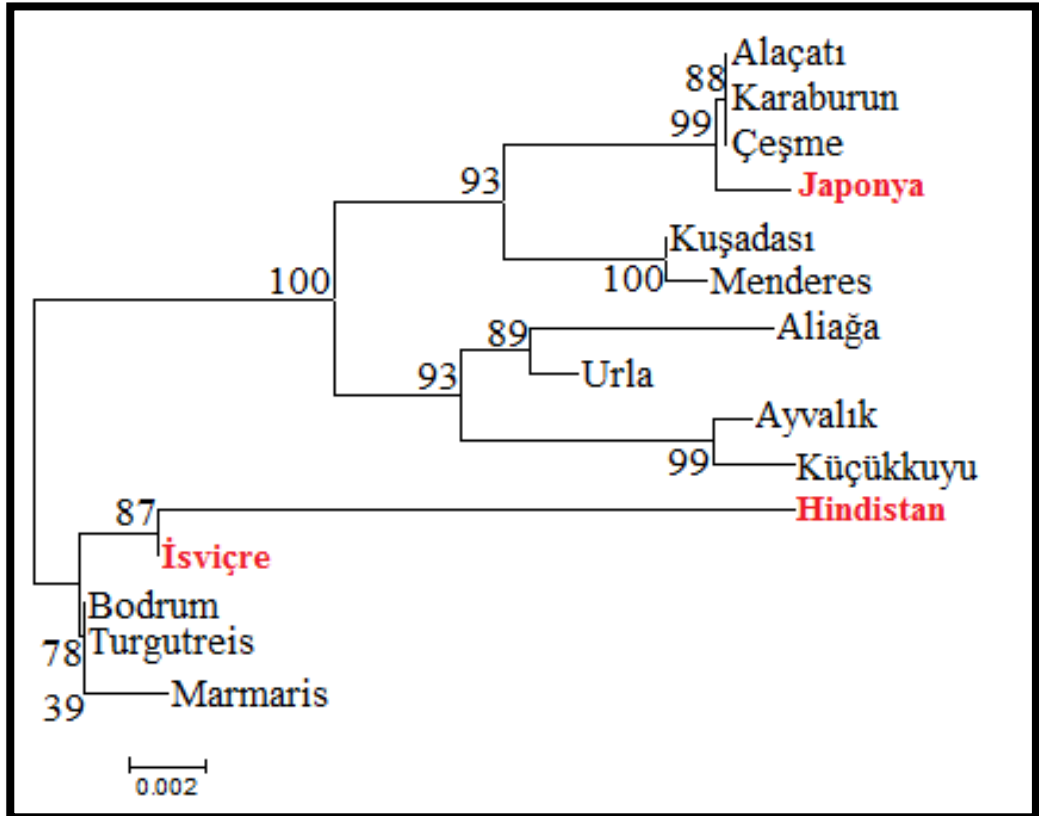
Şekil 4.1 ITS lokusu için NJ yöntemi ile K2P modeli kullanılarak çizilen filogenetik ağaç



Şekil 4.2 ITS lokusuna için NJ yöntemi kullanılarak K2P+G modeli kullanılarak dünyada yapılan diğer çalışmalar ve örnekleme istasyonlarını birlikte gösteren filogenetik ağaç



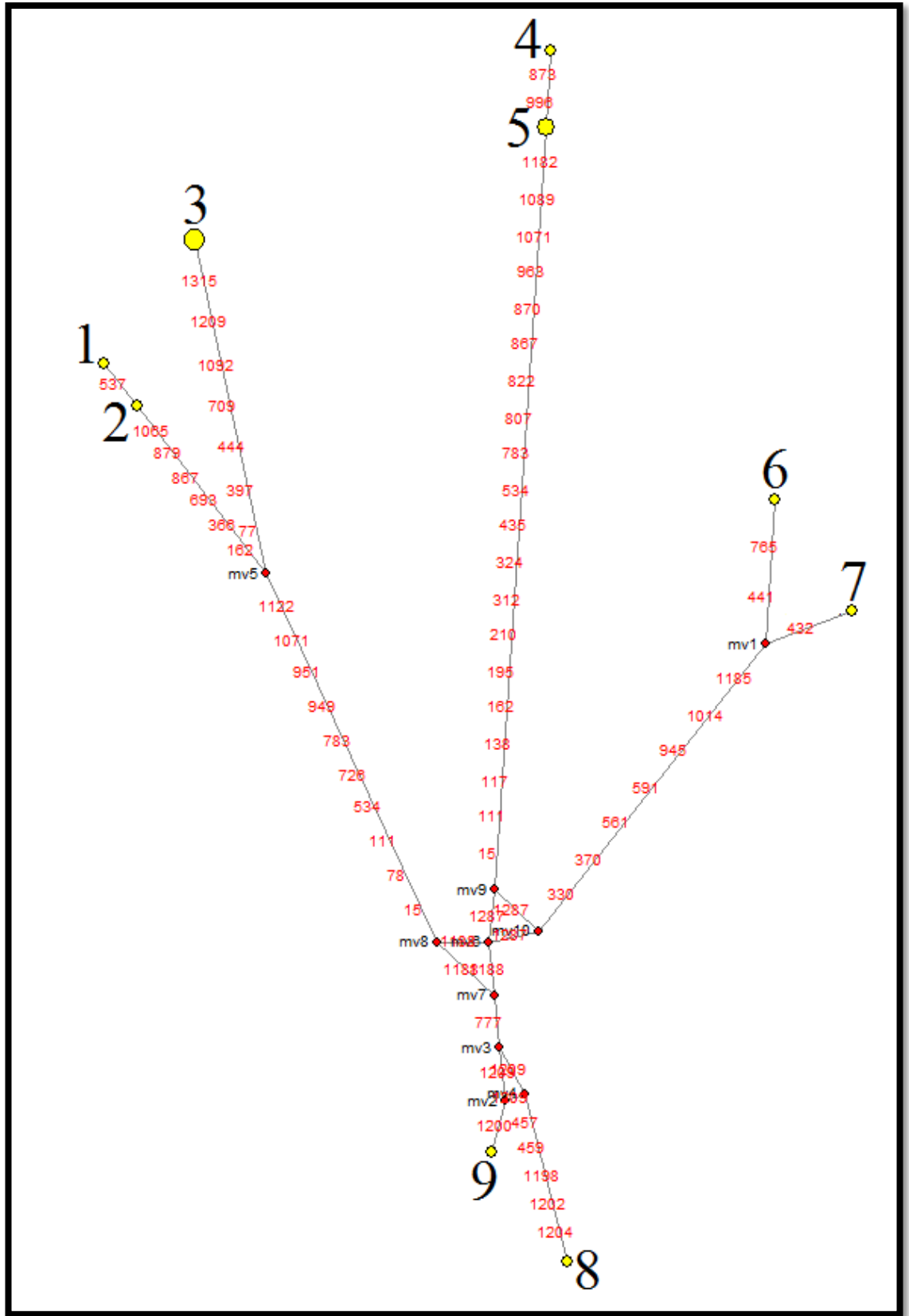
Şekil 4.3 rbcL lokusu için NJ yöntemi ile T92+G modeli kullanılarak çizilen filogenetik ağaç



Şekil 4.4 rbcL lokusuna için NJ yöntemi kullanılarak TN93 modeli kullanılarak dünyada yapılan diğer çalışmalar ve örnekleme istasyonlarını birlikte gösteren filogenetik ağaç

4.2.2 Network çizimleri

İstasyonlardan elde edilen DNA dizilerinin mutasyonel farklılık ve filocoğrafik dağılımlarının tespit edilmesi için Network programı kullanılarak çizimleri yapılmıştır. ITS ve rbcL lokuslarına ait network çizimleri şekil 4.3-4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.6 rbcL lokusuna ait network çizimi

*Numaralara denk gelen istasyon isimleri; 1: Menderes, 2: Kuşadası, 3: Çeşme, Alaçatı ve Karaburun, 4: Marmaris, 5: Bodrum ve Turgutreis, 6: Küçükkuşu, 7: Ayvalık, 8: Aliğa, 9: Urla

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan analizler sonucunda nükleotid kompozisyonunda elde edilen verilere bakıldığında ITS bölgesi için ortalama G+C değeri %46,8 ve ortalama A+T değeri %53,2, rbcL bölgesi için ortalama G+C değeri %37,8 ve ortalama A+T değeri %62,2 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin sebebi, çoğaltılan gen bölgelerinin ait olduğu genom ile ilişkilendirilebilir. Nükleer genom ait ITS geninden çoğaltılan bölgenin %A-T ve %G-C değerleri beklendiği gibi birbirine yakın olarak hesaplanırken, bitkilerde A-T ağırlıklı bir yapıya sahip olduğu bilinen kloroplast DNA'sından çoğaltılan rbcL geninde %A-T oranı belirgin bir baskınlık göstermiştir.

