

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

**VAN GÖLÜ HAVZASI'NDA YETİŞEN ASPARAGUS CİNSİNE AİT TÜRLERİN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Serdar ALTINTAŞ**  
**(143106009)**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mine PAKYÜREK**  
**Ortak Danışman: Prof. Dr. Suat ŞENSOY**

**Temmuz-2016**  
**SIİRT**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Serdar ALTINTAŞ tarafından hazırlanan “**Van Havzasında Yetişen Asparagus L. Cinsine Ait Türlerin Morfolojik, Moleküler Karakterizasyonu ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 25/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oybirliği** ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Yrd. Doç. Dr. Çeknas ERDİNÇ

.....

#### Danışman

Yrd. Doç. Dr. Mine PAKYÜREK

.....

#### Üye

Yrd. Doç. Dr. Muhemet Zeki KARİPÇİN

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Koray ÖZRENK  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması SIÜBAP tarafından 2016SIÜFEB05 nolu proje ile desteklenmiştir.

## ÖN SÖZ

Ülkemiz zengin bitki çeşitliliğine sahip olmasına karşın malesef farklı bölgelerde tüketilen yabani bitkilerin tanımlanması, kullanım amaçları ve besin değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sınırlıdır. Van Gölü havzası'nda yetişen *Asparagus* cinsine ait bazı türlerde (*A.persicus*, *A.palaestinus*, *A.officinalis*) bu bitkiler arasında yer almaktadır. Özellikle 1960'lı yılların başından günümüze kadar kuşkonmaz üretimi ve tüketimi dünya genelinde artış göstermiştir. Bu durum kuşkonmaz türlerinin halkımızca bilinmesini ve tarımının yaygınlaştırılmasını daha da önemli bir hale getirmektedir. Ayrıca, bu türlerin doğal yetişme ortamları gözönünde bulundurulduğunda tarımsal amaçla kullanılmayan alanların tarıma kazandırılması gibi bir durum ortaya çıkmaktadır. Yapılan bu çalışma ile Van Havzası'ndaki kuşkonmaz populasyonlarının moleküler ve morfolojik seviyede irdelenmesi, ayrıca antioksidan aktivitelerinin tespit edilmesi ile elde edilen verilerin literatürdeki boşluğu doldurmaya yönelik bir adım olduğu düşünülmektedir.

Yüksek lisansın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mine PAKYÜREK'e ve ortak danışmanım Prof. Dr. Suat ŞENSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmaları sırasında bana her türlü desteği sağlayan Yrd. Doç. Dr Mehmet Emre EREZ ve Yrd. Doç. Dr Behçet İNAL hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında benden bilgi ve tecrübesini esirgemeyen arkadaşım Arş. Gör. Murat AKDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

2016SİÜFEB05 nolu proje ile gerekli malzemelere sahip olmanızı sağlayan Siirt Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Serdar ALTINTAŞ  
SİİRT-2016



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖN SÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xi
KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ.....	xiii
ÖZET .....	xv
ABSTRACT.....	xvii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Asparagaceae Familyasının Genel Özellikleri.....	2
1.2. <i>Asparagus</i> Cinsinin Morfolojik Özellikleri .....	3
1.2.1. <i>Asparagus</i> cinsinin sistematikteki yeri .....	3
1.2.2. <i>Asparagus</i> cinsinin ülkemizde ve dünya üzerindeki dağılımı .....	4
1.2.3 <i>Asparagus</i> cinsinin kullanılma alanları.....	4
1.3 Moleküler Sistematik.....	6
1.3.1. Moleküler sistematikte kullanılan yöntemlerden bazıları.....	7
1.3.2. Moleküler sistematikte kullanılan DNA çeşitleri .....	9
1.4 Serbest Radikaller .....	14
1.4.1 Serbest radikal çeşitleri.....	16
1.5 Serbest Radikallerin Metabolizmaya Etkileri .....	18
1.5.1 Serbest radikallerin lipidlere etkileri.....	18
1.5.2 Serbest radikallerin proteinlere etkileri.....	19
1.5.3 Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri .....	19
1.6 Antioksidanların Etki Mekanizması .....	20
1.7 Antioksidan Türleri.....	20
1.7.1 Enzim yapısındaki bazı antioksidanlar .....	20
1.7.2 Enzim yapısında olmayan bazı antioksidanlar.....	21
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>21</b>
2.1. Moleküler Sistematik.....	23
2.1.1. Antioksidan aktivite tayini.....	28
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>33</b>
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Bitki materyallerinin toplanması .....	33
3.2. Metot.....	36
3.2.1. Bitkilerden genomik dna izolasyonu .....	36



## **Sayfa**

3.2.2. PZR protokolü.....	37
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi .....	38
3.2.4. Dizi analizi.....	38
3.2.5. Filogenetik analiz.....	39
3.2.6. Bitki ekstraktlarının hazırlanması .....	39
3.2.7. Total fenolik madde konsantrasyonu .....	39
3.2.8. Total flavanoid madde konsantrasyonu .....	40
3.2.9. Demir (III) indirgeme kapasitesi(FRAP) tayini.....	40
3.2.10. Serbest radikal (DPPH) giderme aktivitesi .....	41
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>43</b>
4.1 Moleküler Çalışmalar .....	43
4.1.1 DNA ekstraksiyon çalışmaları .....	43
4.1.2 PZR sonuçları .....	43
4.1.3 Dizileme analizi .....	44
4.1.4 ITS bölgesine ait filogenetik ağaçlar ve analizi.....	45
4.1.5 <i>trnL</i> -F bölgesine ait filogenetik ağaçlar ve analizi .....	48
4.2 Antioksidan Aktivite Tayin Sonuçları .....	49
4.2.1 Total fenolik madde konsantrasyonu .....	49
4.2.2 Total flavonoid madde tayini .....	52
4.2.3. Demir (III) indirgeme kapasitesi (FRAP) tayini.....	54
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>61</b>
5.1. Sonuçlar .....	61
5.2. Öneriler .....	62
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>69</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>77</b>





## TABLULAR LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 3.1. CTAB Metoduyla yapılan DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar. ....	34
Tablo 3.2. PZR’de Kullanılan Primerler ve Özellikleri.....	35
Tablo 3.3. PZR’de Kullanılan Kimyasallar. ....	35
Tablo 3.4. 5 X TBE çözeltisinin hazırlanışı.....	35
Tablo 3.5. ITS Primeri İçin Kullanılan PZR Programı.....	37
Tablo 3.6. <i>trnL-F</i> Primeri İçin Kullanılan PZR Programı .....	38
Tablo 4.1. Fraksiyonlama sonucu elde edilen, <i>Asparagus L.</i> türlerine ait fenolik madde içerikleri (mg/gr).....	51
Tablo 4.2. Fraksiyonlama sonucu elde edilen, Kuşkonmaz türlerine ait flavanoid madde içerikleri (mg/g) .....	53
Tablo 4.3. <i>Asparagus</i> türlerinin FRAP aktiviteleri ( $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ ) .....	55
Tablo 4.4. <i>Asparagus</i> türlerinin DPPH aktiviteleri (mg/ml Trolox).....	57



## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1. <i>Asparagus</i> Türlerinin dağılımı (Kubota ve ark., 2012). .....	4
Şekil 1.2. ITS bölgesi (Sahare, 2013). .....	9
Şekil 1.3. Kloroplast Genomu (Logacheva ve ark., 2008). .....	10
Şekil 1.4. trnL-F Bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin şeması (Pirie ve ark., 2007). .....	12
Şekil 1.5. İnsan mitokondrial genomu (John ve ark., 2010). .....	13
Şekil 1.6. Reaktif oksijen türlerinin etkisi (Sarma ve ark., 2010). .....	16
Şekil 2.1. <i>Asparagus</i> türlerinin ITS bölgesine dayalı konsensüs parsimoni ağacı (Castro ve ark., 2013). .....	23
Şekil 2.2. EST-SSR Markırlar kullanılarak elde edilen <i>Asparagus L.</i> türlerine ait konsensüs dendogram (Castro ve ark., 2013). .....	24
Şekil 2.3. İzoenzim polimorfizmi kullanılarak elde edilen dendogram (Mukhopadhyay ve Ray., 2013). .....	24
Şekil 2.4. RAPD Markırlar kullanılarak elde edilen dendogram (Mukhopadhyay ve Ray., 2013). .....	25
Şekil 2.5. Asp1-T7 Markırına ait amplifikasyon Görüntüsü (Regalado ve ark., 2014)..	25
Şekil 2.6. Kuşkonmaz klonları F600 ve M256 için Amplifikasyon ürünü veren primerler (Caruso ve ark., 2008). .....	26
Şekil 2.7. 18 adet RAPD Decamer primerine dayalı 39 Kuşkonmaz genotipine ait UPGMA dendoğramı (Sarabi ve ark., 2010). .....	27
Şekil 4.1. <i>Asparagus</i> türlerine ait gDNA'larının agaroz jel görüntüsü .....	43
Şekil 4.2. Bazı <i>Asparagus</i> türlerinin ITS Bölgesine Ait Jel Görüntüsü .....	44
Şekil 4.3. Bazı <i>Asparagus</i> Türlerinin trnL-F Bölgesine Ait Jel Görüntüsü.....	44
Şekil 4.4. <i>Asparagus persicus</i> ITS bölgesine ait kromotoğram görüntüsünün bir kısmı	45
Şekil 4.5. ClustalW programında hizalanmış ITS dizilerinden bir kısmının görüntüsü.	45
Şekil 4.6. ITS bölgesinin Neighbour-Joining analizi sonucu oluşan ağacı. ....	46
Şekil 4.7. ITS bölgesinin Maximum Likelihood analizi sonucu oluşan ağacı (Filogenetik ağacın nodlarında yer alan rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir)..	47
Şekil 4.8. trnL-f bölgesinin Neighbour-Joining analizi sonucu oluşan ağacı .....	48
Şekil 4.9. trnL-f bölgesinin Maximum Likelihood analizi sonucu oluşan ağacı .....	49
Şekil 4.10. Gallik asit standart regresyon eğrisi .....	50
Şekil 4.11. <i>Asparagus</i> türlerinin fenolik madde içerikleri.....	52
Şekil 4.12. Rutin standart regresyon eğrisi .....	52
Şekil 4.13. <i>Asparagus</i> türlerinin flavanoid madde içerikleri .....	54
Şekil 4.14. Ferrosülfat standart regresyon eğrisi .....	54
Şekil 4.15. <i>Asparagus</i> türlerinin FRAP aktiviteleri ( $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ ) .....	56
Şekil 4.16. Trolox kalibrasyon eğrisi .....	57
Şekil 4.17. <i>Asparagus</i> türlerinin DPPH aktiviteleri (%).....	58



## KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
<b>AFLP</b>	: Amplified Fragment Length Polimorphism
<b>BME</b>	: $\beta$ -mercaptoethanol
<b>BSA</b>	: bovine serum albumin
<b>CAPS</b>	: Cleaved amplified polymorphic sequence
<b>CIS</b>	: Cloroform:İzomil alkol
<b>CTAB</b>	: cetyltrimethylammonium bromide
<b>DPPH</b>	: 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>FRAP</b>	: The ferric reducing ability of plasma
<b>ISSR</b>	: Inter Simple Sequence Repeats
<b>ITS</b>	: Internal Transcribed Spacers
<b>ML</b>	: Maximum likelihood
<b>NJ</b>	: Neighbour Joining
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PPVP</b>	: polivinilprolidon
<b>RAPD</b>	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SLS</b>	: Sodyum lauril sarkosinat
<b>SNP</b>	: Single Nucleotide Polymorphism
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TBE</b>	: Tris borate EDTA
<b>TE</b>	: Tris EDTA
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
<b><math>\mu</math>Mol</b>	: Mikromol
<b>EtOAc</b>	: Etil asetat
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>ppm</b>	: Milyonda bir
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mg</b>	: Miligram
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>° C</b>	: Santigrat
<b>M</b>	: Molar



## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS

## VAN HAVZASI'NDA YETİŞEN ASPARAGUS CİNSİNE AİT TÜRLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Serdar ALTINTAŞ

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mine PAKYÜREK

Ortak Danışman: Prof. Dr. Suat ŞENSOY

2016, 77 Sayfa

*Asparagus*; Asparagaceae familyasının bir üyesi olup eski dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerine dağılmış yaklaşık 300 tür içeren *Asparagus*, *Protasparagus* ve *Myrsiphyllum* olmak üzere üç alt cinsten oluşmaktadır. Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü yerlerden tropikal alanlara kadar farklı yerlerde yetiştirilen önemli bir sebzedir. *Asparagus officinalis* Türkiye'de özellikle Akdeniz'de, Doğu ve Batı Anadolu'da doğal olarak yetişmektedir. Kuşkonmaz ülkemizde yaygın olarak kullanılmamasına rağmen Doğu Anadolu'da kuşkonmaz gıda olarak tüketilmektedir. Bazı yerlerde yetiştiriciliğinin zor olması ve tadının farklı olması üretimini sınırlandırmıştır. Ancak çeşitli kullanım alanlarına sahip olması, pazarlama imkanının olması ve zengin besin kaynağı; çeşitli mineraller ve vitaminler yağ, şeker, nişasta ve karbonhidratlara sahip bulunması nedenleri ile Türkiye'de yetiştiriciliğinin yapılması ve halk tarafından bilinmesi önem arz etmektedir. Özellikle bitkinin tıbbi olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar önemlidir. Ayrıca geleneksel tıpta kullanılan birçok bitki oksidatif stresin neden olduğu çeşitli hastalıkların, viral ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkilidir.

Bitkinin tanımlanması, teşhis edilmesi ve sistematik açıdan değerlendirilmesinde morfolojik karakterlerin kullanılmasının yanı sıra, bitkilerin çevresel faktörlerden ve yetiştirme koşullarından etkilenmesi nedeni ile tanımlama ve teşhiste moleküler karakterlerin kullanılması gereklidir. Bu anlamda son zamanlarda bitkilerin genetik benzerlik ve farklılığını ortaya koyarak birbirinden ayıran moleküler sistematik çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada da, Doğu Anadolu Bölgesi'nde yer alan Van ilinde yetişen yabancı kuşkonmaz (*Asparagus*) türlerinin genetik benzerlik ve farklılıkları morfolojik ve moleküler düzeyde ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu amaçla nükleer ribozomal DNA'nın ITS bölgesi ve kloroplast DNA'sının *trnL-F* bölgesi kullanılmıştır, ayrıca antioksidan aktivitenin belirlenmesi için toplam fenolik, toplam flavonoid, DPPH serbest radikal giderme tayini ve FRAP yöntemleri kullanılmıştır. Moleküler çalışma sonucunda, ITS bölgesinin analizi sonucu oluşan ağaç, *A. palaestinus*'u tek bir grupta ve diğer türler olan *A. officinalis* ve *A. persicus*'u bir grupta toplamıştır. Diğer taraftan, *trnL-f* bölgesinin Neighbour-Joining analizi sonucu oluşan ağacı *A. persicus* (3) nolu örneği ve *A. officinalis*'i bir grupta toplarken diğer türler başka bir grupta toplanmıştır. Ayrıca *trnL-f* bölgesinin Maximum Likelihood analizi sonucu oluşan ağacı, *A. persicus* (1) nolu örneği tek bir gruba yerleştirirken, diğer türleri başka bir gruba yerleştirmiştir. Toplam fenolik açısından en yüksek aktivite *A. persicus* (2) aseton ekstraktında ölçülmüş (34,768 mg/g), en yüksek total flavonoid madde içeriği ise *A. persicus* (6) aseton ekstraktında bulunmuştur (0,474 mg/g). Demir (III) indirgeme kapasitesi (FRAP) tayini sonucu en yüksek değer *A. persicus* (3) aseton ekstraktında görülürken (0,061 µmol Fe(II)/g), DPPH serbest radikal giderme aktivitesinde en yüksek değer *A. persicus* (6) nolu örnekte ölçülmüştür (0,401 mg/ml Trolox).

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, *Asparagus*, ITS, Moleküler Sistematik.