Yapılan nükleotid çifti frekansı analizi sonucunda ITS bölgesi için transisyon oranı 10,00, transversiyon oranı ise 5,00 bulunmuş ve R değeri (transisyonel çiftler/transversiyonel çiftler) ise 2,02 olarak bulunmuştur. R değerinin 2,02 olarak verilmesinin sebebi transisyon ve transversiyon değerlerinin ortalama olarak gösterilmesidir. ITS bölgesine ait eş çiftler değeri ise 1212,00 olarak hesaplanmıştır. ITS bölgesine ait kodon değerleri verilmemiştir. Bunun nedeni bu gen bölgesi protein kodlamayan bir gen bölgesidir. rbcL bölgesi için transisyon oranı 15,00, transversiyon oranı ise 7,00 bulunmuş ve R değeri ise 2,27 olarak bulunmuştur. R değerinin 2,27 olarak verilmesinin sebebi transisyon ve transversiyon değerlerinin ortalama olarak gösterilmesidir. rbcL bölgesine ait 1., 2., ve 3. kodonlara ait nükleotid çifti hesaplamaları yapılmıştır. 1. kodona baktığımızda transisyon oranı 1,00, transversiyon oranı ise 3,45 ve R değeri ise 93,00 olarak bulunmuştur. 1. kodona ait ortalama nükleotid çifti frekansı ise 445,00 olarak hesaplanmıştır. 2. kodonda transisyon oranı 0,00, transversiyon oranı ise 2,45 ve R değeri ise 117,00 olarak bulunmuştur. 2. kodona ait ortalama nükleotid çifti frekansı ise 447,00 olarak hesaplanmıştır. 3. kodon da ise transisyon oranı 6,00, transversiyon oranı ise 2,25 ve R değeri ise 239,00 olarak bulunmuştur. 3. kodona ait ortalama nükleotid çifti frekansı ise 430,00 olarak hesaplanmıştır. rbcL bölgesine ait eş çiftler değeri ise 1. kodon için 2,00, 2. kodon için 0,00, 3. kodon için 13,00 ve ortalama 1322,00 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen DNA dizilerinde kodon kullanımına bakılmıştır. Ancak ITS bölgesi protein kodlamadığı için kodon kullanımı değerleri verilmemiştir. rbcL bölgesi kodon kullanımına bakıldığına UAA, UAG ve UGA stop kodonları değerlerinin sıfır olduğu görülmüştür. Bu değerler ışığında dizinin stop kodon içermemesi yapılan DNA dizi analizlerinin doğruluğunu ve istenilen bölgenin başarı ile çoğaltıldığını göstermektedir.

Verilerin stop kodon içermediği ortaya koyulduktan sonra analizlere devam edebilmek için en iyi nükleotid substitüsyon modeli hesaplanmıştır. Yapılan analiz sonucunda BIC, AICc ve InL değerleri göz önünde bulundurularak ITS için DNA barkodlama çalışmalarında önerilen K2P modelinin en iyi nükleotid substitüsyon modeli olduğu belirlenmiştir. En düşük BIC değerli modellerin en iyi substitüsyon yapısını belirlediği belirtildiği için ITS bölgesinde en düşük BIC değeri 4447,32 olan model seçilmiştir. Substitüsyon modeline ait AICc değeri 4280,26 ve InL -2118,10 olarak hesaplanmıştır. rbcL bölgesinde ise en iyi substitüsyon modeli belirlenmesi için yapılan analiz sonucunda BIC, AICc ve InL değerleri hesaplanmış ve en düşük BIC değeri olan 4776,81 ile T92 modeli kabul edilmiştir. Analizler sonucunda bölgeler arasında ki evrimsel oranlarında tek düzelik olmadığından 5 oranlı kategoride farklı bir gama dağılımı (+G) kullanılarak gama dağılımlı model kullanılması önerilmiştir. Substitüsyon modeline ait AICc değeri 4592,37 ve InL -2272,15 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen veriler ışığında nükleotid substitüsyon matriksi analizi yapılmıştır. ITS bölgesinde substitüsyon oranı ve modeli Kimura 2-parameter modeline göre hesaplanmıştır. Transisyonel substitüsyon farklılıkları olan değerler 17,71 ve transversiyonel substitüsyonlar 3,65 olarak bulunmuştur. Bu değerleri değerlendirilirken R değerleri dikkate alınmalıdır. Kolaylık olması açısından R değeri 100 sayısına eşitlenmiş ve nükleotid frekansları A = %25.00, T/U = %25.00, C = %25.00 ve G = %25.00 şeklinde hesaplanmıştır. ML değerleri tahmini için ağaç topolojisi otomatik olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamaadaki Maksimum Likelihood giriş değeri -2115.621 olarak kabul edilmiştir. rbcL bölgesi için substitüsyon oranı ve modeli Tamura Nei (+G) modeline göre hesaplanmıştır. Gama dağılımı ayrımları bölgeler arasındaki evrimsel oran

farklılıklarında model olarak kullanılmıştır. Transisyonel substitüsyon farklılıkları olan değerler ve transversiyonel substitüsyonlar hesaplanmıştır. Bu değerleri değerlendirirken R değerleri dikkate alınmalıdır. Kolaylık olması açısından R değeri 100 sayısına eşitlenmiştir ve nükleotid frekansları A: %31,12, T: %31,12, C: %18,88 ve G: %18,88 şeklindedir. ML değerleri tahmini için ağaç topolojisi otomatik olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamadaki Maksimum Likelihood giriş değeri -2272.020 olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen DNA dizilerinin istasyonlar arası nükleotid çifti uzaklıkları ITS için K2P'a ve rbcL için T92+G'a göre hesaplanmıştır. ITS için istasyonlar arası bulunan en düşük genetik uzaklık 0,000 ve en yüksek genetik uzaklık ise 0,024 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler coğrafik konumları ile uyumlu bulunmuştur. rbcL için istasyonlar arası bulunan en düşük genetik uzaklık 0,000 ve en yüksek genetik uzaklık ise 0,024 olarak hesaplanmış ve coğrafik konumlar ile kısmen ilişkilendirilebilmiştir. Ancak her iki gen bölgesi karşılaştırıldığında 5,6 ve 7 nolu istasyonlar olan Çeşme, Alaçatı ve Karaburun değerlerinin en düşük genetik uzaklık değerleri olduğu tespit edilmiştir. Bu üç istasyonun coğrafik olarak da bir birine yakın olduğu ve bir yarım ada üzerinde olduğu için aralarında genetik uzaklık bulunmaması anlamlı bulunmuştur. Aynı istasyondan elde edilen türler arasında bir farklılık bulunmamasının ardında yatan neden olarak örneklerin tek bir genetik kaynaktan çoğalması gösterilebilir. Yapılan analizler doğrultusunda ortalama genetik uzaklık değeri ve standart hatası sırasıyla ITS için 0,012 ve 0,002, rbcL için 0,027 ve 0,002 olarak hesaplanmıştır.

ITS bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaçlar incelendiğinde istasyonlar önce Bodrum, Turgutreis ve Marmaris olarak %97 doğrulukla diğer istasyonlarda ayrılmış olduğu görülmüştür. Bu üç istasyonun diğer istasyonlarda ayrı bir dalla temsil edilmesi coğrafik olarak Ege Denizi'nin Akdeniz'le birleşme bölgesinde olduğu için anlamlı bulunmuştur. Birinci kolda bulunan bu üç istasyondan Bodrum ve Turgutreis istasyonları daha sonra Marmaris istasyonu ile %98 doğruluk oranı ile ayrılmaktadır. Başlangıçta Bodrum, Turgutreis, Marmaris olarak bir grup ve diğer istasyonlar olarak başka bir grup olarak ayrılan filogenetik ağacın ikinci koluna baktığımızda tekrar Ayvalık, Küçükkuyu,

Aliğa ve Urla'nın %94 doğrulukla bir grup olarak Çeşme, Alaçatı, Karaburun, Menderes ve Kuşadası'nın ise %99 doğrulukla başka bir grup oluşturarak iki kola ayrıldığını görülmüştür. %94 doğrulukla ayrılan Ayvalık, Küçükkuyu, Aliğa ve Urla grubuna baktığımızda Urla ve Aliğa istasyonları olarak bir grup, Ayvalık ve Küçükkuyu istasyonları olarak ikinci bir grup oluşturdukları belirlenmiştir. Urla ve Aliğa istasyonlarının %52, Ayvalık ve Küçükkuyu istasyonlarının ise %77 doğrulukla birbirlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. %99 doğrulukla ayrılan Çeşme, Alaçatı, Karaburun, Menderes ve Kuşadası'nın da 2 grup halinde birbirlerinde ayrıldıkları görülmüştür. %62 doğrulukla Menderes ve Kuşadası istasyonlarının diğer istasyonlardan ayrıldığını ve aralarında bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. %61 doğrulukla ayrılan Çeşme, Karaburun ve Alaçatı'nın ise yine farklılık olmayan bir grup olduğu belirlenmiş ve genetik uzaklık değerleri incelendiğinde bu grubun en düşük genetik uzaklık farklılığına sahip olduğu görülmüştür.

rbcL bölgesi temel alınarak çizilen filogenetik ağaca baktığımızda ise istasyonlar önce Bodrum, Turgutreis ve Marmaris olarak %100 doğrulukla diğer istasyonlarda ayrılmış olduğu görülmüştür. Bu üç istasyonun diğer istasyonlarda ayrı bir dalla temsil edilmesi coğrafik olarak Ege Denizi'nin Akdeniz'le birleşme bölgesinde olduğu için anlamlı bulunmuştur. Birinci kolda bulunan bu üç istasyondan Marmaris istasyonu daha sonra Bodrum ve Turgutreis istasyonlarından ile %45 doğruluk oranı ile ayrılmaktadır. Başlangıçta Bodrum, Turgutreis, Marmaris olarak bir grup ve diğer istasyonlar olarak başka bir grup olarak ayrılan filogenetik ağacın ikinci koluna baktığımızda tekrar Ayvalık, Küçükkuyu, Aliğa ve Urla'nın %97 doğrulukla bir grup olarak Çeşme, Alaçatı, Karaburun, Menderes ve Kuşadası'nın ise %94 doğrulukla başka bir grup oluşturarak iki kola ayrıldığını görülmüştür. %94 doğrulukla ayrılan Ayvalık, Küçükkuyu, Aliğa ve Urla grubuna baktığımızda Urla ve Aliğa istasyonları olarak bir grup, Ayvalık ve Küçükkuyu istasyonları olarak ikinci bir grup oluşturdukları belirlenmiştir. Urla ve Aliğa istasyonlarının %96, Ayvalık ve Küçükkuyu istasyonlarının ise %100 doğrulukla birbirlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. %94 doğrulukla ayrılan Çeşme, Alaçatı, Karaburun, Menderes ve Kuşadası'nın da 2 grup halinde birbirlerinde ayrıldıkları görülmüştür. %99 doğrulukla Menderes ve Kuşadası istasyonlarının diğer istasyonlardan

ayrıldığını ve kendi içlerinde de iki dala ayrıldıkları belirlenmiştir. %100 doğrulukla ayrılan Çeşme, Karaburun ve Alaçatı'nın ise yine farklılık olmayan bir grup olduğu belirlenmiş ve genetik uzaklık değerleri incelendiğinde bu grubun en düşük genetik uzaklık farklılığına sahip olduğu görülmüştür.

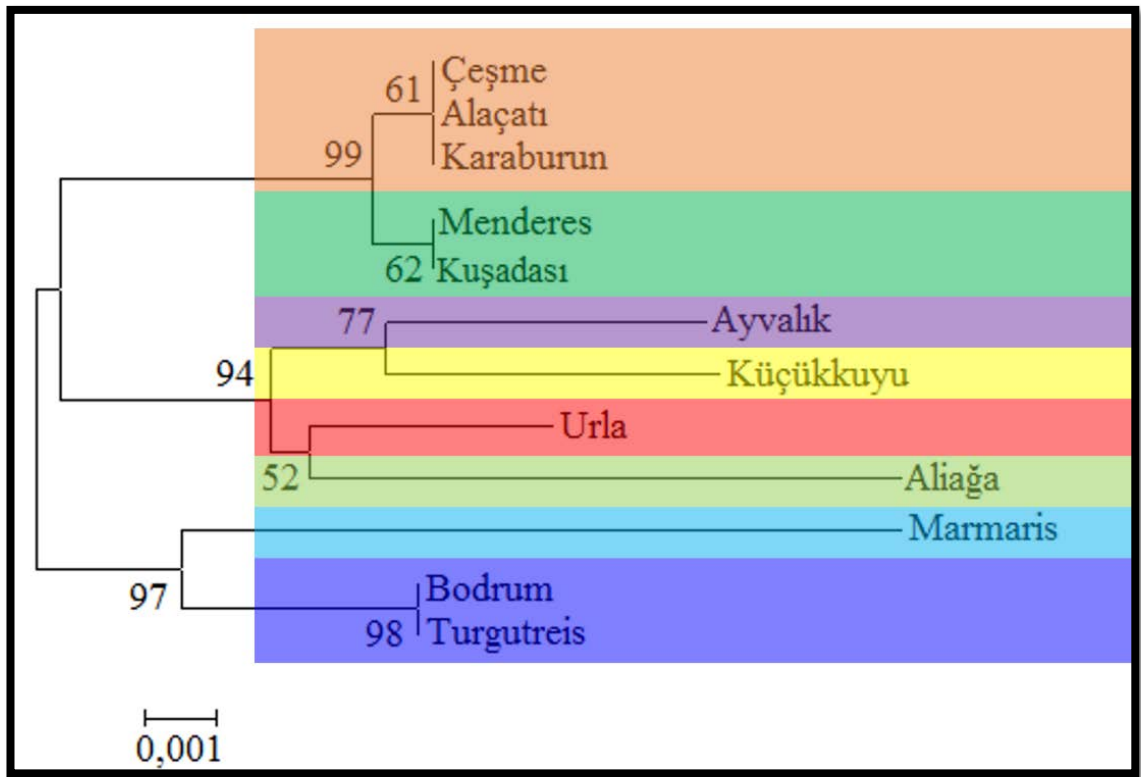
Durand vd. (2002) yaptıkları çalışmada, Akdeniz'de daha önce yapılan çalışmalarda *Caulerpa racemosa* var. *turbinata-uvifera* (C. Ag.) J. Ag., *Caulerpa racemosa* var. *lamourouxii* (Turner) W. V. Bosse ve istilacı varyete olarak morfolojik verilerle belirlenen *Caulerpa racemosa*'nın 3 varyetesinin bulunduğunu belirtmekteledir. Bu hipotezi doğrulamak ve *C. racemosa*'nın kökenini bulmak için kendi çalışmalarında coğrafik olarak izole olmuş türe ait 16 örnekten ITS1-ITS2 ve ribozomal DNA'dan (rDNA) 18S bölgesini çoğaltmışlardır. Ege Denizi'nde yaptığımız çalışmada ise ITS lokusuyla 8 (Şekil 5.1), rbcL lokusu ile 9 (Şekil 5.2) populasyon tespit edilmiştir. Ayrıca BLAST taraması ile yapılan karşılaştırmada bu farklı populasyonların ITS için %99-97 doğrulukla *C. racemosa* var. *macrophysa* (Sonder ex Kützing) W.R.Taylor ve *C. racemosa* var. *racemosa* varyetelerine ait olduklarını görürken, rbcL için %99 doğrulukla *C. racemosa* var. *occidentalis* (J.Agardh) Børgesen, %99 doğrulukla *C. racemosa* var. *lamourouxii* ve %99-100 doğrulukla *C. racemosa* var. *racemosa* varyetelerine ait olduklarını görmekteyiz. İki lokus arasındaki bu farklılığın nedeni yapılan BLAST taramalarında çalışma sonunda elde edilen DNA dizilerine en yakın sonuçların değerlendirilmesidir. ITS lokusu için rbcL lokusundan daha az varyetenin tespit edilmesi ve farklı sonuçların nedeni ise ITS bölgesine ait yapılan çalışmalarda ilgili varyetelere ait referans dizileri olmadığından kayıtlı en yakın varyete ile eşleşmesidir. Ege Denizi'nde yapılan bu çalışma sonucunda tespit edilen varyetelerin *C. racemosa* türünün yüksek polimorfizm eğilimi, adaptasyonu ya da yeni bir tropikal varyete ile hibritleşmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Fama vd. (2000) yaptıkları çalışmada, Akdeniz'den aldıkları on bir popülasyona ait yirmi birer bireyin yetmiş sekiz klondaki ITS lokusunu incelemişlerdir. Çalışma kapsamında elde ettikleri Akdeniz verilerinin hem kendi içinde hem de diğer örneklerle karşılaştırarak