## ABSTRACT

## MS THESIS

# MOLECULAR CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE SPECIES OF THE GENUS ASPARAGUS DISTRIBUTED IN VAN LAKE BASIN

Serdar ALTINTAŞ

The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University  
The Degree of Master of Science  
Department of Horticulture

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mine PAKYÜREK

Co-Supervisor: Prof. Dr. Suat ŞENSOY

2016, 77 Pages

*Asparagus*, a member of Asparagaceae family, comprises three subgenera (*Asparagus*, *Protasparagus* and *Myrsiphyllum*) including 300 species mainly distributed in arid and subarid regions of the old world. It is an important vegetable grown in broad diversity differing from Mediterranean climates to tropical regions. *Asparagus officinalis* naturally grows in the Mediterranean, Eastern and Western Anatolia regions of Turkey. Although it is not widely used in our country, *Asparagus* is consumed as food in the Eastern Anatolia. That its farming is so difficult in some areas and its different taste is different limit its cultivation. However, because of its having various uses, marketing opportunities, being a good nutritional source, containing various minerals and vitamins, fat, sugar, starch and carbohydrates, it is so important to cultivate in Turkey and to be known by the people. Especially, some studies over use of *asparagus* as a medical plant have great importance.

In addition, many plants used in traditional medicine for various diseases caused by oxidative stress is effective in treating viral and bacterial infections. In plant identification, diagnosis and systematic evaluation, due to influence from environmental factors and growth conditions of the plants, it is necessary use of molecular characteristics as well as in the use of morphological characteristics. In this sense, recent molecular systematic studies separating the plants from each other by revealing their genetic similarity and differences is important. In this study, genetic similarity and differences of the some wild *asparagus* species (*Asparagus*) growing in Van province located in the Eastern Anatolia region will be revealed in molecular and morphological level. In addition, it will be tried to determine antioxidant activity, DPPH percentage, phenolic content, total flavonoid content and FRAP by using various tissues. For this purpose, ITS region based on rDNA and *trnL-F* region based on cpDNA were used. Phylogenetic tree based on ITS region revealed two groups, the first group replaced *A. persicus* and *A. officinalis* in same group, while the second group replaced *A. palaestinus* in a separate group. On the other hand, molecular studies based on *trnL-F* region using Maximum Likelihood analysis revealed two main groups, *A. persicus* (1) was replaced in a separate group, whereas other species were replaced in same group. On the other hand, *trnL-F* region using Neighbour-Joining analysis revealed two main groups, the first group consisted of *A. persicus* (3) and *A. officinalis*, whereas other species were replaced in the second group. In term of total phenolics and flavonoids content, the highest phenolics content was measured for *A. persicus* (2) acetone extract (34,768 mg/g) and the highest flavonoids content was found in *A. persicus* (6) acetone extract (0,474 mg/g). In addition, the highest value for FRAP was quantified in *A. persicus* (3) acetone extract (0,061 µmol Fe(II)/g), while the highest DPPH percentage was measured in *A. persicus* (6) (0,401 mg/ml Trolox).

**Keywords:** Antioxidant, *Asparagus*, ITS, Molecular Systematic.

## 1. GİRİŞ

*Asparagus* cinsi; Asparagaceae familyasının bir üyesi olup, eski dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerine dağılmış yaklaşık 300 tür içeren *Asparagus*, *Protasparagus*, *Myrsiphyllum* olmak üzere üç alt cinsten oluşmaktadır (Dahlgren ve ark., 1985; Clifford ve Conran, 1987). Akdeniz ikliminden tropikal alanlara kadar farklı yerlerde yetiştirilen önemli bir sebzedir (Caruso ve ark., 2008). *Asparagus officinalis* L. Türkiye’de özellikle Akdeniz’de, Doğu ve Batı Anadolu’da doğal olarak yetişmektedir. Ülkemizde yaygın olarak kullanılmamasına rağmen, Doğu Anadolu’da kuşkonmaz gıda olarak tüketilmektedir. Bazı yerlerde yetiştiriciliğinin zor olması ve tadının farklı olması üretimini sınırlandırmıştır. Ancak çeşitli kullanım alanlarına sahip olması, pazarlama imkânının olması ve zengin besin kaynağı; çeşitli mineraller ve vitaminler yağ, şeker, nişasta ve karbonhidratlara sahip bulunması nedenleri ile Türkiye’de yetiştiriciliğinin yapılması ve halk tarafından bilinmesi önem arz etmektedir. Özellikle bitkinin tıbbi olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar önemlidir (Sancaktaroğlu ve ark., 2011). Ayrıca geleneksel tıpta kullanılan birçok bitki gibi oksidatif stresin neden olduğu çeşitli hastalıkların, viral ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkilidir.

Bitkinin tanımlanması, teşhis edilmesi ve sistematik açıdan değerlendirilmesinde morfolojik karakterlerin kullanılmasını yanı sıra, bitkilerin çevresel faktörlerden ve yetiştirme koşullarından etkilenmesi nedeni ile tanımlama ve teşhiste moleküler karakterlerin kullanılması gereklidir. Bu anlamda son zamanlarda bitkilerin genetik benzerlik ve farklılığını ortaya koyarak birbirinden ayıran moleküler sistematik çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada da, Doğu Anadolu Bölgesi’nde yer alan Van ilinde yetişen yabancı kuşkonmaz (*Asparagus persicus*, *Asparagus palaestinus* ve *Asparagus officinalis*) türlerinin genetik benzerlik ve farklılıkları morfolojik ve moleküler düzeyde ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Ayrıca bu türlerin çeşitli dokuları alınarak, antioksidan aktiviteleri için DPPH yüzdeleri, fenolik madde içerikleri, flavonoid madde içeriği, FRAP ve total antioksidan içerikleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

## 1.1. Asparagaceae Familyasının Genel Özellikleri

Bu familyanın üyeleri dik veya tırmanıcı, herdem yeşil veya çalı formunda, çok yıllık veya toprak üstü organlarını yıllık olarak döken, rizomlu veya yumru köklü yapıya sahiptir. Kökler silindirik veya iğsi, yanal kökler çok katlı zarla çevrilmiş yumrulu yapıdadırlar. Gövde dik veya sarmaşık şeklinde, dallar birbirinden ayrılmış durumda, kısa veya uzun dallar üstündeki yapraklar pul şeklinde indirgenmiştir. Çiçekler demet şeklinde veya tek başına oluşurlar. Çiçekler tek eşeyli, çift eşeyli, monoik veya dioik olabilir, ayrıca dik veya sarkık durumdadır. Asparagusun çiçek yapısı oldukça karmaşıktır. *A. officinalis* birinci yılda 3-4 sürgün oluştururken, ikinci yılda 5-6 sürgün oluşturmakta, 8-10 yıl sonra rizomlar daha güçlenip sürgün sayısı artmaktadır. Üçüncü yıldan 15. yıla kadar bitki gelişimini tamamlamakta, ancak daha sonra zayıflamaya başlamaktadır. Çiçekler sadece 3. yıldan itibaren oluşmaktadır. Yassı kladodlar iki taraflı ve anatomik olarak yapraklara oldukça benzerken, iğnemi kladodlar tamamen radyaldır, ayrıca her iki tip kladod iletim demetleriyle beslenmektedir. Kladodların yorumlanması bitki morfoloğları arasında sonu gelmeyen tartışmalara sebep olmuştur. Bazı bilim adamları iki taraflı simetrik kladodların indirgenmiş iletim demetleri gibi bazı ilginç noktalarına vurgu yapmışlardır, ancak kladodların eksensel pozisyonlarından, bunların kaulomatik yapıda oldukları açıktır. Kladodların ontogenisinde, gelişmekte olan yaprakların bazı özelliklerinin görülmesi boşuna değildir. Brakte yaprakların koltuklarındaki kladod demetleri oldukça aksenal bir yapıya sahiptirler. Çiçekler ilk yanal dallar olarak bu sürgün sistemini oluşturur ve orta gövde gelişimini devam ettirebilir. Üç farklı sürgün şekli vardır; özelleşmiş yapraklardaki sertleşmiş spurlar, sertleşmiş sivri uçlu kladodlar ve sürgün benzeri, kısa, ince ve gerçek dallar. Stomalar anomotik yapıdadır. Basamak şeklinde ve gözenekli damarlar hem köklerde hem de gövdede mevcuttur, basit gözenekli damarlar köklerde de meydana gelir. Rafit hücreler önemli derecede bulunur ve az miktarda da tüy bulunur.

*Asparagus* geniş ve kimisi erselik çiçekli, kimisi monoik veya dioik olan türleri içeren bir cinstir. Bazı türlerde, dişi organa sahip bireylerde erkek organ gelişmemişken, erkek organa sahip türlerde dişi organın indirgenmesi durumu değişkenlik göstermektedir. Ovaryum üstün niteliklidir ve bazen hafifçe uzantı bulunmaktadır. Nektar üreten dokuya sahiptirler ve karpel başına iki veya daha fazla ovül bulunur.

Mikrosporogenesisiz art arda meydana gelir ve çapraz şekilli tetratlar oluşur. Polen taneleri iki hücreli yapıda dağılırlar ve nişasta içerirler. Olgun embriyo kesesi asimetriktir ve bu asimetrik yapı tohum gelişimi süresince artar. Polenler oluklu yapıda olup mikro gözenekli veya hafif ağsı dış kabuğa sahiptirler. Temel kromozom yapıları  $n=10$  olup diploid, triploid, tetraploid, hekzaploid ve oktaploid türler mevcuttur. Dişi organı bulunmayan çiçeklerin pistillerinde meydana gelen nektar salınımı böceklerle tozlanmaya işaretler, bununla birlikte tozlanma olayı tam olarak aydınlatılmamıştır. Meyveler küresel ve karotenoidlerden dolayı kırmızı, mavi ve ahududu renginde olabilirler. Tohum şekli kapsüldeki tohum sayısına bağlı olarak küreselden köşeli şekle kadar farklılık göstermekte, tohum rengi ise koyu siyahtır (Kubitzki ve Rudall., 1998).

## 1.2 *Asparagus* Cinsinin Morfolojik Özellikleri

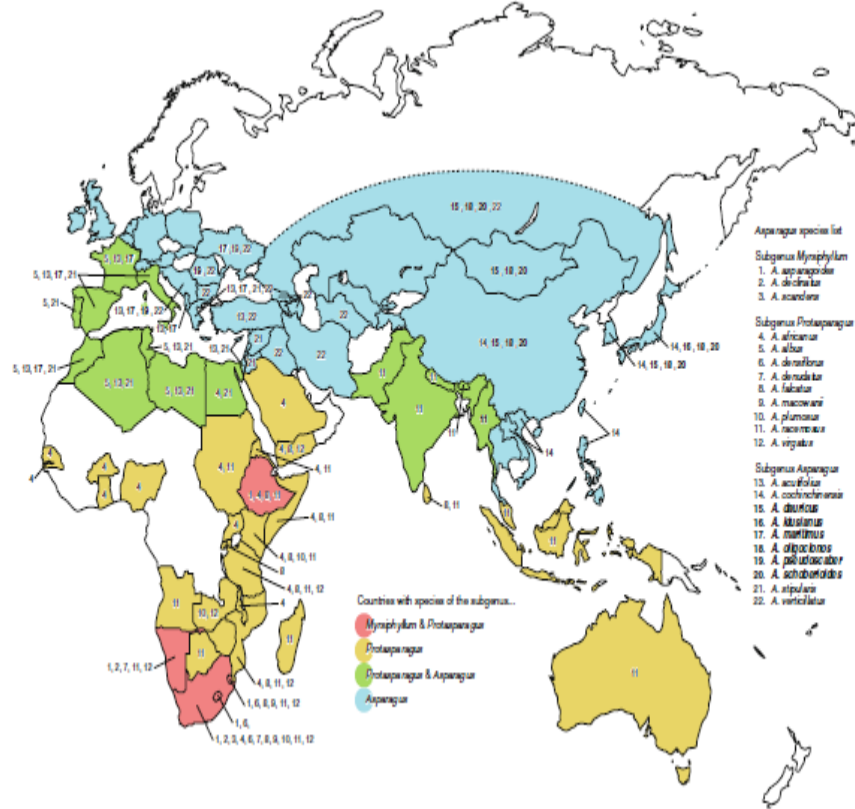
*Asparagus* cinsi *Asparagus*, *Protasparagus* ve *Myrsiphyllum* olmak üzere Asya, Avrupa, Afrika ve Avustralya'ya dağılmış toplam 100-300 tür içeren üç alt cinsten oluşur. İlk alt cinse ait türler dioik bireylerden oluşurken, ikinci ve üçüncü alt cinse ait türler hermafrodit bireyleri içerirler (Kubota ve ark., 2012). Cins çok yıllık iğ şeklinde, basit veya dallanmış rizomlu, dik tırmanıcı ot veya çalı şeklinde herdem yeşil veya kışın toprak üstü kısımları kuruyan bitkileri içerir. Gövde dallanmış yapıdadır (Tutin ve ark., 1980). *Asparagus* alt cinsine ait türler Asya ve Avrupa kökenliken, diğer iki alt cinse ait türler Afrika kökenlidir.

### 1.2.1. *Asparagus* cinsinin sistematikteki yeri

- **Alem:** Bitkiler (Plantae)
- **Bölüm:** Kapalı Tohumlular (Angiosperms)
- **Sınıf:** Liliopsida (Monocotyledoneae)
- **Takım:** Asparagales
- **Familiya:** Asparagaceae (Kuşkonmazgiller)
- **Cins:** *Asparagus*

### 1.2.2. *Asparagus* cinsinin ülkemizde ve dünya üzerindeki dağılımı

*Asparagus* L. cinsi ülkemizde özellikle Doğu ve Batı Anadolu ile Akdeniz Bölgesinde doğal olarak yetişme alanı bulmuştur (Sancaktaroğlu ve ark., 2011). Dünya genelinde ise Akdeniz ikliminden tropikal bölgelere ve eski dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerine kadar farklı alanlara yayılmıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Asparagus* Türlerinin dağılımı (Kubota ve ark., 2012)

### 1.2.3 *Asparagus* cinsinin kullanılmaya alanları

Kuşkonmaz bitkisinin taze sürgünleri sebze olarak tüketilmektedir. Ayrıca bitkinin süs bitkisi ve tıbbi aromatik bitki olarak kullanımı da mevcuttur. Kuşkonmazın sağlık üzerine çeşitli etkileri mevcuttur. Örneğin kuşkonmaz bitkisi çok düşük kalori içerir, 100 g taze kuşkonmaz sadece 20 kalori içerir. Taze sürgündeki diyet lifi miktarı orta seviyededir, 100 g taze sürgün yaklaşık 2.1 g diyet lifi içerir. Diyet lifleri konstipasyon (kabızlık) durumunun kontrolünde rol alır, düşük yoğunluklu lipoproteinleri bağlayarak LDL seviyesini düşürür; ayrıca, kan şekeri seviyesinin düzenlenmesine yardımcı olur. Geleneksel tıpta hassas bağırsak sendromunun ve

ödemlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Taze sürgünleri zengin bir antioksidan kaynağıdır, önemli ölçüde lutein, zeaksantin ve karoten içermektedir. Ayrıca folik asit, K, E ve B vitamini grubu açısından da zengin bir içeriğe sahiptir (Anonim., 2016).

#### **1.2.4 *Asparagus* cinsine ait *Officinalis*, *Persicus* ve *Palaestinus* türlerinin morfolojik özellikleri**

*Asparagus officinalis*; dik, tüysüz ve otsu yapıdadır. Boyu 75-100 cm'den 200 cm'ye kadar çıkabilir ve ince, dik dallanma gösterir. Mahmuz 1-3 mm boyundadır. Klodlar 3-6 çift fasikül halinde, 1-5 sıralı, 6-15 mm boyunda, 0.2 mm' genişliğinde, dik, ancak genellikle eşit boyda değildir. Yeşil renkte ya da nadiren mat yeşildir. Uçları dikenimsidir (mucronate). Çiçekler genellikle klod fasiküllerinden ayrı ayrı çıkarlar. Pediseller 10-15 mm boyunda, üstte ya da ortaya yakın bir yerde yerleşmiştir. Dişi periantler 5-6 mm boyunda, sarımsı-yeşil renkte, anterler 1.5 mm boyundadır. Meyve kırmızı renkli, 6-8 mm boyunda, tohum sayısı genellikle 2-4 adet, çiçeklenme zamanı 5. ve 6. aylara rastlamaktadır. Step alanlarda yayılış gösterirler ancak volkanik ve kalkerli alanlarda kısa boylu olarak yayılış gösterebilirler (Davis, 1965).