analiz etmişlerdir. Tüm örnek testlerinde ITS1 lokusunun popülasyon içi polimorfizm oranının popülasyonlar arası polimorfizm oranından yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Popülasyonlarda polimorfizm için popülasyon içi çeşitliliği de kapsayan Parsimoni Analizi yaparak Panama, Kanarya Adaları ve Akdeniz'deki bireyler arası güçlü bir ayrım olduğunu ortaya koymuşlardır. Ancak Akdeniz'deki 6 popülasyonda bu ayrımın gerçekleşmediğini belirtmişlerdir. Akdeniz'de bulunan *C. racemosa*'ya ait çok fazla varyetenin olduğunu ve bunlarının birçoğunda popülasyon içi ayrımın gösterilemediğini belirten Fama vd. (2000), polimorfizm ve aseksüel çoğalmanın Akdeniz popülasyonlarındaki bu takson çeşitliliğinde büyük rolü olduğunu düşünmektedirler. Ayrıca bu ayrımın başka bir moleküler marker ile yapılabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise ITS lokusuna ek olarak rbcL lokusu ile yapılan analizler sonucu Ege Denizi'ndeki bazı *C. racemosa* popülasyonlarının ayrımında rbcL lokusunda çözünürlük derecesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada 12 istasyondan alınan 240 örneğe ait ITS ve rbcL lokuslarına ait verilerle birlikte ağaç çizimlerine baktığımızda ITS için 3, rbcL için 2 popülasyonda tür içi ayrımın gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Bu popülasyonlardaki ortak özelliğin birbirlerine çok yakın coğrafik konumlara ait olan örneklerden oluşması göz önüne alındığında, tür içi genetik uzaklığın tespit edilememesinin nedeni aynı genetik kökene sahip tek bir popülasyonun dağılımı olmaları düşünülmektedir.

Yeh ve Chen (2004) Tayvan'da yaptıkları çalışmada, *Caulerpa* türlerinin yüksek oranda morfolojik değişiklik gösterdiğini ve bu nedenle tanımlama yapmanın zorluğunu belirtmişlerdir. Çalışmada Tayvan'daki *Caulerpa* türlerinin ITS ve nükleer rDNA lokuslarını analiz ederek filogenetik ve sistematik ilişkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. *Caulerpa serrulata* (Forsskål) J.Agardh, *Caulerpa webbiana* Montagne, *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C.Agardh ve *Caulerpa racemosa* var. *microphysa* (Weber-van Bosse) Reinke, *Caulerpa racemosa* var. *macrophysa*, *Caulerpa racemosa* var. *peltata* J.V.Lamouroux, *Caulerpa racemosa* var. *laetevirens* (Montagne) Weber-van Bosse olmak üzere 7 takson üzerinde çalışmışlardır. 7 taksonun her birinden 11 bireyin nükleer rDNA'nın 872-1124 bp'lik bölgesini çoğaltmışlar ve birbirleri ile karşılaştırmışlardır. *C. racemosa* var. *peltata* ve *C. racemosa* var. *laetevirens* ile *C. racemosa* var. *microphysa*

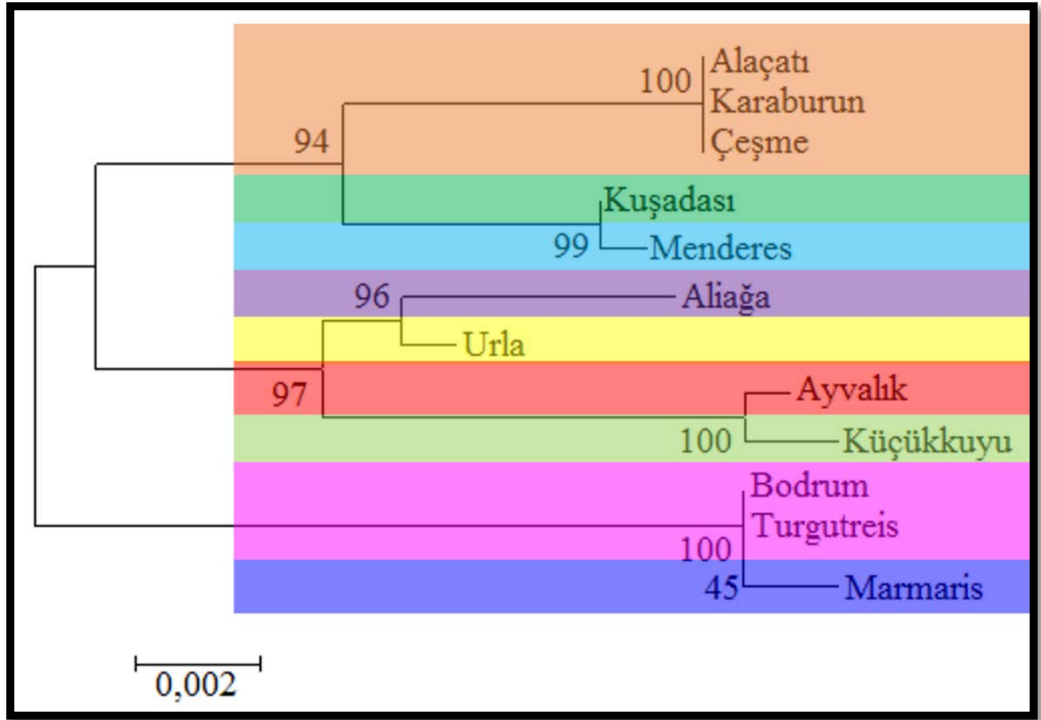
ve *C. racemosa* var. *macrophysa* arasında en düşük benzerliği tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda Yeh ve Chen (2004) nükleer rDNA ve ITS lokusunun *Caulerpa* türlerinin tanımlamada ve *C. racemosa* türünü diğer *Caulerpa* türlerinden ayırmada kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. Yeh ve Chen'in (2004) yaptığı çalışmaya ek olarak bu çalışmada kullanılan rbcL lokusunda ITS ile birlikte kullanımda *C. racemosa*'yı tür seviyesinde başarı ile tespit edebildiğini ve diğer coğrafik bölgelerdeki örneklerden rahatlıkla ayırabildiği tespit edilmiştir.



Şekil 5.1 ITS lokusuna ait 8 farklı popülasyonu gösteren filogenetik ağaç çizimi

Ege Denizi'ne ait verileri dünyadaki diğer *Caulerpa racemosa* ile ilgili çalışmalarla karşılaştırdığımızda rbcL lokusunda Alaçatı, Karaburun ve Çeşme istasyonlarına Japonya örneğinin en yakın olduğu, Bodrum, Turgutreis ve Marmaris istasyonlarından ise İsviçre ve Hindistan'ın ayrı birer dal olarak ayrıldığı tespit edilmiştir. ITS lokusunda ise Urla ve Ayvalık istasyonlarının Tayvan örneğine en yakın istasyon olan Küçükkuşu'dan ayrıldığını, Hindistan örneğine en yakın istasyon Aliğa'nın ayrı bir kol oluşturduğunu,

İtalya örneğine en yakın istasyonlar olan Menderes, Kuşadası, Çeşme, Alaçatı ve Karaburun'un ayrı bir dal oluşturduğunu, Filipinler örneğine en yakın olan istasyonlar Bodrum ve Turgutreis'in bir dal oluşturduğunu, Marmaris istasyonunun ise hiçbir ülkenin örneği ile birlikte ayrılmadığı, Japonya, Kızıldeniz, Lübnan ve Kıbrıs ayrı bir dal altında toplandığı ve İspanya, Avusturalya, Tunus ve Fransa'nın ayrı bir dal olarak ayrıldığını belirlenmiştir. rbcL lokusunun ITS lokusundan daha az ülke ile karşılaştırılmasının sebebi GenBANK, NCBI ve BOLD veri tabanlarında rbcL lokusu için *Caulerpa racemosa* ile eşleşen sadece 3 ülke olmasıdır.