*Asparagus persicus* dikten yükseliciye kadar farklılık gösteren gövde yapısına sahip ve tüysüz otsu bitkilerdir. Gövde 25-100 cm'ye kadar uzayan, düz ya da kıvrılmış, oluklu ve sıklıkla alttan açılı yapıdadır. Mahmuz 0-4 mm boyunda, klodlar 2-5 nadiren 1 ya da 6 çift olabilir, uzunumsu, yarı dik ya da yivli yapıda olabilir, genellikle klodlar eşit boyda değildir. Klodlar 10-45 mm boyunda ve 0.3-0.7 mm genişliğinde, yükselici, dik ya da divergent, tüysüz, yeşil (kuru yerlerde mat), düze yakın ya da bükülmüş, ucu akut şeklindedir. Çiçekler 1-2 çift fasikül halinde ya da uçlarda dallanmış haldedir. Pediseller 10-22 mm boyunda, artikulat ya da üstte ortadadır. Dişi periant 6-7 mm boyunda, sarımsı yeşil, tabanda kahverengine dönmüştür. Anterler 1.2-1.5 mm boyunda, meyve kırmızı, 6-8 mm boyunda, tohumlar genellikle 1 tane, çiçeklenme 5. ve 7. aylar arasına rastlar. Tuzlu steplerde yayılış gösterirler ve 800-1700 m'ye kadar yayılışları bulunur (Davis, 1965).

*Asparagus palaestinus* dik ya da tırmanıcı, gevşek, tüylü otsu bitkidir. 2 m'ye kadar boylanabilir. Dallanma dik, zayıf ve zikzak şeklindedir. Mahmuz 2-6 mm boyunda, klodlar 8-10 çift, gevşek fasiküller halinde, dik ya da bükülmüş, ipliksi, 6-18

mm boyunda 0.1-0.15 mm genişliğinde, yeşil renklidir. Akut çiçekler 1-3 çift halindedir. Fasiküller uçta dallanmış halde, pediseller 6-15 mm boyunda, artikulat ortaya yakın, dişi periant 4.5-5.5 mm boyunda, yeşilimsi ya da kahverengimsi, anter 1-1.3 mm boyunda meyve kırmızı renkli ve 10 mm boyunda, çiçeklenme 5.ve 7. aylar arasında meydana gelir. Kayalık alanlarda ve nehir kenarlarında, 1-1480 m arasında yayılış gösterirler (Davis, 1965).

### **1.3 Moleküler Sistematiik**

Yirminci yüzyılın ikinci yarısında laboratuvar tekniklerinde meydana gelen ilerlemeler, biyolojik anlamda önemli olan moleküllerin analiziyle türler arası ve tür içi genetik çeşitliliğin belirlenmesini mümkün kılmıştır. Bu metodlar arasında antikorların çapraz reaksiyonları, protein elektroforezi, DNA-DNA hibridizasyonu, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi ve DNA ile proteinlerin direkt sekanslanması sayılabilir. Bunlar içinde DNA sekanslarının kıyaslanması sonucu elde edilen sonuçların en güçlü ve en kullanışlı olanı olduğu söylenebilir. Filogenetik ilişkilerin açığa çıkarılmasında kullanılan klasik yaklaşımlarla kıyaslandığında moleküler filogenide, homolog sekans setindeki her bir bölge, bu bölgeye karşılık gelen bir karakter olarak düşünülebilir. Klasik metodlarla kıyaslandığında moleküler yaklaşımların önemli ölçüde üstünlükleri göze çarpmaktadır. Örneğin özelliklerin mevcut durumlarının belirlenmesinde herhangi bir subjektif yaklaşım söz konusu değildir. Diğer bir avantajı ise moleküler tekniklerin tüm organizmalara uygulanabilmesidir, böylece farklı formlar arasında kıyaslama yapmak mümkün olmaktadır.

Moleküler sistematiik 4 basamakta gerçekleştirilir:

- Hizalama.
- Yer deęiřtirmelerin saptanması.
- Filogenetik ağaç oluřturma.
- Oluşturulan ağacın değerlendirilmesi.

### **1.3.1. Moleküler sistematikte kullanılan yöntemlerden bazıları**

#### **1.3.1.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

DNA belirteçleri (markırları/işaretleyicileri) arasında ilk keşfedilene RFLP'dir (Saiki ve ark., 1988). RFLP tekniğinde ilk basamak varyasyon taşıyan parçanın (fragment) çoğaltılmasıdır. Daha sonra çoğaltılan kısım uygun bir kesim enzimiyle kesilir ve agaroz jelde yürütülür. DNA'lar southern blot tekniğiyle naylon membranlara aktarılır, işaretleyici olarak kullanılan DNA parçacıkları çeşitli maddelerle işaretlendikten sonra membranda bulunan DNA'larla eşleşmeye tabi tutulur (Tanksley ve ark., 1992). RFLP tekniğinin önemli avantajları ucuz olması ve gelişmiş alet ve ekipmana gerek duyulmamasıdır. RFLP analizlerini kurmak kolaydır ve genellikle kolayca bulunabilecek programlarla birlikte kullanılabilir. Spesifik endonükleazlara ihtiyaç duyulması ve varyasyonun tam olarak tanımlanmasındaki zorluklar ise dezavantajlı taraflarını oluşturmaktadır (Rasmussen, 2012).

#### **1.3.1.2. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)**

RAPD PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) tabanlı bir tekniktir. Rastgele nükleotid dizilimine sahip primerler kullanılarak DNA amplifikasyonu yapılmaktadır. Daha sonra bu DNA parçaları jelde yürütülmekte ve etidyum bromür ile boyandıktan sonra görünür hale gelmektedirler. Amplifikasyon ürünlerinden her biri primerlerle benzer dizilime sahip iki kısa segment içeren genom bölgelerinden elde edilir. Polimorfizm primerlerin bağlanma noktalarındaki amplifikasyon bantlarının varlığı ya da yokluğuyla tespit edilir. RAPD yönteminde kullanılan primerlerin dominant olması bu tekniğin dezavantajlı kısmını oluşturmaktadır (Rafalski ve ark., 1993).

#### **1.3.1.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism)**

AFLP tekniği restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA parçalarının seçici PZR amplifikasyonuna dayanmaktadır. Teknik üç aşamadan oluşmaktadır: (i) DNA restriksiyonu ve kesilen DNA parçalarının oligonükleotid adaptörlerle bağlanması (ligasyon), (ii) Kesilen parçaların seçici amplifikasyonu, (iii) çoğaltılan parçaların jelde analiz edilmesi. En önemli avantajı tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi



ve sonuçların tekrarlanabilir olmasıdır. Pahalı olması, laboratuvar ekipmanına gereksinim duyulması, ayrıca dominant markör olması ise dezavantajını oluşturmaktadır (Ridout ve Donini., 1999).

#### **1.3.1.4. CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence)**

CAPS genetik polimorfizmin tespit edilmesinde kullanılan basit ve güvenilir bir yöntemdir. PZR ürünleri restriksiyon enzimleriyle kesilerek elektroforez yapılır. Bu metotta kullanılan primerlerin genlerin ekzon sekanslarına spesifik olması, amplifikasyonun farklı çalışmalarda oldukça stabil olmasını sağlar (Tanaka ve ark., 2010).

#### **1.3.1.5. SSR (Simple Sequence Repeats)**

Mikrosatellitler ya da basit dizili tekrarlar (SSRs) arka arkaya dizilmiş, tekrar eden ve 1-6 baz çifti uzunluğundaki birimlerden oluşan DNA parçalarıdır. Bu belirteçlerin önemi; genomun geniş bir bölümüne yayılmaları, bolca bulunmaları, multiallel doğaları ve kodominant yapıya sahip olmaları, ayrıca PZR yöntemiyle basitçe tespit edilmesinden kaynaklanmaktadır (Powell ve ark., 1996).

#### **1.3.1.6. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)**

ISSR tekniği zıt yönlere yönelmiş iki tipik mikrosatellit tekrar bölgesi arasındaki çoğaltılabilir mesafede bulunan DNA segmentlerinin çoğaltılmasını içeren PZR tabanlı bir yöntemdir. Bu teknikte genellikle 16-25 baz çifti uzunluğundaki mikrosatellitler kullanılır. Bu teknikte primer olarak kullanılan mikrosatellit tekrarlar dinükleotid, trinükleotid, tetranükleotid ve pentanükleotid olabilir (Gupta ve ark., 1994).

#### **1.3.1.7. SNP (Single Nucleotide Polymorphism)**

SNP, DNA sekansındaki tek bir nükleotid değişikliğidir. Bitkilerin de dâhil olduğu pek çok canlıda meydana gelen bir varyasyondur. Transisyon ve transversiyon SNP oluşmasına sebep olan spontan baz değişimleridir. Bir popülasyondaki tek baz değişim frekansı %1'den büyükse SNP olarak, %1'den küçük ise mutasyon olarak nitelendirilir.

## 1.3.2. Moleküler sistematikte kullanılan DNA çeşitleri

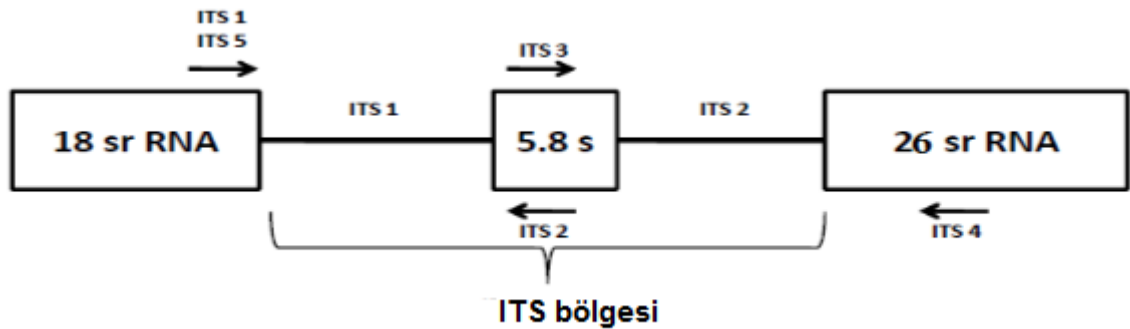
### 1.3.2.1. Çekirdek DNA'sı

rDNA, cpDNA'daki sınırlamaları ortadan kaldırmak, bağımsız ve ilave tahminlerde bulunmak için bitki sistematiğinde sık sık kullanılmaktadır. Düşük taksonomik seviyelerde iç ve dış intergenik bölgeler kullanılırken, yüksek taksonomik seviyelerde yavaşça evrimleşen rRNA kullanılmaktadır. rDNA'nın yüksek kopya sayısına sahip olması, hem restriksiyon hem de PZR temelli yaklaşımlarla değerlendirilmesini kolaylaştırmaktadır. Organel genomundaki sekanslara göre daha hızlı evrimleşmesi, biparental kalıtımı, çoklu bağımsız lokusların varlığı nükleer genlerin avantajları arasında gösterilebilir. Nükleer genlerin karmaşık yapısı ve evrimsel dinamikleri, ortolog genlerin izolasyonu ve tanımlanması rDNA'nın dezavantajlarını oluşturmaktadır (Small ve ark., 2004).

#### 1.3.2.1.1. İç transkribe olan boşluklar (Internal Transcribed Spacers)

Nükleer ribozomal DNA'nın ITS bölgesi 1990'lardan beri kapalı tohumlularda filogenetik çalışmalar için kullanılmaktadır. ITS bölgesinde bulunan ITS1 ve ITS2 bölgeleri PZR ile kolaylıkla çoğaltılabilir ve evrensel primerler kullanılarak dizilenebilir (Şekil 1.2).

ITS1 ve ITS2 bölgelerinin varyasyon dereceleri bitki grupları arasında farklılık göstermektedir. ITS bölgesi rDNA'nın iç ve dış transkribe olan bölgelerine kıyasla daha fazla korunmuş bir bölgedir (Baldwin ve ark., 1995).



Şekil 1.2. ITS bölgesi (Sahare, 2013)

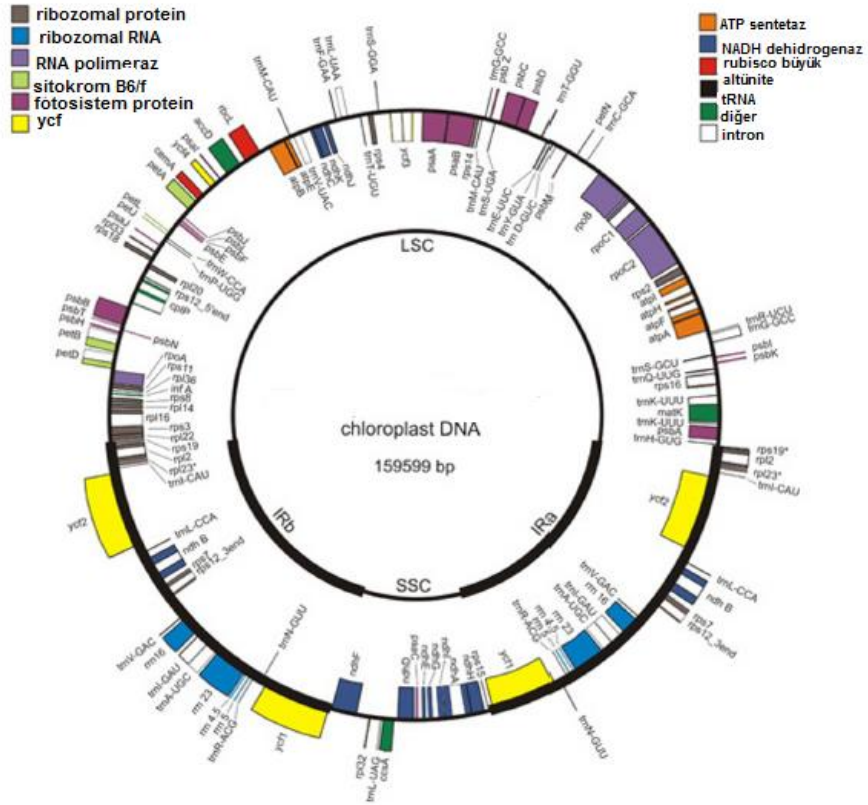
Filogenetik çalışmalarda ITS bölgesinin sağladığı avantajlar;

- Bitki çekirdek genomunda oldukça fazla tekrar edilirler.

- Yüksek sayıdaki kopya sayısından dolayı nrDNA'nın (Nükleer ribozomal DNA) tespiti, çoğaltılması, kolonlanması ve sekanslaması kolaydır.
- ITS bölgesinin nispeten küçük boyutlarda olması ve oldukça korunaklı olan bölgeler arasında yer alması bu bölgenin çoğaltılmasını kolaylaştırır.
- rDNA bölgelerine göre daha hızlı varyasyon gösterirler.
- ITS bölgesine ait sekansların elde edilmeleri ve yorumlanmaları kolaydır.
- rDNA alt birimlerinin oluşum sürecinde görev alırlar.
- Filogenetik çalışmalarda sağlıklı sonuçlar verebilecek uzunluktadır.

### 1.3.2.2 Kloroplast genomu

Kloroplast fotosentezin gerçekleştiği organel olup çift zarla çevrilmiştir. Kloroplast DNA'sı çift iplikli halkasal yapıda ve yarı korunumludur. Kloroplastlarda "stroma" adı verilen ve içinde DNA, RNA, ribozomlar ve fotosentez için gerekli olan enzimleri barındıran bir de sıvı bulunur. Kloroplastlar sahip oldukları bu DNA ve ribozomlar sayesinde hem kendilerini çoğaltırlar, hem de bazı proteinlerin üretimini gerçekleştirirler (Anonim, 2015).