Şekil 5.2 rbcL lokusuna ait 9 farklı popülasyonu gösteren filogenetik ağaç çizimi

Sonuç olarak, gerek ITS bölgesinin gerek de rbcL bölgesinin, daha doğru bir ifade ile DNA barkodlamanın, *C. racemosa*'nın tür seviyesinde tanımlamada başarıyla kullanılabilecek bölgeler olduğu elde edilen nükleotid dizilerinin, mevcut veri tabanlarında kayıtlı *C. racemosa* dizileri ile karşılaştırılması ile elde edilen ve $\geq 99\%$ seviyesindeki benzerlik oranları ile ortaya koyulmuştur.

Elde edilen sonuçlar, DNA barkodlama yönteminin *C. racemosa*'yı tür seviyesinde tanımlanmasında $\geq 99\%$ doğrulukla sonuç verdiğini, farklı *C. racemosa* populasyonlarının ayrımında ise yakın coğrafik konumlardan elde edilen örnekler arasındaki tür içi genetik farklılığı ortaya koymada yetersiz kaldığı görülmüştür. Ancak bu yetersizliğin, birbirine yakın populasyonların tek bir genetik kaynaktan çoğalan örnekler olması, yeni bulaşmış bir varyete ile hibritleşme, adaptasyon veya sınırlı bir genetik havuzdan yayılım göstermelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma, Türkiye denizlerinde gerçekleştirilen ilk bitki barkodlama çalışması olma özelliği taşıdığından, elde edilen veriler büyük önem taşımaktadır. İstilacı bir tür olma özelliği taşıyan *C. racemosa*'ya yönelik bundan sonra yürütülecek ve farklı lokasyonlardan elde edilen örnekler tanımlanırken ve genetik olarak karşılaştırılarak hangi kaynaktan olduğu belirlenmek istediğinde bu çalışmada elde edilen veriler referans özelliği taşıyacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, K.L. and Palmer, J.D. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 380-395.
- Álvarez, I. and Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417-434.
- Anonymous 2014a. CBOL, Consortium for the Barcode of Life. Web Sitesi: www.barcoding.si.edu, Erişim Tarihi: 2014.
- Anonymous 2014b, BOLD, The Barcode of Life Data Systems. Web Sitesi: www.boldsystems.org, Erişim Tarihi: 2014.
- Anonymous 2014c. Europe Aliens. 2014. Web Sitesi: <http://www.europe-aliens.org>, Erişim Tarihi: 20 Kasım 2014.
- Anonymous 2014d. Marine Species Identification. 2014. Web Sitesi: <http://species-identification.org>, Erişim Tarihi: 20 Kasım 2014.
- Anonymous 2014e. The Encyclopaedia of Life (EOL). 2014. Web Sitesi: <http://eol.org>, Erişim Tarihi: 20 Kasım 2014.
- Arca, M., Hinsinger, D.D., Cruaud, C., Tillier, A., Bousquet, J. and Frascaria-Lacoste, N. 2012. Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar *Fraxinus*. *PLoS One*, 7(3):e34089.
- Armenise, L., Simeone, M.C., Piredda, R. and Schirone, B. 2012. Validation of DNA barcoding as an efficient tool for taxon identification and detection of species diversity in Italian conifers. *European Journal of Forest Research*, 131, 1337-1353.
- Baker, D.A., Stevenson, D.W. and Little, D.P. 2012. DNA barcode identification of black cohosh herbal dietary supplements. *Journal of AOAC International*, 95: 1023–1034.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. and Donoghue, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82: 247.
- Bax, N., Williamson, A., Agüero, M., Gonzalez, E. and Geeves, W. 2003. Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity. *Mar. Policy* 27, 313-323.
- Boudouresque, C.F. 1999. The Red Sea-Mediterranean link: Unwanted effects of canals. pp. 213-228. In: O.T. Svelund, P.J. Schei & Å. Viken (ed.) *Invasive Species and Biodiversity Management*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10, 295-304.

- Brennicke, A., Grohmann, L., Hiesel, R., Knoop, V. and Schuster W. 1993. The Mitochondrial Genome on ITS Way to the Nucleus: Different Stages of Gene Transfer in Higher Plants. *FEBS Letters*, 325, 140-145.
- Burgess, K.S., Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Husband, B.C., Newmaster, S.G., Percy, D.M., Hajibabei, M. and Barrett, S.C.H. 2011. Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL+MatK DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution*, 2, 333-340.
- Ceccherelli, G. and Piazzini, L. 2005. Exploring the success of manual eradication of *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Caulerpales, Chlorophyta): the effect of habitat. *Cryptogamie, Algologie*, 26 (3), 319–328.
- Chase M.W. et al. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80; 528-580.
- Chase M.W., Cowan R.S., Hollingsworth P.M., Berg C.V.D., Madrinán S., Petersen G., Seberg O., Jørgensen T., Cameron K. M., Corne M., Pedersen N., Hedderson T. A. J., Conrad F., Salazar G. A., Richardson J. E., Halligsworth M. L., Barraclough T. G., Kelly L. and Wilkinson M. 2007. A Proposal for a Standardised Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon*, 56 (2), 295-299.
- Chase, M.W. and Fay, M.F. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Science*, 325: 682–683.
- Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N. and Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1889-1895.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y. and Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species, *PLoS ONE*, 5(1), e8613.
- Cirik, Ş. ve Ünlüoğlu, A. 2000. Yabancı ve yayılımcı nitelikteki bazı deniz bitkilerinin Akdeniz’de yayılımı. IV. Su Ürünleri Sempozyumu, 28-30 Haziran, Atatürk Üniversitesi, Bildiri özetleri kitabı, 813-824, Erzurum, Türkiye.
- Coppejans, E. and Prud’homme van Reine, W.F. 1992. Seaweeds of the Snellius-II Expedition (E. Indonesia): the genus *Caulerpa* (Chlorophyta-Caulerpales). *Bull. Séanc. Acad. Sci. Outre-Mer*, 37: 667-712.
- Cullings, K. and Vogler, D.R. 1998. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular ecology*, 7: 919-923.
- Dalton, D.L. and Kotze, A. 2011. DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. *Forensic Science International*, 207: e51-54.

- De Groot, G. A., During, H. J., Maas, J. W., Schneider, H., Vogel, J.C. and Erkens, R. H. J. 2011. Use of *rbcL* and *trnL-F* as a Two-Locus DNA Barcode for Identification of NW-European Ferns: An Ecological Perspective. *PLoS ONE*, 6, e16371.
- De Mattia, F., Bruni, I., Galimberti, A., Cattaneo, F., Casiraghi, M. and Labra, M. 2011. A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of Lamiaceae. *Food Research International*, 44, 693-702.
- De Vere, N., Rich, T.C.G., Ford, C.R., Trinder, S.A., Long, C., Moore, C.W., Satterthwaite, D., Davies, H., Allainguillaume, J., Ronca, S., Tatarinova, T., Garbett, H., Walker, K. and Wilkinson, M.J. 2012. DNA Barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PLoS ONE*, 7, e37945.
- Doebley, J. F., Stec, A., Wendel, J. and Edwards, M. 1990. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: implications for the origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 9888-9892.
- Donoghue, M.J., Olmstead, R.G., Smith, J. F. and Palmer, J.D. 1992. Phylogenetic relationships of Dipsacales based on *rbcL* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79, 333-345.
- Du, Z.Y., Yang, C.F. and Chen, J.M. 2010. Identification of hybrids in broad-leaved *Potamogeton* species (Potamogetonaceae) in China using nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 287, 57–63.
- Durand, C., Manuel, M., Boudouresque, C.F., Meinesz, A., Verlaque, M. and Le Parco, Y., 2002. Molecular data suggest a hybrid origin for the invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. *Journal of Evolutionary Biology* 15, 122-133.
- Durve, C., Manuel, M., Boudouresque, C.F., Meinesz, A., Verlaque, M. and Le Parco, Y. 2002. Molecular data suggest a hybrid origin for the invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. *J. Evol. Biol.*, 15: 122-133.
- Edwards, D., Horn, A., Taylor, D., Savolainen, V. and Hawkins, J.A. 2008. DNA Barcoding of a Large Genus *Aspalathus* L. *Taxon*, 57(4), 1317-1312.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Fama, P., Olsen, J., Stam, W. and Procaccini, G. 2000. High levels of intra- and inter individual polymorphism in the rDNA ITS1 of *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 35:4, 349-356
- Fama, P., Wysor, B., Kooistra, W.H.C.F. and Zuccarello, G.C. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *J Phycol*, 38, 1040-1050.
- Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husbve, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M. and Barrett, S.C.H. 2008. Multiple

multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. PLoS ONE, 3, e2802.