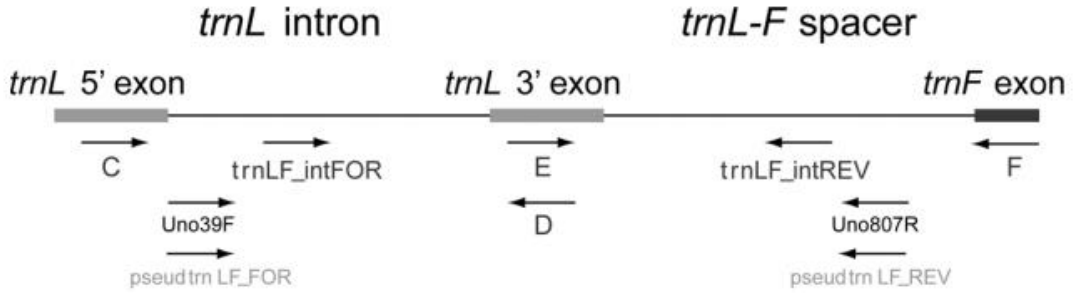
Şekil 1.3. Kloroplast Genomu ( Logacheva ve ark., 2008)

Göreceli olarak küçük ve sabit boyutu, korunumlu evrimi kloroplast DNA'sını bitki türlerinin evrimsel geçmişini izlemede ideal bir molekül haline getirmektedir. Düşük taksonomik seviyelerde, cpDNA varyasyonları, restriksiyon ilişkileri kıyaslanarak kolaylıkla analiz edilebilirken, yüksek taksonomik seviyelerde DNA sekanslaması ve ters çözüm analizleri, kloroplast genomunun kıyaslanmasında kullanılan seçme yöntemlerindedir. Kloroplast genomu temel bitki gruplarından biri olan kapalı tohumluların filogenetik ilişkilerini açığa çıkarmada sıklıkla kullanılmaktadır. Bitki mitokondriyal ve nüklear genomunun sekansların düzenlenmesinde göreceli olarak hızlı olması, genomların orta ölçekli büyüklükte olan kısımlarının evriminin açıklanmasında zorluklar oluşturmaktadır. Kloroplast genomları temel olarak; duplikasyon, delesyon, korunumlu evrim, psödogen oluşumu gibi evrimsel süreçlerden bağımsızdır. Filogenetik olarak bitki çekirdek DNA'sını; geniş ve değişken boyutu, korunumlu evrimi ve düzenlenmesindeki kompleks formlar gibi çeşitli nedenlerden dolayı kloroplast DNA'sı ile kıyaslamak çok zordur. Ancak Nüklear DNA iki özelliğinden dolayı tür içi ve daha düşük taksonomik seviyelerde çok kullanışlıdır; ilki, rDNA'nın transkribe olmayan belirli bölgelerindeki sekansların kloroplast DNA'sındaki herhangi bir bölgeye göre daha hızlı evrimleşmesi, ikincisi ise evrimsel açıdan cpDNA ve nüklear DNA farklı şekillerde aktarılmasıdır. CpDNA maternal olarak aktarılırken, nüklear genom biparental olarak aktarılır (Palmer, 1985).

#### **1.3.2.2.1 Genler arası boşluk ( *trnL-trnF* )**

*TrnL* intron grubu ve *trnL* ile *trnF* arasındaki bölge bitki sistematğinde en sık kullanılan ve kodlanmayan DNA bölgeleri arasında yer almaktadır (Quandt ve ark., 2004). Genler arası boşluk *trnL* (UAA) 3' ekzonu ve *trnF* (GAA) geni arasında yer alır (Şekil 1.4).

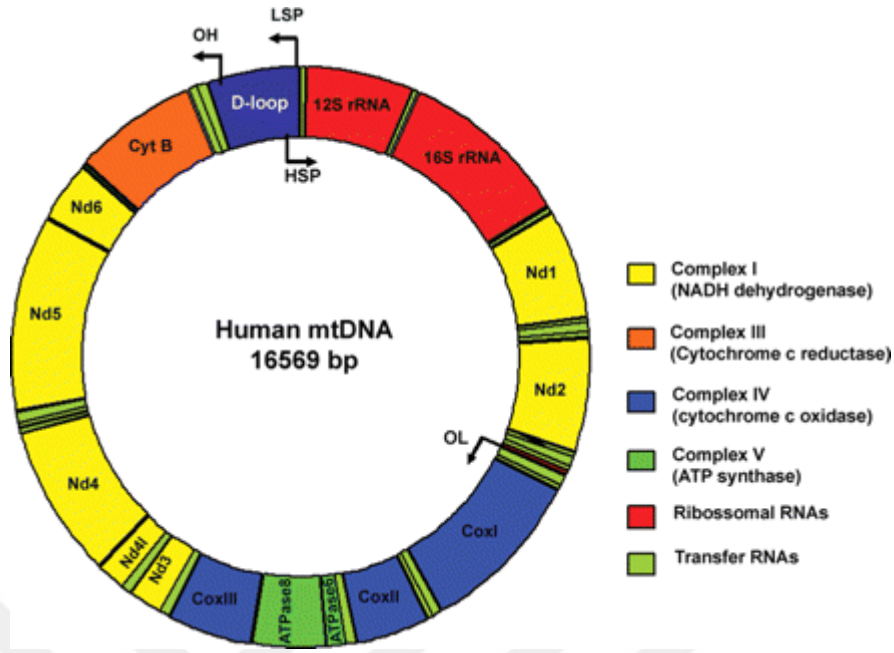
*trnL-F* bölgesi özel primerler vasıtasıyla PZR tekniği ile çoğaltılarak baz polimorfizimine bakılır ve türler arasındaki filogenetik ilişki belirlenir.



Şekil 1.4. trnL-F Bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin şeması (Pirie ve ark., 2007)

### 1.3.2.3 Mitokondrial genom

Mitokondriler ATP sentezi ve fotofosforilasyondan sorumlu hücrel organellerdir. Bitkilerde, hayvanlarda ve mantarlar âleminde bulunurlar. Kendileri için gerekli olan bazı proteinleri kodlayan DNA'ya sahiptirler ve kendilerini replike edebilirler. Genel olarak çift zincirli, sirküler ve kovalent durumda bulunurlar. Mitokondrial DNA maternal olarak aktarılır ve heteroplazmi durumuna nadiren rastlanır. Nüklear genoma göre yaklaşık 5-10 kat daha hızlı evrimleşirler. Nüklear ve mitokondrial genom fonksiyonel olarak birbirine bağlıdır. Mitokondrial proteinlerin birçoğu nüklear genler tarafından kodlanırlar. Mitokondrial DNA tarafından kodlanıldığı bilinen 2 rRNAs, 20-35 tRNA ve 13 tane protein bulunmaktadır. Bu komplekslerin geri kalan alt birimleri çekirdekdeki genler tarafından kodlanmaktadır. Mitokondrial olarak kodlanan bütün proteinler bir kısmı nüklear olarak kodlanmış enzim komplekslerini ve metabolik bileşenlerini oluştururlar. Bu durumda sitokrom c oksidaz, ATP sentetaz ve NADH dehidrogenaz gibi alt birimleri nüklear olarak kodlanan mitokondrial kompleksleri söz konusu olmaktadır (Şekil 1.5). mtDNA farklı boyutlarda bulunabilir, örneğin Metazoa: *Ascaris suum*, 14.5 kb; *Drosophila subobscura*, 15.8 kb. Maya: *Saccharomyces cerevisiae*, 78 kb. Mantar: *Neurospora crassa*, 60 kb. Bitkiler: *Zea mays*, 570 kb (Castro ve ark, 1998).



Şekil 1.5. İnsan mitokondrial genomu (John ve ark., 2010)

#### 1.3.2.4 Filogenomik

Tohumlu bitki grupları arasındaki filogenetik ilişkinin anlaşılmasına yönelik çabalar genomu tamamen dizilenen az sayıdaki gruptan dolayı sekteye uğramaktadır. Moleküler verilerden elde edilen filogenetik tezler analizde kullanılan tür veya gen gruplarının sayıca az olmasından dolayı genellikle tartışmalı olmuştur. (Lee, Cibrian-Jaramillo ve ark. 2011).

Bitkilerin genom dizilerinin tamamının bilinmesi gelişimsel ve evrimsel sürecin anlaşılmasına yönelik farklı bakış açıları sağlamaktadır. Evrimsel mekanizmayla birlikte bitki genomlarının dizilenmesi, genlerin ve/veya dizi ifadesindeki modifikasyonların bitkide meydana gelen temel değişimler üzerindeki etkisinin anlaşılmasında yararlı olacaktır. (Conte, Gaillard ve ark. 2008).

Genel anlamda bitki moleküler filogenetiği plastid genomuna dayalıdır (Burleigh ve Mathews 2004, Barkman, McNeal ve ark. 2007, Zhu, Chase ve ark. 2007). Gelişen DNA teknolojileri sayesinde son 20 yıl içinde toplam 190 plastid genomu dizilenmiştir. Plastid genomlarının nispeten kısa olması ve çok sayıda tekrar içermesi plastit genomlarını nükleer genoma göre daha makul hale getirmektedir. Karşılaştırmalı çalışmalar plastid genomunun önemli değişiklikler geçirdiğini ve evrimsel süreç sırasında önemli gen kayıpları yaşadığını göstermiştir. Bazı genler veya fonksiyonel

olarak bağlantılı gen grupları birbirinden bağımsız olarak kaybolmuştur. Bu genlerin karakterize ettiği karakterler filogenetik olarak bilgi verici markırlar olarak bilinirler. Plastid genomları arasında kloroplast genomu bitkilerde filogenetik ilişkilerin açığa çıkarılmasında etkili bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır (Gao, SU ve ark. 2010). Plastid genomuna dayalı filogenetik çalışmalarda önemli ilerlemeler kaydedilirken, nükleer genom-ölçekli çalışmalar hala başlangıç aşamasındadır.(Sanderson ve McMahon 2007, Burleigh, Bansal ve ark., 2011).

#### **1.4 Serbest Radikaller**

Biyolojik materyallerdeki serbest radikallerin varlığı yaklaşık 50 yıl önce keşfedilmiştir. Hemen akabinde Denham Harman oksijen radikallerinin in vivo koşullarda enzimatik reaksiyon ürünleri tarafından oluşturulduğu tezini ortaya atmıştır. Serbest radikallerle ilgili çalışmalar McCord and Fridovich'in süperoksit dismutazın varlığını keşfetmelerinden sonra yeni bir döneme girmiştir. Üçüncü dönem ise serbest radikallerin olumlu etkilerinin tespit edilmesiyle başlamıştır. Artık, canlı organizmaların sadece serbest radikallerle birlikte yaşamak için yeni stratejiler geliştirmedeği, aynı zamanda serbest radikallerin olumlu etkilerinden faydalandığını gösteren birçok kanıt mevcuttur (Dröge, 2002).

Serbest radikaller eşlenmemiş elektrona sahip olan moleküllerdir. Serbest elektron varlığından dolayı bu moleküller oldukça kararsızdırlar ve diğer bileşiklerle reaksiyona girme eğilimleri yüksektir. Kararlı hale geçmek için gerekli elektronu elde etmeye çalışırlar. Ancak bu defa elektron kaybeden molekülün kendisi serbest radikal olur. Bütün bu olaylar nanosaniye içinde gerçekleşir. Böylelikle zincirleme reaksiyon başlar, reaksiyon başladıktan sonra katlanarak devam edebilir ve nihayet canlı hücrenin yıkımıyla sonuçlanır. Genel olarak serbest radikallerin canlı hücre üzerine zararları; DNA zararı, lipitlerdeki yağ asitlerinin oksidasyonu, proteinlerdeki aminoasitlerin oksidasyonu, kofaktörlerin oksidasyonu ile belirli enzimlerin inaktif hale getirilmesi şeklinde olmaktadır. Bu zararlar sonucu hücrelerde yaşlanma, kalp-damar rahatsızlıkları, sinir sisteminde dejenerasyon, böbrek rahatsızlıkları, fibrozis gibi çeşitli sorunlar meydana gelmektedir. Serbest radikaller zararlı etkilerinin yanında, bakteri ve diğer yabancı hücrelerin yok edilmesi, kanser hücrelerinin öldürülmesi, genlerin aktif ya da inaktif hale getirilmesi, enfeksiyonla mücadele ve beyini alarm durumunda tutmak

gibi bazı hayati fonksiyonlardan da sorumludurlar. Normal şartlarda vücut serbest radikallerle mücadele edebilir. Ancak ortamda antioksidanlar yoksa ya da serbest radikal oluşumu artıyorsa çeşitli zararlar meydana gelebilir. Serbest radikal oluşumu sürekli ve kaçınılmaz bir süreçtir. Vücutta serbest radikal oluşumu çeşitli faaliyetler sonucu meydana gelir. Bağışıklık sistemi hücreleri reaktif oksijen türlerini ve oksijen radikallerini savunma silahı olarak üretebilirler. Enerji üretimi sırasında hücreler serbest radikalleri zehirli atık olarak üretirler. Hücrelerde her biri farklı serbest radikal meydana getiren farklı metabolik faaliyetler meydana gelir. Böylece tek bir hücre dahi farklı çeşitte serbest radikal meydana getirebilir. Endüstriyel toplumlarda yaygın olan stres unsuru vücudu çok sayıda serbest radikal oluşturmaya zorlayabilir. Stres tepkileri vücudun enerji üreten kısımları ile bir nevi yarışa girerek ürün tarafından toksik madde olarak üretilen serbest radikal miktarını artırır. Dahası vücuttaki stres metabolizmasını yürüten çeşitli hormonların kendisi oldukça zararlı olan serbest radikallere parçalanmaktadır. Asbest, benzen, karbon monoksit, klorid, formaldehid, ozon, sigara dumanı ve toluen gibi kimi maddeler, boya, tiner, temizlik ürünleri ve tutkal gibi bazı kimyasal çözeltiler, tavsiye edilenden fazla kullanılan ilaçlar, parfümler, pestisitler, klorinasyonun sebep olduğu trihalometan ve kloroform gibi suya bulaşan bazı kimyasallar, kozmik radyasyon, elektromanyetik alan, radyon gazı, solar radyasyon, x-ray ışınları, gübre ve pestisit gibi tarımda kullanılan kimyasalları içeren gıdalar, yüksek oranda lipit peroksid içeren işlenmiş gıdalar potansiyel birer serbest radikal kaynağıdır (Sarma ve ark., 2010).

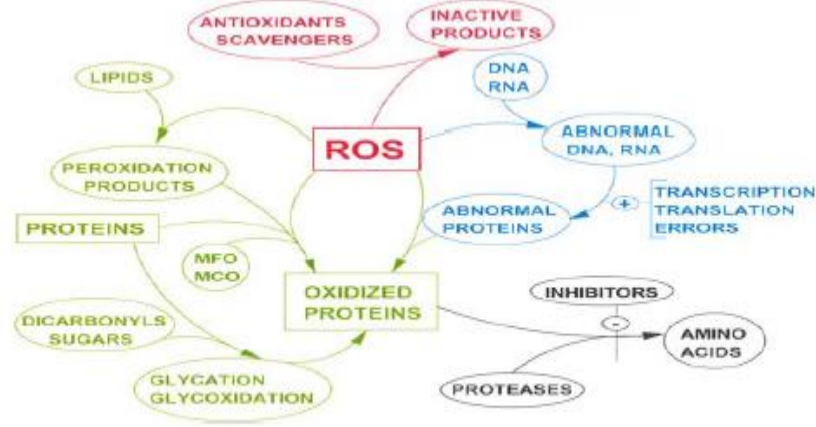
Kimyada serbest radikaller, radikal ilavesi ya da radikallerin yer değiştirmesi gibi süreçlerde reaktif aracı olarak görev alırlar. Serbest radikallerin dâhil olduğu zincirleme reaksiyonları genel anlamda üç farklı aşamaya ayırmak mümkündür; başlangıç, çoğalma ve sonlanma.

Başlangıç süreci serbest radikal sayısındaki net artışla sonuçlanan reaksiyonları içerir. Bu reaksiyonlarda kararlı türlerden serbest radikaller oluşabilir ya da daha çok serbest radikal oluşturmak için kararlı bileşiklerle bazı reaksiyonlara girebilirler. Yayılma süreci toplam serbest radikal sayısının sabit kaldığı periyodu kapsar. Sonlanma reaksiyonları toplam serbest radikal sayısındaki azalışla sonuçlanan reaksiyonlardır. Tipik olarak iki serbest radikal kararlı bir bileşik oluşturmak için bir araya gelirler (Sarma ve ark., 2010).



### 1.4.1 Serbest radikal çeşitleri

Reaktif oksijen türleri çok küçük moleküllerdir ve dış kabuktaki eşlenmemiş elektron varlığından dolayı oldukça reaktiftirler. Reaktif oksijen türleri normal oksijen metabolizması sonucu oluşan doğal ürünlerdir ve hücrenin sinyal metabolizmasında önemli bir rol oynarlar. Ancak çevresel stres koşulları sırasında bu türlerin miktarında, hücre yapısında ciddi zararlanmayla sonuçlanan ani artışlar olmaktadır. Yaraların tedavisi ve kan homeostazisinin düzenlenmesinde görev alan trombositler yaralanan kısımlarda ilave trombosit görevlendirdikleri için serbest oksijen türlerinin salınımı söz konusu olmaktadır (Sarma ve ark., 2010). Genel olarak serbest oksijen türlerinin canlı hücre üzerine zararları; DNA zararı, lipitlerdeki yağ asitlerinin oksidasyonu, proteinlerdeki aminoasitlerin oksidasyonu, kofaktörlerin oksidasyonu ile belirli enzimlerin inaktif hale getirilmesi şeklinde olmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Reaktif oksijen türlerinin etkisi (Sarma ve ark., 2010)

### Singlet oksijen

Singlet oksijen ( $^1O_2$ ),  $O_2$ 'nin ilk uyarılmış halidir ve oldukça ilginç bir reaktif oksijen türüdür, çünkü singlet oksijenin  $O_2$ 'ye elektron transferi ile herhangi bir ilgisi bulunmamaktadır. Fotosentez sırasında yetersiz enerji dağılımı üçlü klorofil oluşumuna sebebiyet verebilir. Üçlü klorofil durumu çok reaktif olan  $^1O_2$ 'den ayrılmak için  $^3O_2$  ile reaksiyona girebilir. Fotosentez sırasında  $^1O_2$  oluşumunun PSI ve PSII ile bütün fotosentez süreci üzerinde çok olumsuz etkisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca tuzluluk, kuraklık gibi çeşitli abiyotik stres koşulları stomanın kapanmasına sebep olmakta ve

kloroplasttaki hücre içi  $\text{CO}_2$  konsantrasyonu düşmekte, bu durumun bir sonucu olarak da  $^1\text{O}_2$  oluşumu teşvik edilmektedir. Hücre içindeki  $^1\text{O}_2$ 'nin toplam ömrü 3  $\mu\text{s}$  olarak ölçülmüş ve bu süre içinde bu moleküller birkaç yüz nanometre mesafeye dağılabildiği belirlenmiştir. Çeşitli biyolojik moleküller için yükseltgen olan ve lipid, protein, pigment ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilen singlet oksijenin, hücrenin ölümüyle sonuçlanabilen PSII aktivitesindeki hasardan sorumlu olan en önemli tür olduğu düşünülmektedir. Singlet oksijenin,  $\beta$ -karoten, tokoferol ve plastokinon tarafından etkisi yok edilmekte, aksi takdirde fotooksidatif strese verilen moleküller yanıtlarla ilgisi bulunan genlerin regülasyon artışını aktif hale gelmektedir (Gill ve Tuteja., 2010).

### **Süper oksit radikalleri ( $\text{O}_2^-$ )**

$\text{O}_2^-$  Radikallerinin en çok üretildiği bölgeler PSI sisteminin ilk elektron alıcısı olan tillakoid membran zinciridir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi oksijenli üretimin kaçınılmaz bir sonucudur. Terminal oksidaz-sitokrom c oksidaz veya alternatif oksidaz  $\text{O}_2$  ile reaksiyona girdiği zaman dört elektron transfer edilir ve su açığa çıkar. Ancak zaman zaman  $\text{O}_2$  elektron taşıma sisteminin diğer bileşenleri ile de reaksiyona girebilir. Bu durumda ise sadece bir elektron transfer edilir ve sonuçta  $\text{O}_2^-$  oluşur. Bitki dokularında ise %1-2  $\text{O}_2$  tüketimi  $\text{O}_2^-$  oluşumuna sebebiyet vermektedir (Gill ve Tuteja., 2010).

### **Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Hidrojen Peroksit, süperoksit radikalının indirgenmesi sonucu oluşur. Hidrojen peroksit; süper oksit, hidroksil anyonu ve singlet oksijene göre daha uzun ömürlüdür ancak orta ölçekli bir reaktiftir. Hücre içinde aşırı miktarda bulduklarında oksidatif strese sebebiyet verirler, ayrıca enzimlerin tiyol gruplarını okside ederek onları inaktif hale getirebilirler. Hidrojen peroksitin bitkilerde iki önemli görevi vardır. İlki, düşük konsantrasyonlarda bitkilerin biyotik ve abiyotik stres koşullarına alışmasında görev alan bir sinyal molekülü gibi davranırlar, yüksek konsantrasyonlarda ise PCD (Prokalsitonin) oluşumuna neden olur. Ayrıca, hidrojen peroksit büyüme, gelişme, fotosentez, fotorespirasyon, yaşlanma, hücre döngüsü, stoma hareketi gibi çeşitli fizyolojik olaylarda rol oynamaktadır (Gill ve Tuteja., 2010).

## **Hidroksil Radikali (OH·)**

Hidroksil radikali, bilinen serbest oksijen türleri arasında en aktif olanlardan biridir. Demir başta olmak üzere, uygun geçiş metallerinin varlığında, hidroksil radikali, nötr pH ve oda sıcaklığında, demir katalizörlüğünde ve Fenton reaksiyonları sonucu süper oksitten ve hidrojen peroksitten oluşabilir. Hidroksil radikallerinin *in vivo* koşullarda büyük ölçüde oksijen toksisitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu radikaller potansiyel olarak DNA, lipit, protein ve hemen hemen hücrenin bütün bileşenleri ile reaksiyona girebilir ve bir hayli reaktif olan oksijen türlerini elemine edecek enzimatik mekanizmanın yokluğundan dolayı hidroksil radikallerinin aşırı derecede üretimi hücrenin ölümüne sebep olabilir (Gill ve Tuteja., 2010).

## **1.5 Serbest Radikallerin Metabolizmaya Etkileri**

### **1.5.1 Serbest radikallerin lipidlere etkileri**

Lipit peroksidasyonu, bütün canlı organizmalarda meydana gelen en zararlı süreç olarak düşünülmektedir. Hücre zarında meydana gelen zararlanma, çeşitli stres koşulları altında lipit yıkımının seviyesini belirlemede kullanılan bir parametredir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu, lipit peroksidasyonu sırasında oluşan ürünlerin keton, MDA ve bunlarla bağlantılı bileşikler gibi küçük hidrokarbon fragmentlerini içeren çoklu doymamış öncü maddelerden oluştuğu anlaşılmıştır. Hem hücresel hem de organel membranında reaktif oksijen türlerinin üst sınırına ulaşıldığı zaman lipit peroksidasyonu meydana gelir, bu durum sadece normal hücresel fonksiyonu etkilemekle kalmaz, aynı zamanda lipit kaynaklı radikal oluşumuyla oksidatif stres etkinliğini artırır. Lipit peroksidasyonu üç aşamada meydana gelir. İlk aşama başlangıç aşamasıdır. Bu aşama başta demir ve bakır olmak üzere çeşitli geçiş elementlerini içerir. Ancak süper oksit ve hidrojen peroksit bu reaksiyonları başlatabilirken, hidroksil radikali nispeten yetersiz kalmaktadır. Membranda meydana gelen lipit peroksidasyonu hidrojen atomunun ayrılmasıyla başlar. Oksijen varlığında, oksijen yağ asitlerinin peroksi radikaline dönüşümüne sebep olur, reaksiyon başladıktan sonra Peroksi radikali çoklu doymamış yağ asidi zincirinden hidrojen atomunu ayırarak peroksidasyon zincir reaksiyonunu yayabilir. Son aşamada lipit hidroperoksit; lipit alkoksi radikalleri, aldehidler, alkanlar, alkol dahil çeşitli reaktif türlere ayrışabilir (Gill ve Tuteja., 2010).

### **1.5.2 Serbest radikallerin proteinlere etkileri**

Protein oksidasyonu, oksidatif stres sonucu oluşan ürünlerin veya reaktif oksijen türlerinin proteinlerin kovalent bağ yapısında meydana getirdiği değişiklik olarak tanımlanmaktadır. Protein oksidasyon tiplerinin büyük kısmı geri dönüşümsüzdür, ancak sülfür içeren aminoasitlerin dâhil olduğu kimi reaksiyonların dönüşümlü olduğu bilinmektedir. Arg, His, Lys, Pro, Thr ve Trp aminoasitleri başta olmak üzere bazı aminoasitlerin oksidasyonu sonucu karbonil grupları açığa çıkar, bu gruplar aminoasitlerin proteolitik saldırılara karşı hassasiyetini artırabilir veya değiştirebilir. Protein karbonilasyonu aminoasit yan zincirlerinin direkt oksidasyonu sonucu meydana gelebilir. Reaktif oksijen türlerinin sentez bölgesi ve hedef bölgeleri ne olursa olsun, bu moleküller sülfür taşıyan ve tiyol grubu içeren proteinleri hedef alırlar. Çeşitli stres mekanizmalarının dokulardaki proteinlerin karbonilasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Buğday bitkisinin yapraklarında yapılan bir çalışma sonucunda mitokondride meydana gelen protein karbonilasyon oranının kloroplast ve peroksizomda meydana gelen karbonilasyona göre daha yüksek olduğu bulunmuş ve sonuç olarak mitokondrinin oksidatif strese daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca proteinlerin karbonilasyonu sadece ROT ile indüklenmez aynı zamanda 4-hidroksi-2-noneal gibi kimi lipid peroksidasyon ürünleri ve şeker gliksidasyon ürünleri de proteinlerin karbonilasyonuna neden olmaktadır (Gill ve Tuteja., 2010).

### **1.5.3 Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri**

Serbest radikallerden kaynaklanan DNA hasarı Poli (ADP-riboz) sentetaz enzimini aktive eder. Bu enzimin aktive edilmesi DNA hasarının giderilmesine yardımcı olur. Ancak zararlanma çok fazlaysa, NAD<sup>+</sup> seviyesi, hücrenin normal fonksiyonlarını yerine getiremeyecek ve sonunda ölmesiyle sonuçlanacak seviyeye kadar düşer. Serbest radikallerin sebep olduğu zararlanma dokuya ve reaktif serbest radikal türüne göre değişir. Büyük ölçekte meydana gelen zararlanma hücrenin ölümüne sebep olabilir ve bu durum hücre zararının tipine bağlı olarak apoptozis veya nekrozis şeklinde olabilir. Hücre veya organel membranı serbest radikallerden zarar görürse, hücre koruyucu özelliklerini kaybeder ve bu durum bütün hücrenin hayatını riske atar (Sarma ve ark., 2010).

## **1.6 Antioksidanların Etki Mekanizması**

Reaktif serbest radikallerin kontrolsüz şekilde oluşumları hücre içinde birikerek hücrenin oksidatif strese girmesine yol açmaktadır. Bu yüzden hücreler ROT (Reaktif oksijen türleri) kaynaklı zarara karşı korunma sağlamak için savunma mekanizmasını devreye koyar. Bu mekanizmalardan biri de ROT oluşumunu kontrol altında tutan antioksidanlardır. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda bulunan ve okside olabilir maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddelerdir. Antioksidanlar kendi elektronlarını ROT'lara aktarabildikleri ve böylece bu türlerin zararlı etkilerini nötralize ettikleri için etkili bileşiklerdir. Genel olarak, antioksidanlar vücut içinde üç seviyede çalışırlar: (a) ROT oluşumunun önlenmesi veya minimum seviyede tutulması, (b) alfa tokoferol ve askorbik asit gibi katalitik ve katalitik olmayan moleküllerle reaktif türlerin süpürülmesi ve tutulması, (c) glutasyon gibi zarar görmüş hedef proteinlerin tamir edilmesidir. Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki temel sınıfta toplanırlar. Katalaz, süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz gibi enzimatik antioksidanlar vücutta bulunurlar ve reaktif türleri daha az etkili hale dönüştüren reaksiyonları katalizle ederek vücudun ilk savunma hattını oluştururlar. Hücre içinde bulunan düşük molekül ağırlığına sahip çeşitli moleküller ise organizmanın ikincil savunma hattını oluşturmaktadır. Bu moleküller ya direkt olarak reaktif türleri süpürürler ya da demir ve gümüş gibi redoks aktif metalleri alıkoyarak reaktif türlerin oluşumunu engellerler (Kunwar., 2011).

## **1.7 Antioksidan Türleri**

### **1.7.1 Enzim yapısındaki bazı antioksidanlar**

Süperoksit dismutaz (SOD) bütün anaerobik organizmalarda ve oksidatif strese meyilli olan bütün hücre içi bölgelerde yer alan en etkili hücre içi antioksidandır ve metalloenzim yapıdadır. Süperoksit dismutaz süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizler. Böylelikle çeşitli stres koşulları altında miktarında artış gözlemlenen reaktif türlerin zararlı etkisine karşı ilk savunma hattı oluşmaktadır.

Katalaz, hidrojen peroksiti direkt olarak su ve moleküler oksijene parçalama potansiyeline sahip tetramerik demir taşıyan bir enzimdir. Stres koşulları sırasında

oluşan reaktif türlerin zararlı etkilerinin giderilmesinde rol oynayan en önemli enzimlerden biridir. Lipit oksidasyonu, fotorespirasyon ve pürin katabolizması sonucu peroksizomlarda meydana gelen hidrojen peroksitlerin parçalanmasında etkilidirler.

Glutasyon redüktaz hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan flavo-protein yapıdaki oksiredüktazlardır. Glutasyon redüktazlar başlıca kloroplastta lokalize olmuşlardır ancak sitozol ve mitokondride de bir miktar bulunmaktadır. Glutasyon redüktazlar, okside glutasyonu glutasyona indirgeyen reaksiyonu katalize ederler (Gill ve Tuteja., 2010).

### 1.7.2 Enzim yapısında olmayan bazı antioksidanlar

C vitamini bütün canlı dokularda bulunur ve elektron verici bir antioksidandır. Bu özelliği bilinen bütün fonksiyonlarını açıklamaktadır. C vitamini reaktif türlerin oluşumunu engeller ya da bu türlerin sebep olduğu zararı en aza indirger. Elektron verici olarak C vitamini suda çözünür, ayrıca antioksidan etkisi *in vitro* da yapılmış birçok çalışmayla gösterilmiştir. Ayrıca C vitamini vücutta birçok tepkimenin gerçekleşmesi için de gereklidir (Padayatty ve ark., 2003).

E vitamini yağda çözünen ve vücut tarafından depo edilebilebilen bir vitamindir, bu yüzden de hergün tüketilmesine gerek yoktur. Özellikle fotosentetik ökaryotlar ve siyonobakter gibi oksijenik fotosentetik organizmalar tarafından çokça sentezlenir. Özellikle lipit peroksidasyonunu önlediği için bitkiler tarafından özellikle yağlı tohumlarda, meyvelerde ve aktif bölünme geçiren genç dokularda biriktirilir. E vitamini, biyolojik olarak alfa-tokoferol etkisi gösteren bütün tokol ve tokotrienol türevlerinin genel tanımlayıcısı olarak kullanılır. Tokoferol terimi yapısal olarak metil grubunun pozisyonuna göre değişen tokol türevleri için kullanılır ve  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ,  $-\delta$  tokoferol olmak üzere dört farklı isim alır. Tokoferollerin antioksidatif etkileri konsantrasyonlarına ve kimyasal yapılarına göre değişmektedir. Tokotrienol grupları da benzer şekilde  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$ ,  $-\delta$  tokotrienol olarak dört isim alır (Mukhopadhyay ve Ray., 2013).