- Felsenstein, J. 1993. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle.
- Ferri, G., Al, M., Corradini, B., Angot, A. and Beduschi, G. 2008. Land Plant Identification in Forensic Botany: Multigene Barcoding Approach. Forensic. Sci. Int. Gene. Suppl., 1 (1): 593-595.
- Freeman, S. ve Herron, J.C. 1999. Evrimsel Analiz. Çıplak, B., Başbüyük, H. H., Karaytuğ, S., Gündüz, İ. (eds), 708 s, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Fu, Y.M., Jiang, W.M. and Fu, C.X. 2011. Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques. Journal of Systematics and Evolution, 49, 237-245.
- Galil, B.S. 2000. A sea under siege-alien species in the Mediterranean. Biol. Inv., 2: 177-186.
- Gartner, G. 2005. The invasive green alga *Caulerpa racemosa* (Caulerpales: Ulvophyceae) on the coast of Kalimnos (Suouthern Sporades, Greece) with comments on taxonomy and distribution in the Mediterranean. Ber. Nat. Med. Verrein Innsburg, 92, 31-39.
- Gismondi, A., Rolfo, M.F., Leonardi, D., Rickards, O. and Canini, A. 2012. Identification of ancient *Olea europaea* L. and *Cornus mas* L. seeds by DNA barcoding. Comptes Rendus Biologies, 335: 472–479.
- Guiry, M.D. and Guiry, G.M. 2014. AlgaeBase version 4.2. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Web Sitesi: <http://www.algaebase.org>, Erişim Tarihi: 01 December 2014.
- Guo, X., Simmons, M.P., But, P.P.H., Shaw, P.C. and Wang, R.J. 2011. Application of DNA barcodes in *Hedyotis* L. (Spermacoceae, Rubiaceae). Journal of Systematics and Evolution, 49, 203-212.
- Gurevitch, J. and Padilla, D.K. 2004. Are invasive species a major cause of extinctions? Trends Ecol. Evol., 19, 470-474.
- Hajibabaei, M., deWaard, J.R., Ivanova, N.V., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Kirk, S.L., Mackie, P.M. and Hebert, P.D. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 360(1462), 1959-1967.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. and Hebert, P.D.N. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 968-971.
- Hajibabaei, M., Singer, G., Clare, E. and Hebert, P. 2007b. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. BMC Biology, 5, 24.

- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. and Hickey, D.A. 2007a. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4), 167-72.
- Hamel, G. 1926. Quelques algues rares ou nouvelles pour la flore mé'diterrane'enne. *Bull. Mus. Nation. Hist. Nat.*, 32, 420.
- Han, J.P., Shi, L.C., Chen, X.C. and Lin, Y.L. 2012. Comparison of four DNA barcodes in identifying certain medicinal plants of Lamiaceae. *Journal of Systematics and Evolution*, 50, 227-234.
- Hausmann, A., Haszprunar, G. and Hebert, P.D.N. 2011. DNA Barcoding the geometrid Fauna of Bavaria (Lepidoptera): Successes, surprises, and questions. *PLoS ONE*, 6, e17134.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S. and deWaard, J.R. 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. and Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol*, 2, e312.
- Hellmann, J., Byers, J.E., Bierwagen, B.G. and Dukes, J.S. 2007. Five potential consequences of climatic change for invasive species. *Conservation Biology*, 22 (3), 534-543.
- Hillis, D.M., Huelsenbeck, J.P. and Cunningham, C.W. 1994. Application ve accuracy of of molecular phylogenies. *Science*, 264, 671-677.
- Hollingsworth, P.M. 2011. Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 19451-19452.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.V., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Fazekas, A.J., Graham, S.W., James, K.E., Kim, K.J., Kress, W.J., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S.C.H., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K.S., Cameron, K.M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J.J., Conrad, F., Devey, D.S., Ford, C.S., Hedderson, T.A.J., Hollingsworth, M.L., Husband, B.C., Kelly, L.J., Kesanakurti, P.R., Kim, J.S., Kim, Y.D., Lahaye, R., Lee, H.L., Long, D.G., Madriñán, S., Maurind, O., Meusnier, I., Newmaster, S.G., Park, C.W., Percy, D.M., Petersen, G., Richardson, J.E., Salazar, G.A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M.J., Yij, D.K. and Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 12794-12797.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. and Little D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6, e19254.
- Huelsenbeck, J.P. and Hillis, D.M. 1993. Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Systematic Biology*, 42, 247-264.

- Huelsenbeck, J.P. and Rannala, B. 1997. Phylogenetic methods come of age: Testing hypotheses in an evolutionary context. *Science*, 276, 227-232.
- Jeanson, M.L., Labat, J.N. and Little, D.P. 2011. DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? *Annals of Botany*, 108, 1445-1451.
- Jousson, O., Pawlowski, J., Zaninetti, L., Meinesz, A. and Boudouresque, C.F. 1998. Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 172, 275-280.
- Kazi, M.A., Reddy, C.R.K. and Jha, B. 2013. Molecular Phylogeny and Barcoding of *Caulerpa* (Bryopsidales) Based on the tufA, rbcL, 18S rDNA and ITS r DNA Genes. *PlosOne*, 8 (12), e82438.
- Kesanakurti, P.R., Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Percy, D.M., Newmaster, S.G., Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Hajibabaei, M. and Husband, B.C. 2011. Spatial patterns of plant diversity below-ground as revealed by DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 20, 1289-1302.
- Keskin, E. 2007. Türkiye İhtiyofaunasındaki Mullidae Ailesindeki Türlerin Filogenetik Yakınlıklarının Morfolojik ve Genetik Farklarla Korelasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 93, Ankara.
- Keskin, E. 2013. Türkiye'deki Ekonomik Öneme Sahip Su Ürünlerinin DNA Barkodlarının Çıkarılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 336, Ankara.
- Keskin, E. ve Atar, H. H. 2013. DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 6(2): 01-08 (ULAKBİM).
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Klein, J. and Verlaque, M. 2008. *Caulerpa racemosa* effect on macrophyte assemblages of dead Posidonia beds. In: United Nations Environment Programme (Ed.), *Proceedings of the 3rd Mediterranean Symposium on Marine Vegetation*, Marseille, France, 27–29 March 2007. Regional Activity Centre for Specially Protected Areas, Tunis, Tunisia, pp. 78–2.
- Klug, W. S. and Cummings, R. M. 2003. Genetik. Öner, C. (eds.), *Palme Yayıncılık*, 816, Ankara.
- Koolman, J. and Roehm, K.H. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. Second Edition. Thieme, 476, New York.
- Kress W.J. and Erickson D.L. 2007. A Two Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding's rbcL Genes Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *Public Library of Science Biology*, 2: e508.