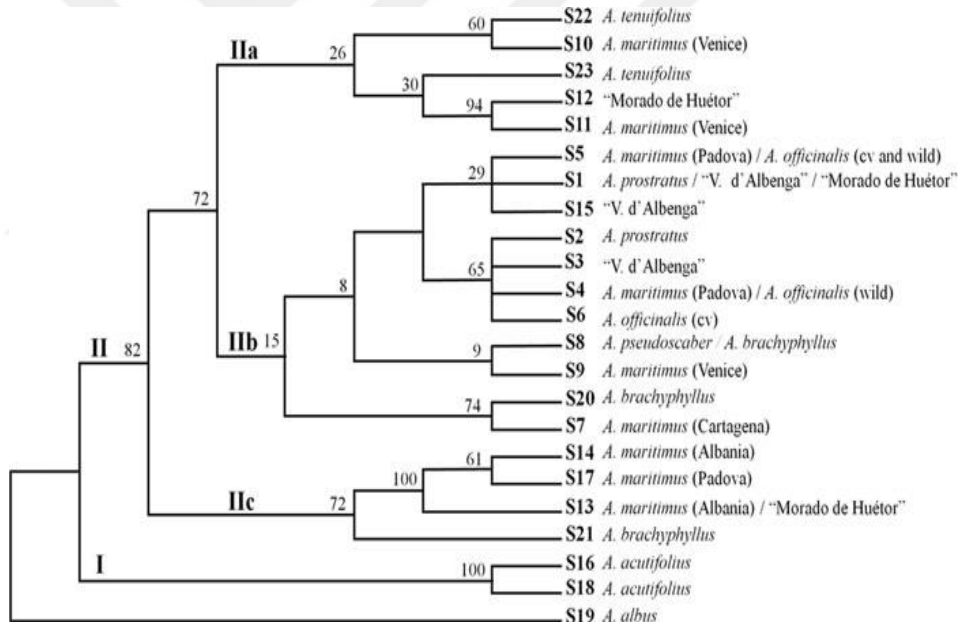


## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Moleküler Sistematik

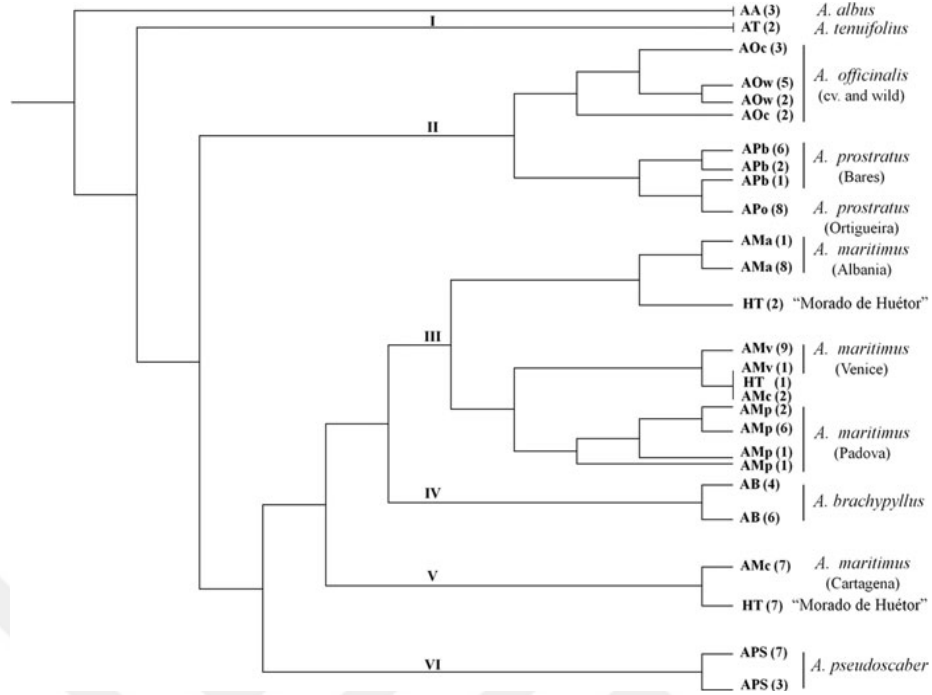
Uygun moleküler markırlar kullanmak, genotipleri birbirinden ayırt edebilme imkânını artırmaktadır (Iezzoni ve Brettin, 1998). Moleküler markır teknikleri direkt olarak DNA seviyesindeki değişiklikleri ölçer ve çevresel faktörlerden etkilenmemektedirler (Gerlach ve Stosser, 1998).

Castro ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada *Asparagus* cinsine ait sekiz türün *A. officinalis* ile olan genetik farklılığı ve filogenetik ilişkisi değerlendirmişlerdir. Bu amaçla ITS ve EST-SSR markırlar kullanılmışlar ve EST-SSR markır verilerinin kümeleme analizi ile bu türleri altı gruba ayırmış ve her bir popülasyonu başarıyla diğerinden ayırmışlardır (Şekil 2.1 ve 2.2).



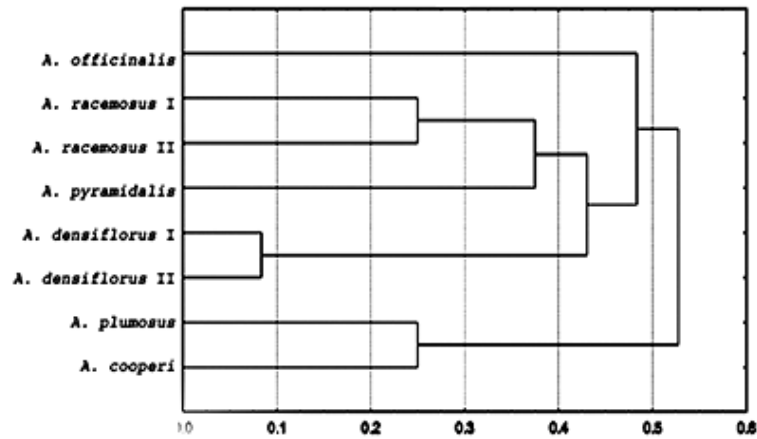
Şekil 2.1. *Asparagus* türlerinin ITS bölgesine dayalı konsensüs parsimoni ağacı (Castro ve ark., 2013)



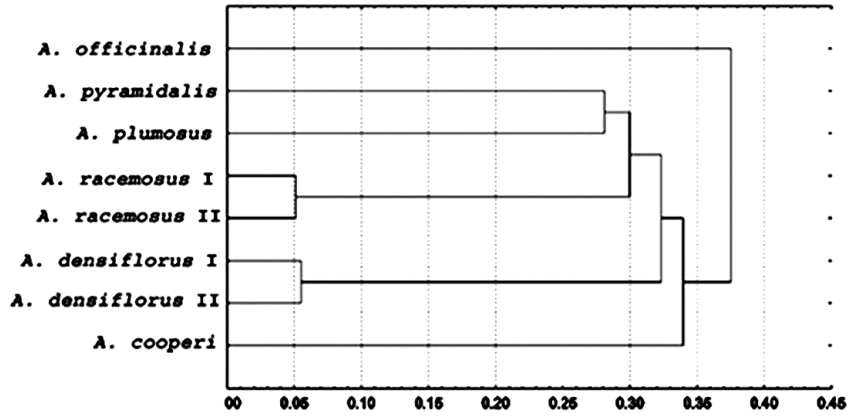


Şekil 2.2. EST-SSR Markırlar kullanılarak elde edilen *Asparagus* türlerine ait konsensüs dendrogram (Castro ve ark., 2013)

Mukhopadhyay ve Ray (2013) altı önemli *Asparagus* türünde, tür içi ve türler arası seviyedeki genetik ilişkiyi değerlendirmek amacıyla kromozomal karakteristikleri, 4C DNA içeriğini, SDS PAGE ve izozim polimorfizmini ve moleküler markörleri kullanmışlardır. Çalışma sonunda sitolojik ve markır tabanlı analizlerin kombine edilmesinin genetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli olduğunu tespit etmişlerdir.

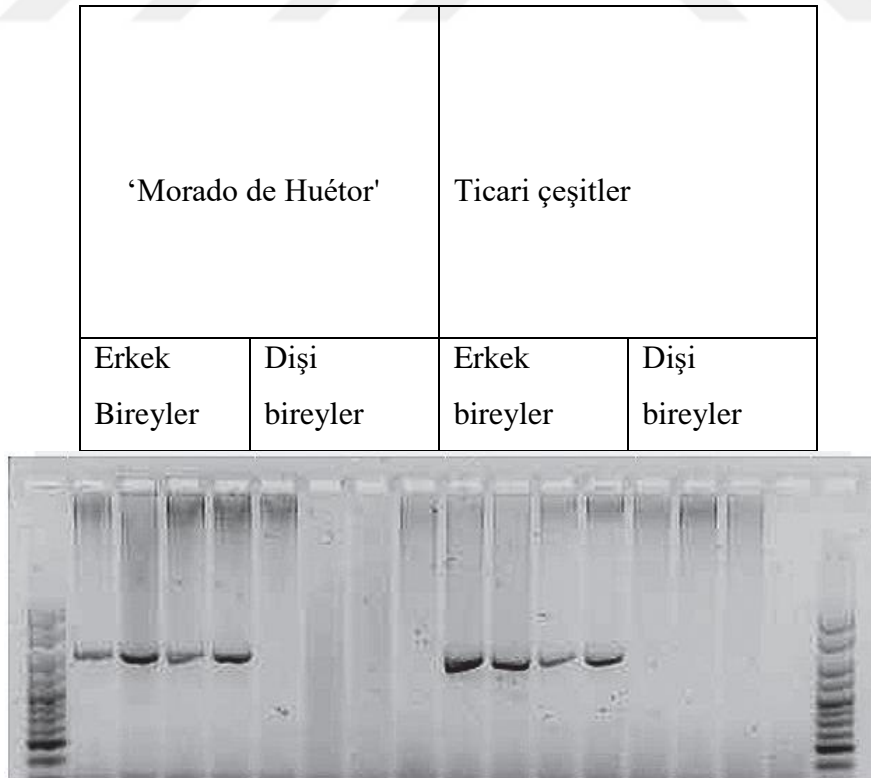


Şekil 2.3. İzozim polimorfizmi kullanılarak elde edilen dendrogram (Mukhopadhyay ve Ray., 2013)



Şekil 2.4. RAPD Markırlar kullanılarak elde edilen dendrogram (Mukhopadhyay ve Ray., 2013)

Regalado ve ark. (2014) yerel bir İspanyol asparagus çeşidinin (Morado de Huétor) andromonoik bitkilerinden tetraploid süper erkek üretmek için moleküler markırlar kullanmışlardır (Şekil 1). Bu amaçla Asp1-T7 markır kullanılmış olup çalışma sonunda farklı genotiplerin tespit edilmesini mümkün kılacak kodominant markırların geliştirilmesi için yeni çalışmaların yapılması gerektiği bildirilmiştir.



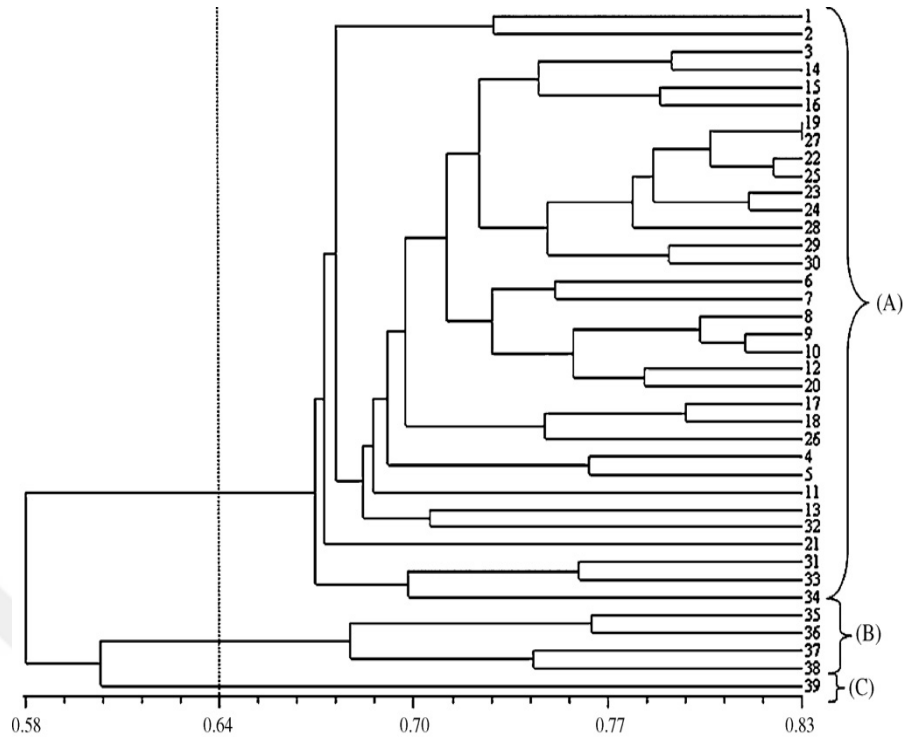
Şekil 2.5. Asp1-T7 Markırına ait amplifikasyon Görüntüsü (Regalado ve ark., 2014)

Caruso ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada çeşit tanımlaması ve genetik farklılığın değerlendirilmesi amacıyla EST-SSR markırlar kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan 23 primer çiftinden üçünde çoğalma ürünü görülmemiş ve çeşit seçimi amacıyla diğer primerlerden 11 tanesi seçilmiştir (Şekil 2.6). Çalışma sonunda STS-SSR markırların çeşit seçimi için uygun olmadığı rapor edilmiştir.

Marker name	M13 tail <sup>a</sup>	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Repeat	Unigene <sup>b</sup>	Annotation <sup>c</sup>
TC1	F	AGGTGGAGAACAATGGCTG	CGAGCTCAATTGAAATCCATAA	(TC)12	226771	CV291193.1
AG2	F	CCTCCTCGCAATTTAATCA	CAGCTGCATCACGTTCTTGT	(GA)9	226807	CV288285.1
AGA1	F	CCGGTGCCTTGATTACTGCT	GATCATCATCTTGCGCATTG	(AGA)11	226874	CV290795.1
TC2	F	GGCAGGATTAGGGTTTCG	TCTCGCTCACCTTCTCATCC	(GTC)5(TC)10	226919	CV289926.1
AAT1	F	CTTTGCTTCTGAACGCTCC	TTGAAGGAGCCGTAACCTGG	(AAT)9	226927	CV289873.1
AG3	F	TCCACCCACAAAAAGAAAG	AGAAGTTGACGCCGTTGTCT	(AG)10	227083	CV291890.1
TC3	F	CACCATTTCAAATCCCCTACT	GAGGCTAGAGCTCCGCTCAT	(AG)13	227097	CV291953.1
AG5	F	GATTAATAAAGCGCCGCTGA	ACATAAGCCCATACTTGCGG	(TC)18	227161	CV290218.1
AG6	F	TCATCTGAAATGGCATCAGC	CGAGGCCTAGTGTGTGTTGA	(GA)9	227226	DR067573.1
AG7	R	TTTTGCTCCGATCATTTC	CCTCTTCGCTTTCATCAGCC	(AG)10	227714	CV459406.1
TC4	R	AGAGAGGAAGTTGTCTGCTCG	TGGGAAAATGGAAGAACCAA	(CT)9	227794	CV458725.1
TC5	R	CCCGATCCAAACCCATCC	GAAAATTCGATCGGAACCCCT	(TC)9	227854	CV291194.1
AG8	R	GATTGGGACCAACACAAACA	AGCAATGACTTGATCCCCAG	(GA)9	228015	CV459870.1
TC6	R	CATGCCCTAAAATCTCCAAGA	GCCAGAGGCTGAAATAAACTG	(CT)9	228236	CV288771.1
TC7	R	CGCCCCGAATCAACTAATAA	TACTGCGGAGGTATGTGGGT	(TC)15	228260	CV458423.1
TC8	R	GGCTAGCCGAAAGAATCTCC	TCTTCCTCCTCCTCCTCCTC	(CT)10	228451	DT578769.1
AG10	R	CGCCCTTGTCTTCTTCTTIG	CAGTGTCTGCCGCTTCAA	(AG)9	228600	CV289447.1
AG11	R	AGGGGTCCGGATTAATTAC	GTCTTGGCCATTAGAGCTG	(AG)9	228633	CV288815.1
TC9	R	GTGATTCAAGGGGAAAGGT	TACACAAAACCAGAAGGGC	(TC)12	228729	CV291391.1
AG12	R	GACTAGCGCCATGAGAAAGG	TTTTAGGGCATTTTAAACGCAT	(AG)9	228961	CV290098.1

Şekil 2.6. Kuşkonmaz klonları F600 ve M256 için Amplifikasyon ürünü veren primerler (Caruso ve ark., 2008)

Sarabi ve ark. (2010) 39 yabancı İran kuşkonmaz popülasyonu arasındaki genetik farklılığı belirlemek amacıyla morfolojik yöntemler ve RAPD markırlar kullanmışlardır. Genetik benzerlik oranı 0.79 ile 0.21 arasında çıkmış ve 0.64 benzerlik seviyesinde popülasyonlar sırasıyla otuz dört, dört ve bir popülasyon içeren üç alt kümeye ayrılmışlardır (Şekil 2.7). Morfolojik karakteristiklerin ortalama değerlerine dayalı Ward metodunun kullanıldığı faktör analizi dört grupta sonuçlanan yedi temel faktörü ortaya koymuştur.



**Şekil 2.7.** 18 adet RAPD Decamer primerine dayalı 39 Kuşkonmaz genotipine ait UPGMA dendoğramı (Sarabi ve ark., 2010)

Stajner ve ark. (2002) ekonomik olarak önemli olan ve *Asparagus* cinsine ait olan on tür arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek için genom boyut analizlerini ve rDNA ITS polimorfizmini kullanmışlardır. Tür seçimi yapılırken ekonomik önemleri ve *Asparagus officinalis* ile melezlenebilme olasılıkları dikkate alınmıştır. Genom boyutunun akış sitometrik ölçümleri iki farklı grubu ortaya koyarken rDNA ITS analizleri grupları birbirinden ayırmada başarılı olmuştur.

Dokuz *Protasparagus* taksonunda rDNA ITS, cpDNA trnl intron sekansına ve kladod karakteristiklerine dayalı moleküler filogenetik bir çalışma yürütülmüş olup rDNA ve cpDNA moleküler filogenilerinin *Protasparagus* alt cinsinin kladod karakteristikleri ile tam bir uyum içinde olduğu gösterilerek, Monofiletik alt cins *Protasparagus* dört farklı gruba ayrılmıştır (Saha ve ark., 2014).

*Asparagus* cinsinin evrimleşme geçmişini daha fazla aydınlatmak ve birbirleri ile melezlenen türler arasındaki genetik benzerlik ilişkisini anlamak ve için yürütülen çalışma neticesinde bu cinsin Güney Afrika kökenli olduğu ve daha sonra eski dünyaya yayıldığı gösterilmiş, ayrıca dioik türlerin evrimsel süreç sonunda hermafrodit türlerden oluştuğunu göstermiştir (Kubota ve ark., 2012).

Dioik olduğu bilinen *Asparagus officinalis*'in erkek bireyleri yüksek verimlerinden dolayı daha fazla tercih edilmektedir. Bu yüzden tarımı yapılan kuşkonmaz bireyleri arasında erkek bireylerin oranını artırmak ve ıslahını geliştirmek amacıyla erkek ve dişi bireyleri ayırt edecek moleküler markırların geliştirilmesi için yapılan bir çalışmada test edilen 188 primerden, T35R54 primeri sadece erkek bireylerde gözlemlenen 1600 bp boyutunda bir bant üretilmiştir. Bu markırın spesifikliğı bir süper erkek (YY) ve bir dişi (XX) ıslah hattı ile bunların dört yavru dölü kullanılarak doğrulanmış olup, bu markır (T35R54) hem süper erkeklerde hem de tamamı erkek olan hatlarda gözlemlenmiştir (Kanno ve ark., 2014).

Altı *Asparagus* türü arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için yapılan bir çalışmada 20 RAPD, 6 ISSR ve 2 izozim enzimi kullanılmıştır. Oluşturulan RAPD ve ISSR dizileri tür ve popülasyon seviyesinde yüksek farklılık göstermiş olup; RAPD, ISSR ve izozim enzimlerinden oluşturulan UPGMA küme analizi ve karesi alınmış öklid matriksi (Squared Euclidean matrix) verileri bu *Asparagus* türleri arasındaki farklı ilişkileri ortaya koymuştur (Ray ve ark., 2010).

### **2.1.1. Antioksidan aktivite tayini**

Katı-sıvı ekstraksiyon ile antioksidan bileşikler elde etmek için yapılan bir çalışmada materyal olarak kuşkonmaz artıkları kullanılmıştır. Ekstraksiyon çözücülerini, zaman, sıcaklık, toplam fenolik içeriğindeki katı-sıvı oranı, toplam fenolik ve toplam antioksidan aktivite dâhil farklı ekstraksiyon parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Araştırma sonuçları ekstraksiyon veriminin; çözücünün bileşimi, ekstraksiyon süresi ve sıcaklıktan önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca ekstraktın antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi, fenolik bileşiklerin ve flavanoidlerin baskın biyoaktif unsurlar olduğunu ortaya koymuştur (Fan ve ark., 2015).

Lee ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *Asparagus officinalis*'te; antioksidan aktivite, biyoaktif bileşikler ve sürgün verimini etkileyen uygun hasat zamanı tespit edilmeye çalışılmıştır. Sürgünler sürdükten sonraki ikinci, dördüncü ve altıncı haftada hasat edilmiştir. Çalışma sonunda toplam sürgün sayısı, ortalama ağırlık, ortalama yarıçap ve toplam verim uzun süren hasat periyoduyla birlikte artmıştır. Biyoaktif bileşenler ve antioksidan aktivite analizleri incelenen örneklerde önemli

ölçüde farklılık göstermiştir ve altı haftalık hasat periyodunda en yüksek sürgün verimi elde edilmiştir.

Ekstraksiyon metodunun fitokimyasal bileşim ve antioksidan içerik üzerine etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada materyal olarak kuşkonmaz bitkisinden elde edilen diyet lifleri kullanılmıştır. Bu çalışmada uygulama yoğunluğu, solvent çeşidi ve kurutma sistemi gibi faktörler çalışılmıştır. Bu fitokimyasallar arasında hidroksisinnamik asit, saponinler, flavanoidler ve fruktanlar ölçülmüştür. Hidroksisinnamik asit içeriği 2.31 ve 4.91 mg/g arasında değişmiş ve içeriğin kullanılan kurutma sisteminden ve bazende kullanılan solventten etkilendiği rapor edilmiştir. Saponin içeriği 2.14 ile 3.64 mg/g arasında değişmiştir. Flavanoid içeriği süreç koşullarından oldukça etkilenmiş ve kullanılan üç örneğin sadece birinde bulunmuştur. İşleme sürecinde yapılan sürekli karıştırma işleminin bu durumun temel sebebi olabileceği bildirilmiştir. Steroller ve fruktanlar eser miktarda (sırasıyla 0.63–1.03 mg/g ve 0.2–1.4 mg/g) bulunmuştur (Alventosa ve ark., 2009).

Solvent olarak suyun kullanıldığı bir çalışmada antioksidan ve antotrizonaz aktivitesi incelenmiştir. Kuşkonmazın IC50 değeri (1.21 mg/ml) ile trizonazı inhibe ettiği bildirilmiştir. 0.05–1 mg/ml seviyesinde, ekstraktın B16 hücrelerindeki trizonaz aktivite üzerine inhibe edici etkisinin artan konsantrasyonla birlikte bir artış kaydettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca B16 hücrelerindeki glutasyon seviyesinin kontrole kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir, 0.1–0.5 mg/ml seviyelerinde, radikal süpürme, şelatlama ve oksidatif strese karşı lipozomun korunması gibi aktiviteleri önlediği bildirilmiştir. HPLC (The high performance liquid chromatography) analizleri ekstraktın içerisinde quersetin, rutin, kaempferol ve izorhamnetin bulunduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2011).

Maro ve ark. (2013)'ün yaptıkları çalışmada yabani kuşkonmazın besin özellikleri, antioksidatif etkileri, proliferatif özellikleri ve kimyasal bileşimini belirlemeye çalışılmışlardır. Esansiyel ve esansiyel olmayan protein aminoasitlerinin yanı sıra makro besin elementleri (protein, karbonhidrat ve lipitler) belirlenmiştir. Ayrıca total fenolik ve total flavanoid içeriği belirlenmiştir. Fruktoz en yaygın şeker olarak bulunmuştur. Lipofilik (CHCl<sub>3</sub>) ekstrakt ve metil alkol (MeOH) kullanılarak antioksidan taraması yapılmış ve analiz edilen ekstraktaki ABTS ve DPPH, FRAB radikal süpürme aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Kullanılan

solventler arasında izoquersetin ve rutin açısından zengin olan alkol ekstraktı yüksek oranda radikal süpürme ve antioksidatif aktivite göstermiştir.

Hildah ve Mashele (2014) yaptıkları çalışmada *Asparagus larycinus*'un fitokimyasal içeriğini belirlemek, antibakteriyal ve antioksidatif etkilerini incelemek amacıyla yaprak ve köklerden elde edilen ekstraktları kullanmışlardır. Antibakteriyal etkiyi incelemek için agar dilüsyon yöntemi kullanılmış, ayrıca antioksidan aktivite tayini için DPPH yöntemi kullanılmıştır. Yaprak ekstraktının *S. saprophyticus*' e karşı minimum inhibe edici konsantrasyonu 0.125 mg/mL, *S. aureus* ve *B. subtilis*' e karşı ise 1 mg/mL olarak bulunmuştur. Yaprak ekstraktı önemli ölçüde (72.1%) radikal süpürme etkinliği göstermiştir. Bu bitki ekstraktlarının kalitatif analizleri tanin, saponin, flavanoid ve filobatannin gibi bileşiklerin varlığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak *Asparagus larycinus* yaprak ekstraktlarının, potansiyel antimikrobiyal ve antioksidatif etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir.

Potduang ve ark (2008) kurutulmuş ve toz haline getirilmiş asparagus köklerinden etanol kullanılarak hazırlanan ekstraktın sitotoksik, antimikrobiyal, tirozinaz ve antioksidan etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonunda Brine shrimp değeri için LC<sub>50</sub> değeri 2189.49 µg/ml, DPPH radikal süpürme değeri için LC<sub>50</sub> değeri 381.91 µg/ml, tirozinaz inhibüsyon etkisi için IC<sub>50</sub> değeri 7.98 mg/ml olarak bulunmuştur. Agar dilüsyon yöntemi kullanılarak, ekstraktın 5-20 mg/ml seviyesinde çeşitli patojen mikrobiyalere karşı etkili olduğu bulunmuştur, ayrıca bu değer enteropatojenler için 10-20 mg/ml, dermatopatojenler için 5-20 mg/ml olarak hesaplanmıştır. HPLC analizleri steroidlerin, alkaloidlerin, terpenlerin ve flavanoidlerin varlığını göstermiştir.

Khorasani ve ark. (2010) *in vitro* ve *in vivo* ortamda yetiştirilen kuşkonmazları (*Asparagus officinalis* cv. Mary Washington) antioksidan ve antimikrobiyal etkileri açısından kıyaslamışlardır. Çözücü olarak etanolün kullanıldığı çalışmada süperoksit dismutaz, DPPH gibi serbest radikal süpürücü yöntemler kullanılmıştır. En yüksek antioksidan aktivite *in vivo* ortamda yetişen bitkilerden elde edilmiştir.

Sekiz farklı kuşkonmaz çeşidinin antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla üç farklı metod kullanılmıştır (FRAP, antiradikal aktivite ve primer oksidasyonun inhibüsyonu). Ayrıca antioksidan aktivite ve total fenolik içerik arasındaki korelasyon incelenmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan modifiye metodları doğrulamak amacıyla altı standart test edilmiştir. Antiradikal

aktivite ve FRAP metodlarından elde edilen sonuçlar birbirine çok benzer çıkmış ve fenolik içerik ile aralarında yüksek bir korrelasyon bulunmuştur. Örnek orijininin önemli bulunduğu çalışmada, Hueter-Tajar sürgünleri Alcala del Rio sürgünlerinin hem antiradikal aktivite hem de primer oksidasyonun inhibisyonu açısından daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı orijine sahip sürgünler arasında önemli farklılıklar bulunması sonucu genetik faktörlerin göz önünde bulundurulması gerektiği ileri sürülmüştür. Kuşkonmazların lipit peroksidasyonunu önlediği bulunmuş, ancak fenolik içerikle inhibisyon yüzdesi arasında bir korelasyon gözlenmemiştir (Rodriguez ve ark., 2005).

Acharya ve ark, (2012) *Asparagus rasemosus* köklerinden farklı solventler kullanılarak hazırlanan ekstraktları antioksidatif ve hepatoprotektif etkilerine göre kıyaslamışlardır. Çalışmada solvent olarak hidro-alkol (CE), metanol (MF), etil asetat (EF), n-bütanol (BF) ve su kullanılmıştır (PAF). Çalışma sonunda DPPH serbest radikal süpürme aktivitelerine göre ekstraktlar sırasıyla EF > MF > CF > BF > PAF şeklinde sıralanmışlar, ayrıca demir kaynaklı lipit peroksidasyonu için yapılan analizlerde de benzer sonuçlar gözlemlenmiştir, sadece PAF ekstrakt aktivitesi BF'den daha yüksek çıkmıştır.

Hasat öncesi (hasat zamanı, sürgün yarıçapı, sürgün büyüklüğü ve rengi), hasat sonrası (depolama ve işleme) ve genetik faktörlerin total fenolik, flavonoid ve askorbik asit içeriği üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada materyal olarak beyaz kuşkonmaz sürgünleri kullanılmıştır. Sonuçlar genetik faktörlerin total fenolik içeriği üzerine önemli etkisi bulunduğunu ancak hasat zamanı, sürgün yarıçapı ve depolamanın çok önemli olmadığını göstermiştir. Mor sürgün uçları ve sürgün üst kısımlarında diğer kısımlara oranla daha fazla total fenolik maddeye rastlanmıştır. Pişirme işlemi hem taze hem de depo edilmiş kuşkonmazlarda total fenolik miktarını azaltırken, kabuk soyma işlemi taze kuşkonmazda total fenolik içeriğini etkilememiş ancak depo edilmiş kuşkonmazlarda azaltmıştır (Papoulias ve ark., 2009).





### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bitki materyallerinin toplanması**

Çalışmada kullanılan bitki materyalleri Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr Süleyman Mesut Pınar ve tarafımızdan taksonların yayılış alanlarından toplanmıştır.

##### **3.1.2.1. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar**

###### **3.1.2.1.1. CTAB yöntemi ile yapılan dna izolasyonu kimyasalları**

DNA izolasyonu, Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen, Karaca ve ark. (2005) tarafından modifiye edilen CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) metodu uyarlanarak yapılmıştır. İzolasyon sırasında kullanılan tüm kimyasallar tablo 3.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** CTAB Metoduyla yapılan DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar

Çözelti	Kompozisyonu
Ekstraksiyon tamponu	0.35 M sorbitol, 100 mM Tris-HCl (pH: 7.5), 5 mM EDTA (pH:7.5), %2 Tween, %1 Triton-X, %1 BME
Lizis tamponu	200 mM Tris-HCl (pH:8.0), 50 mM EDTA (pH:8.0), 2M NaCl, %2 PPVP, %2 CTAB, %2 Triton-X, %2 BME
LiCl	8.0 M
SLS	%20
CIS	Cloroform:İzomil alkol-24:1
İzopropanol	%100
NaCl	5.0 M
TE (Tris-EDTA)	pH:7.5
RNase	10 mg / mL
NaAc	3.0 M, (pH:5.2)
KAc	2.0 M, (pH:5.5)
Etanol	%100
TE (Tris-EDTA)	pH:8.0

### 3.1.2.2. PZR'de kullanılan kimyasallar ve özellikleri

**Tablo 3.2.** PZR'de Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Primer	Nükleotid Dizisi	Tm Değeri
ITS-4	CCTTATCATTAGAGGAAGGAG	52.1 °C
ITS-5A	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49.9 °C
<i>trnL<sub>f</sub></i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	52.8 °C
<i>trnL<sub>e</sub></i>	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	54.4 °C

**Tablo 3.3.** PZR'de Kullanılan Kimyasallar

Kimyasalın adı	Miktarı	Konsantrasyon
Kalıp	4 µL	
Primer F	1.2 µL	pmol/ml
Primer R	1.2 µL	pmol/ml
dNTP	1 µL	10 mM
Taq	0.7 µL	
Taq Tampon	5 µL	10 X
MgCl <sub>2</sub>	6 µL	25 mM
BSA	2 µL	
dH <sub>2</sub> O	29,3 µL	
<b>Toplam</b>	<b>50 µL</b>	

### 3.1.2.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar

Agaroz jel elektroforezinde 1X'lik TBE kullanılır. 1X'lik TBE hazırlamak için 5X TBE tamponu seyreltilir. 5X TBE Tamponun hazırlanışı Tablo 3.4'te verilmiştir.