- Kress, W.J., Erickson, D.L., Jones, F.A., Swenson, N.G., Perez, R., Sanjur, O. and Bermingham, E. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 18621-18626.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8369.
- Lahaye, R., Bank M.V.D., Bogarin, D., Warner, J., Pupilin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Baraclough, T.G. and Savolainen, V. 2008a DNA Barcoding of the Floras of Biodiversity Hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (8), 2934-2928.
- Lahaye, R., Bank, M.V.D., Maurin, O., Duthoit, S. and Savolainen, V. 2008b. A DNA Barcode for the Flora of the Kruger National Park (South Africa). *South African Journal of Botany*, 370-371.
- Li, D.Z., Gao, L.M., Li, H.T., Wang, H., Ge, X.J., Liu, J.Q., Chen, Z.D., Zhou, S.L., Chen, S.L., Yang, J.B., Fu, C.X., Zeng, C.X., Yan, H.F., Zhu, Y.J., Sun, Y.S., Chen, S.Y., Zhao, L., Wang, K., Yang, T. and Duan, G.W. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 19641-19646.
- Li, M., Wong, K.L., Chan, W.H., Li, J.X., But, P.P.H., Cao, H. and Shaw, P.C. 2012. Establishment of DNA barcodes for the identification of the botanical sources of the Chinese “cooling” beverage. *Food Control*, 25, 758-766.
- Li, Y., GAO, L. M., Poudel, R. C., Li, D. Z. and Forrest, A. 2011. High universality of matK primers for barcoding gymnosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49, 169-175.
- Lia, D.Z. et al. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 49, 641-646.
- Liang, H. 1997. The Phylogenetic Reconstruction of the Grass Family (Poaceae) Using matK Gene Sequences. PhD Thesis, The Faculty of the Virginia Polytechnic Institute ve State University, USA.
- Litter, D.S. and Litter, M.M. 2000. Caribbean Reef Plants. An Identification Guide to the Reef Plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico. OffShore Graphics Inc publ, Washington, DC, 542 pp.
- Liu, C., Liang, D., Gao, T., Pang, X., Song, J., Yao, H., Han, J., Liu, Z., Guan, X., Jiang, K., Li, H. and Chen, S. 2011. PTIGS-IdIt, a system for species identification by DNA sequences of the psbA-trnH intergenic spacer region. *BMC Bioinformatics*, 12, S4.

- Liu, J., Möller, M., Gao, L. M., Zhang, D.Q. and Li, D.Z. 2011. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus L.*, Taxaceae) and the discovery of cryptic species. *Molecular Ecology Resources*, 11, 89-100.
- Liu, Y., Yan, H.F., Cao, T. and Ge, X.J. 2010. Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *Journal of Systematics and Evolution*, 48, 36-46.
- Lou, M. and Brian Golding, G. 2010. Assigning sequences to species in the absence of large interspecific differences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 187-194.
- Lucas, C., Thangaradjou, T. and Papenbrock, J. 2012. Development of a DNA Barcoding System for Sea grasses: Successful but Not Simple. *PLoS ONE*, 7(1), e29987.
- Martin, W. and Herrmann, R.G. 1998. Gene Transfer from Organelles to the Nucleus: How Much, What Happens, and Why? *Journal of Plant Physiology*, 118, 9-17.
- Mater, S., Toğulga, M. ve Kaya, M. 1995. Lessepsian Balık Türlerinin Türkiye Denizleri'nde Dağılımı ve Ekonomik Önemi. II. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 453-462.
- Mayden, R.L. and Wiley, O. E. 1992. The Fundamentals of phylogenetic systematics. In R. L. Mayden, ed. *Systematics, Historical Ecology and North American Freshwater Fishes*. Stanford, CA: Stanford University Press, 114-185, USA.
- Meyer, C.P. and Paulay, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, 3, e422.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J. and Ragupathy, S. 2006. DNA Barcoding in Land Plants: Evaluation of *rbcL* in a Multigene Tiered Approach. *Canadian Journal of Botany*, 84, 335-341.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, A.D. and Jarovec, J. 2007. Testing Candidate Plant Barcode Regions in Myristicaceae. *Molecular Ecology Notes*, 8 (3), 480-490.
- Nizamuddin, M. 1991. *The Green Marine Algae of Libya*. Elga Publ., Bern.
- Nuber, N., Gornik, O., Lauc, G., Bauer, N., Zuljevic, A., Papes, D. and Zoldos, V. 2007. Genetic evidence for the identity of *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (Caulerpales, Chlorophyta) in the Adriatic Sea. *European Journal of Phycology* 42 (1), 113-120.
- Ohba, H., Nashima, H. and Enomoto, S. 1992. Culture studies on *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyceae). III. Reproduction, development and morphological variation of laboratory-cultured *C. racemosa* var. *peltata*. *Bot. Mag.*, 105: 589-600.
- Por, F.D. 1978. Lessepsian Migration. The Influx of Red Sea Biota into the Mediterranean by way of the Suez Canal. *Ecological Studies* 23, Springer Verlag, 228 pp., Berlin.
- Race, H.L., Herrmann, R.G. and Martin, W. 1999. Why Have Organelles Retained Genomes? *Trends in Genetics*, 15, 364-370.

- Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355-364.
- Ravi, V., Khurana, J. P., Tyagi, A.K. and Khurana, P. 2008. An Uptade on Chloroplast Genomes. *Plant Systematics ve Evolution*, 217, 101-122.
- Reist, J. 1985. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data. *Canadian Journal of Zoology*, 63, 1429-1439.
- Rubinoff, D., Cameron, S. and Will, K. 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 1-2.
- Ruitton, S., Verlaque, M., Aubin, G. and Boudouresque, C.F. 2006. Grazing on *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea by herbivorous fish and sea urchins. *Vie et Milieu*, 56 (1), 33-41.
- Sager, R. and Ishida, M.R. 1963. Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6(4), 725-730.
- Saitou, N. and Imanishi, T. 1989. Relative efficienciens of the Fictch-Margoliash, Maximum Parsinomy, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol*, 6, 514-525.
- SAPA. 2010. Barcodes to fight cycad smuggling. IOL news.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.W.M. and Spechtc, D. 2007. DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads, *PLoS ONE*, 2 (11), e1154.
- Saunders, G.W. and McDonald, B. 2010. DNA barcoding reveals multiple overlooked Australian species of the red algal order Rhodymeniales (Florideophyceae), with resurrection of *Halopeltis* J. Agardh and description of *Pseudohalopeltis* gen. nov., *Botany* 88: 639–667.
- Sauvage, T., Payri, C., Draisma, S.G.A., Prud'homme Van Reine, W.F., Verbruggen, H., Belton, G.S., Gurgel, C.F.D., Gabriel, D., Sherwood, A.R. and Fredericq, S. 2013. Molecular diversity of the *Caulerpa racemosa*–*Caulerpa peltata* complex (Caulerpaceae, Bryopsidales) in New Caledonia, with new Australasian records for *C. racemosa* var. *cylindracea*. *Phycologia*, 52, 6-13.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K. and Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1805-1811.
- Schneider, H. and Schuettpeitz, E. 2006. Identifiying Fern Gametophytes Using DNA Sequences. *Molecular Ecology Notes*, 6, 989-991.
- Selvaraj, D., Sarma, R.K. and Sathishkumar, R. 2008. Phylogenetic Analysis of Chloroplast matK Gene from Zingiberaceae for Plant DNA Barcoding. *Bioinformation*, 3 (1), 24-27.

- Sharp, P.M. and Li, W.H. 1986. An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *Journal of Molecular Evolution*, 24(1-2), 28-38.
- Shi, L.C., Zhang, J., Han, J.P., Song, J.Y., Yao, H., Zhu, Y.J., Li, J.C., Wang, Z.Z., Xiao, W., Lin, Y.L., Xie, C.X., Qian, Z.Z. and Chen, S.L. 2011. Testing the potential of proposed DNA barcodes for species identification of Zingiberaceae. *Journal of Systematics and Evolution*, 49, 261-266.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: Freeman, USA.
- Spies, P. 2013. A comparison of efficiency of DNA barcoding regions in a small and a large genus. PhD thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences (Department of Genetics) at The University of The Free State, 460.
- Stam, W.T., Olsen, J.L., Frisch Zaleski, S., Murray, S.N., Brown, K.R. and Walters, L.J., 2006. A forensic and phylogenetic survey of *Caulerpa* species (Caulerpaceae, Chlorophyta) from the Florida coast, local aquarium shops, and e-commerce: establishing a proactive baseline for early detection. *Journal of Phycology*, 42, 1113-1124.
- Starr, J.R., Naczi, R.F. and Chouinard, B.N. 2009. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Molecular Ecology Resources*, 9, 151-163.
- Stoeckle, M., Janzen, D., Hallwachs, W., Hanken, J. and Baker, J. 2003. *Taxonomy, DNA, and the Barcode of Life*. Draft Conference Report, Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
- Stoeckle, M., Waggoner, P. and Ausubel, J. 2004. Consortium for the Barcode of Life, Inaugural Meeting. Draft, Smithsonian Institution, Washington DC, USA.
- Sun, Y.L. and Hong, S.K. 2012. Phylogenetic relationship and evolution analysis of the peony *Paeonia* species using multi-locus deoxyribonucleic acid (DNA) barcodes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 5048-5058.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. and Hillis, D.M. 1996. *Phylogenetic Inference*. In D. M. Hillis, C. Moritz, B. K. Mable, eds. *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer, 407-514.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Taylor, W.R. 1960. *Marine algae of Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the Americas*. Univ. Michigan Press, 870 pp, USA.
- Theodoridis, S., Stefanaki, A., Tezcan, M., Aki, C., Kokkini, S. and Vlachonasios, K.E. 2012. DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from

- Chios Island (Greece) and the adjacent Çeşme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Molecular Ecology Resources*, 12, 620-633.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties ve weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. and Martin, W. 2004. Endosymbiotic Gene Transfer: Organelle Genomes Forge Eukaryotic Chromosomes. *Nature Reviews Genetics*, 5, 123-135.
- Tuvia, A. 1978. Imigrations of the fishes through the Suez Canal. *Fish. Bull. (Wash)* 76(1), 249-255.
- Vere, N., Rich, T.C.G., Ford, C.R., Trinder, S.A., Long, C., Moore, C.W., Satterthwaite, D., Davies, H., Allainguillaume, J., Ronca, S., Tatarinova, T., Garbett, H., Walker, K. and Wilkinson, M.J. 2012. DNA Barcoding the Native Flowering Plants ve Conifers of Wales. *PLoS ONE*, 7(6), e37945.
- Verlaque, M. 1994. Inventaire des plantes introduites en Me'diterrane'e: origines et re'percussions sur l'environnement et les activite' s humaines. *Oceanol. Acta*, 171, 1-23.
- Verlaque, M., Boudouresque, C.F., Meinesz, A. and Gravez, V. 2000. The *Caulerpa racemosa* complex (Caulerpales, Ulvophyceae) in the Mediterranean Sea. *Bot. Mar.*, 43: 49-68.
- Verlaque, M., Durve, C., Huisman, J.M., Boudouresque, C.F., Parco, Y.L. 2003. On the identity ve origin of the Mediterranean invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 38(4), 325-339.
- Vischi, M., Arzenton, F., De Paoli, E., Paselli, S., Tomat, E. and Olivieri, A.M. 2006. Identification of Wild Species of Sunflowers by a Specific Plastid DNA Sequence. *Helia*, 29 (45), 11-18.
- Von Crautlein, M., Korpelainen, H., Pietiläinen, M. and Rikkinen, J. 2011. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and Conservation*, 20, 373-389.
- Wakely, J. 1996. The excess of transitions among nucleotide substitutions: New methods of estimating transition bias underscore ITS significance. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 158-163.
- Wallace, L.J., Boilard, S.M.A.L., Eagle, S.H.C., Spall, J.L., Shokralla, S. and Hajibabaei, M. 2012. DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of Natural Health Products. *Food Research International*, 49, 446-452.
- Wang, W., Wu, Y., Yan, Y., Ermakova, M., Kerstetter, R. and Messing, J. 2010. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. *BMC Plant Biology*, 10, 205.

- Wang, Y., Wang, X., Tang, H., Tan, X., Ficklin, S.P., Feltus, F.A. and Paterson, A.H. 2011. Modes of gene duplication contribute differently to genetic novelty and redundancy, but show parallels across divergent Angiosperms. PLoS ONE, 6, e28150.
- Weber, E. 2003. Invasive Plant Species of the World. CABI Publishing, Oxon, 548 pp, USA.
- Weber-van Bosse, A. 1898. Monographie des Caulerpes. Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg, 15, 243-401.
- Womersley, H.B.S. 1984. The Marine Benthic Flora of Southern Australia. Part I. Government Printer, 329 pp, Adelaide, South Australia.
- Xiang, X.G.U.O., Hiu, H., Wang, W. and Jin, X.H.U.A. 2011. DNA barcoding of the recently evolved genus *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae): a test of DNA barcode candidates. Molecular Ecology Resources, 11, 1012-1021.
- Xue, C.Y. and Li, D.Z. 2011. Use of DNA barcode sensu lato to identify traditional Tibetan medicinal plant *Gentianopsis paludosa* (Gentianaceae). Journal of Systematics and Evolution, 49, 267-270.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P. and Chen, S. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. PloS one, 5, e13102.
- Yeh, W.J. and Chen, G.Y. 2004. Nuclear rDNA and internal transcribed spacer sequences clarify *Caulerpa racemosa* vars. from other *Caulerpa* species. Aquatic Botany, 80, 193-207.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra Mine ÜNAL

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 12. 05. 1986

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Gazi Anadolu Lisesi (2004)

Lisans: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü (2012)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı (Şubat 2012-Ocak 2015)

A. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

A1. Ünal E.M. and Keskin E. 2014. Determination of DNA Barcoding Success Using *rbcl*, *matK* and *trnH-psbA* Genes in Identification of *Stuckenia pectinata*. AQUA CYPRUS 1st International Symposium on Aquatic Sciences and Technology, 15-17 May, Girne, Northern Cyprus.

A2. Ünal, E.M. and Keskin, E. 2014. Using *rbcl* and *matK* as DNA Barcode Loci For Species Level Molecular Identification of Invasive *Myriophyllum Aquaticum*. FABA 2014: International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences. 25-27 September, Trabzon, Turkey.

A3. Keskin, E., Genç, E. and Ünal, E.M. 2013. Identification of *Anisakis simplex* Using DNA Barcoding. Aquaculture Europe 2012, Trondheim, Norway.

B. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

B1. Ünal, E.M. ve Keskin, E. 2014. *Ceratophyllum submersum* Türünün DNA Barkodlama Yöntemi ile Moleküler Olarak Tanımlanması. VI. Limnoloji Kongresi, 25-28 Ağustos, Bursa.

B2. Ünal, E. M. 2011. Mikroalg Biyodizelinin Yağ Rezervi: *Botryococcus braunii* ve Yağ Asidi Ekstraksiyonunda Transesterifikasyon Süreci. 16. Su Ürünleri Sempozyumu, 25-27 Ekim, Antalya.

B3. Ünal, E.M. ve Keskin, E. 2010. *Oncorhynchus*, *Salmo* ve *Salvelinus* Cinsine (Salmonidae) ait Bazı Türlerin Mitokondriyal ATPaz8 ve ATPaz6 Genlerinden Yararlanılarak Filogenetik İlişkilerinin Ortaya Koyulması. 2. Ulusal Alabalık Sempozyumu, 06-08 Temmuz, Karaman.

B4. Ünal, E.M. 2010. *Botryococcus braunii*: Biyodizel İçin Bir Mikroalg. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi 6. Öğrenci Kongresi, 15 Nisan, Ankara.

B5. Ünal, E.M. 2010. Biyodizel Üretiminde Neden Mikroalg? Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi 6. Öğrenci Kongresi, 15 Nisan, Ankara.

C. PROJELER

C1. Ege Denizi'ndeki *Caulerpa racemosa* Populasyonlarının Filogenetik İlişkilerinin DNA Barkodlama ile Belirlenmesi

Görevi: Araştırmacı

Destekleyen: Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
Koordinatörlüğü (BAP) 14H0447004 (2014-2015)

C2. European Information System for Alien Species

Görevi: Researcher-Scholarship

Destekleyen: COST TD1209 (2014-2017)

C3. İstilacı Tatlısu Balık Türlerinin Belirlenmesinde eDNA Metabarkodlama Tekniğinin Kullanılması: Yukarı Sakarya Havzası Modeli

Görevi: Araştırmacı-Bursiyer

Destekleyen: TUBİTAK 114R003 (2014-2017)