**Tablo 3.4.** 5 X TBE çözeltisinin hazırlanışı

Kimyasalın Adı	Miktarı
Tris-Baze	108 g
Borik Asit	55 g
0.5M pH:8 EDTA	40 ml
Saf Su	1 L

#### **3.1.2.4. Antioksidan aktivite tayininde kullanılan kimyasallar**

Bu çalışmada kullanılan Folin reaktifi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•) Sigma-Aldrich firmasından ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, gallik asit, FeCl<sub>3</sub>, troloks, α-tokoferol Merck firmasından temin edilmiştir.

### **3.2. Metot**

#### **3.2.1. Bitkilerden genomik DNA izolasyonu**

##### **3.2.1.1. CTAB protokolü**

1. Yaklaşık olarak 0.5 g yaprak örneği sıvı azot kullanılarak porselen havanlarda ezildi.
2. 2 ml'lik tüpe alınmış 0,2 gr ( yaklaşık 200 µl) ezilmiş doku üzerine 1000 µl EB çözeltisi eklenerek 3-5 dk vortekslenildikten sonra 10000 rpm de 10 dk çöktürüldü.
3. Çöktürme işleminden sonra üst faz dikkatlice dökülerek kalan pellet üzerine 350 ul LB çözeltisi eklenerek iyice vortexlendikten sonra bunun üzerine 350 ul (8.0 M) LiCl eklenip tekrar vortexlenerek iyice karıştırılması sağlandı.
4. İyice vortexlendikten sonra 40 ul %20 SLS çözeltisi eklenip 65 °C deki su banyosunda 40 dk bekletildi (her 10 dk da bir 45 sn vortex yapıldı).
5. Su banyosundan alınan örnekleri buz üzerinde soğuttuktan sonra üzerine daha önce hazırlanmış CIS ( Cloroform:İzomil alkol-24:1) 1:1 (yaklaşık 740 ul) oranında katılarak hafifçe karıştırıp 10000g de 10 dk spinlendi. (bu aşamada 3 faz oluştu en üst faz dikkatlice alına bildiği kadar alındı (yaklaşık 450-600 ul).
6. Alınan süpernatant kadar üzerine tekrar CIS ekleyip 10000g de 5 dk spinlendi. Spinden sonra üst faz dikkatlice alınıp, alınan hacim kadar üzerine izopropanol ve final hacmin 1/20 si kadar 5M NaCl ekleyip -20 °C de 18-20 saat bekletildi (bu aşamada Nükleik asit görüldü).
7. -20 °C den alınan örnekler 10000 g de 5 dk spinlendikten sonra üst faz dikkatlice dökülüp pellet 390 ul TE (pH:7.5) çözümlü üzerine 10 ul RNase ekleyip 37 °C de 30 dk bekletildi.

8. Daha sonra örnekler 37 °C den alınıp üzerine 40 ul 3M lık NaAc (pH:5.2) ekleyip bunun üzerine 3 kat (1320 ul) % 100 etanol ekleyerek 10000g de 5 dk spinlendi.
9. Spinden sonra üst faz dikkatlice döktükten sonra pellet 200 ul TE (pH:8.0, 65 °C) ekleyerek pellet iyice çözüldükten sonra bunun üzerine 40 ul 2M lık KAc (pH:5.5) ekleyerek bunun üzerine 660 ul % 100 etanol ekleyerek 10000g de 5 dk spinlendi.
10. Spinden sonra etanol iyice uzaklaştırılıp pellet 100 ul TE (pH:8.0) çözümlenerek +4 veya -20 °C de sonraki çalışmalar için saklandı.

### 3.2.2. PZR protokolü

PZR Toplam reaksiyon hacmi 50 ul olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla 25 mM MgCl<sub>2</sub>'den 6 µL, 10 mM dNTP' den 1 µL, 50 pmol/µ,lik primerlerden 2 µL, Taq DNA Polimeraz'dan 0.7 µL, Taq tamponundan 5 µL, BSA'dan 2 µL, kalıp DNA'dan 4 µL, dH<sub>2</sub>O'dan 29,3 µL alınarak toplam hacim 50 µL olarak ayarlandı. Çalışma boyunca PZR bileşenleri buz üzerinde muhafaza edildi. Ayrıca PZR çalışmaları boyunca kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için negatif kontroller kullanıldı.

**Tablo 3.5.** ITS Primeri İçin Kullanılan PZR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 °C	10 dk	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	1 dk	35 döngü
Bağlanma	51 °C	1 dk	
Uzama	72 °C	2 dk	
Final Uzama	72 °C	10 dk	1 döngü
Final Hold	4 °C	25 sa	

**Tablo 3.6.** *trnL-F* Primeri İçin Kullanılan PZR Programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95 °C	7 dak	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	1 dak	35 döngü
Annealing	52 °C	1 dak	
Extension	72 °C	2 dak	
Final Extension	72 °C	10 dak	1 döngü
Final Hold	4 °C	25 sa	

### 3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

PZR sonucunda oluşan bantları gözlemlemek ve genomik DNA izolasyonu sonuçlarına bakmak amacıyla sırasıyla %1,5'lük ve %1'lik agaroz jel elektroforezi hazırlanmıştır. Bu amaçla sırasıyla 0,6 gr ve 0,8 gr agaroz jel tartıldı ve 40 ml 1 X TBE tamponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım 50°C'ye soğutulmuş içerisine 3 µL Etidyum Bromür boyası ilave edildi. Tampon, daha önceden hazırlanmış olan jel kâsesi içine dökülüp polimerleşmesi için yaklaşık 15 dk beklendi. Ardından taraklar yerinden çıkarılıp elektroforez tankına yerleştirildi. 10 µL PZR ürünü ve 3 µL yükleme boyası karıştırılarak mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Oluşan bant büyüklüğünü gözlemlemek için 7 µL su, 3 µL yükleme boyası ve 1,5 µL DNA markırı karıştırılarak kuyucuğa yüklendi. Örnekler 90 voltta 30 dk yürütüldü. Daha sonra jel görüntüleme cihazına alınıp UV ışığı altında bilgisayar programı yardımıyla görüntülendi ve fotoğrafı çekilip kaydedildi.

### 3.2.4. Dizi analizi

Çeşitli primerler kullanılarak çoğaltılan bölgelerin DNA dizilerini elde etmek için PZR ürünleri İONTEK firmasına gönderildi. Dizilerin işlenmesi için BioEdit sequencher bilgisayar programı kullanıldı. DNA dizileri bu programda işlenerek konsensüs dizileri oluşturuldu. Daha sonra bu diziler Word'e kopyalandı ve fasta formatına getirilerek dizi hizalanması için hazır hale getirildi. Dizilerin hizalanması amacıyla ClustalW programı kullanıldı. Word'e kopyalanan diziler ClustalW programına yapıştırıldı ve dizi hizalanması gerçekleştirildi.

### 3.2.5. Filogenetik analiz

Dizileri hizalanan *Asparagus* cinsine ait türlerin akrabalık ilişkilerini öğrenebilmek için MEGA6 bilgisayar programı kullanıldı. Phylogeny penceresi açılarak Construct/Test Neighbor-joining Tree sekmesi seçildi ve istenilen ağaç kriterleri oluşturularak MEG formatındaki verilerden filogenetik ağaç oluşturuldu. Filogenetik ağaç oluşturmada mesafe temelli yöntemlerden Neighbour Joining (NJ) yöntemi kullanıldı.

### 3.2.6. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Bitki ekstraktlarının hazırlanması için toplanan örneklerin taze yaprak kısımlarından faydalanılmıştır. Bu amaçla yapraklar gölgede kurutuldu, akabinde parçalayıcı yardımıyla daha küçük parçalara ayrıldı. Farklı çözümler kullanılarak fraksiyonlama amaçlandı. Bunun için;

1. Kuru örneklerden 2 gram alınarak 50 ml'lik falkon tüplere aktarıldı.
2. Üzerlerine daha önceden hazırlanan karışımdan (%80 aseton + %19 su + %1 HCl) 20 ml ilave edildi.
3. Homojenizatör (2 dak.) ve sonikatör (3 dak.) kullanılarak örneklerin homojenize edildi.
4. Daha sonra 3 saat boyunca çalkalayıcıda bekletildi.
5. Daha sonra 10000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı dikkatlice alındı.
6. Kalan kısma sırasıyla etanol ve su eklenerek aynı işlemler tekrarlandı.
7. Ekstraktlar daha sonraki çalışmalar için +4 °C de saklandı.

### 3.2.7. Toplam fenolik madde konsantrasyonu

Bitki ekstraktlarının total fenolik bileşik tayini Folin-Ciocalteu (FCR,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{Na}_2\text{WO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$ ) reaktifi ile Slinkard ve Singleton (1977) (Su ve ark. 2007) metoduna göre yapıldı. Her bir ekstrakttan 100 µl alınıp 50 ml'lik balon jöjelere konuldu, ardından 46 ml deiyonize su ilave edildi. Daha sonra 1 ml FCR eklendi ve 3 dk. beklendi. Son olarak 3 ml %2'lik Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ilave edildi ve karışım 2 saat bekletildikten sonra 760 nm'de absorbanslar okundu. Kör numune, 1 ml FCR üzerine, 3



ml % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklendi ve 50 ml'ye kadar distile su ile seyreltilerek hazırlanırken standart ise (gallik asit), 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml ve 1 mg/ml'lik çözeltileri ile hazırlandı.

Deneyin prensibi: fenolik bileşik miktar tayini için FCR kullanılmıştır. Ortamda fenolik maddenin bulunması durumunda FCR ilavesiyle 760 nm'de maksimum absorban veren ürünler oluşmaktadır. Absorbanstaki artış fenolik madde miktarıyla orantılıdır. Seyreltilmiş ekstrakttaki fenolik madde miktar tayini standart gallik asit grafiğinden elde edilen oranlarla gallik asit eşdeğerlikli olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$(R^2 = 0.995)$$

$$\text{Absorbans} = 0.001 \times \text{Total fenol [gallik asit eş değerlikli } (\mu\text{g})] - 0.0154.$$

### 3.2.8. Toplam flavanoid madde konsantrasyonu

Bitki ekstraktlarının total flavonoid madde ekstraksiyonu Chang ve ark., (2002)'ye göre belirlendi. Bu amaçla 1 ml ekstrakt üzerine 400 µl aseton eklendi. Daha sonra 30 µl NaNO<sub>2</sub> eklenip 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 30 µl % 10'luk AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O eklenip 6 dakika daha oda sıcaklığında bekletilip çalkalandı. Sonra 400 µl NaOH (1M) eklenip 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Kör için ekstrakt yerine 5 ml aseton kullanılıp diğer işlemler aynı şekilde yapıldı. Standart ise (Rutin), 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml ve 1 mg/ml'lik çözeltileri ile hazırlandı. Tüm işlemler etanol ve su için tekrarlandı.

### 3.2.9. Demir (III) indirgeme kapasitesi (FRAP) tayini

Bitki ekstraktlarının indirgeyici gücü Oyaizu, (1986)'ya göre belirlendi. Bitkilerin etki derecesine göre hazırlanacak farklı bitki ekstraktlarının çözeltileri (1ml) üzerine 2.5 ml 200 mM potasyum hidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) tamponu (pH: 6.6) ve %1'lik 2.5 ml potasyum ferrisiyanür (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) çözeltileri ilave edilerek 50°C'de 20 dakika etüvde bekletildi. Etüvden çıkartılan çözeltilerin üzerine 2.5 ml %10'luk TCA ilave edilip çözeltiler 200g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjlenen çözeltilerin süpernatant kısmından (üstte kalan faz) 2.5 ml alınıp, üzerine 2.5 ml distile su ve 0.5 ml % 0,1'lik FeCl<sub>3</sub> (ferric chloride) çözeltisi konuldu ve UV-Vis spektroskopisi kullanılarak 700 nm'de numunelerin absorbanları ölçüldü. Pozitif kontrol amacıyla

Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA),  $\alpha$ - tokoferol ( $\alpha$ -Tok) ve bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) gibi standartlara da aynı işlemler uygulandı. Deneyde, kör olarak kullanılan çözeltili bitki ekstraktı ve  $FeCl_3$  hariç diğer bütün işlemler aynen uygulanarak hazırlandı.

Deneyin prensibi; Başlangıçta oluşan  $Fe^{3+}$ - ferrisiyanid kompleksi sarı renkte bir solüsyon oluşumuna neden olmakta ortamdaki antioksidanlar ferrisiyanid kompleksine elektron vererek bu bileşiği indirgemekte ve  $Fe^{2+}$ -ferrosiyaniür oluşumuna neden olmakta solüsyonun yeşil ve mavinin farklı tonlarına dönüşmesine yol açmakta ve 700 nm'de maksimum absorbanans vermektedirler. Ortamdaki antioksidanların varlığı ve indirgeyici güçlerine bağlı olarak 700 nm'deki absorbanans değerinin artması indirgeyici gücün göstergesidir.

### **3.2.10. Serbest radikal (DPPH) giderme aktivitesi**

Bitki ekstraktlarının DPPH radikali söndürme aktiviteleri Blois (2002) metoduna göre yapıldı. Bu test için her bir tüpe 0.1 mM DPPH' ın farklı çözeltilerinden 1'er ml alınarak, 3 ml'lik farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının üzerine ilave edildi ve tüpler hızlı bir şekilde sallandıktan sonra karanlıkta 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Absorbanslar 517 nm'de ölçüldü. Kör için 1 ml DPPH üzerine 3 ml etil alkol konulup, kontrol için ise DPPH çözeltisi kullanıldı.

Deneyin prensibi; Hazırlanan DPPH çözeltisi 517 nm'de maksimum absorbanans gösteren koyu mor bir renk oluşturur. Bu DPPH çözeltisine antioksidan madde veya maddeler içeren bir solüsyon katıldığında bu koyu mor renk zamanla rengini kaybetmeye başlar. Bu da antioksidan maddelerin DPPH radikalini söndürdüğünün kanıtıdır. Bu işlemi de ya ondan hidrojen atomu kopararak ya da ona elektron vererek gerçekleştirirler. Böylelikle onları renksiz ve ağartılmış moleküller haline getirirler. (2,2-difenil-1-hidrazin veya hidrazinin farklı analogları). Bu da 517 nm'de absorbanans değerinin azalmasına yol açar. Absorbans değerindeki en hızlı azalma en iyi antioksidan potansiyelinin göstergesidir. DPPH serbest radikali süpürme yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Yüzde inhibisyon} = (AK - A1) / AK \times 100$$

(AK: Kontrol Absorbansı, A1: Numune Absorbansı)

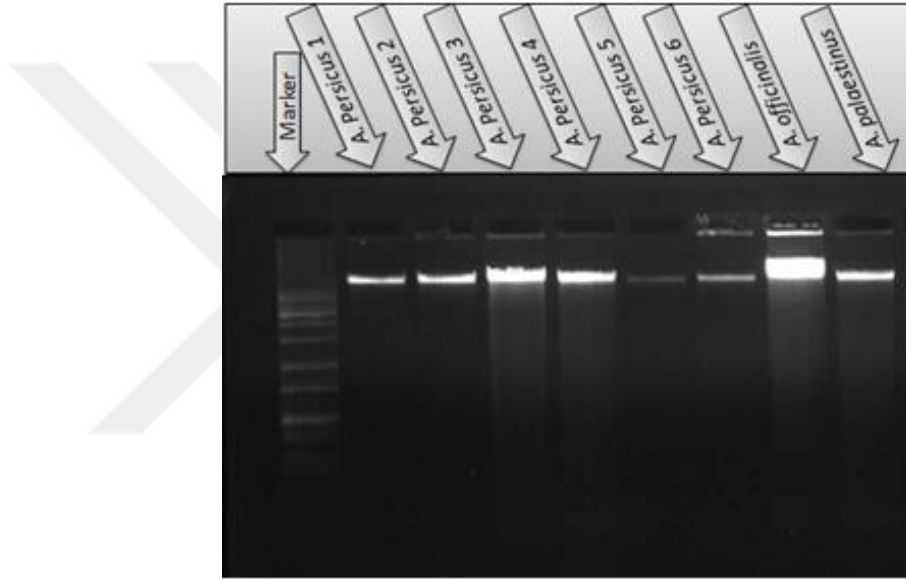


## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Moleküler Çalışmalar

#### 4.1.1 DNA ekstraksiyon çalışmaları

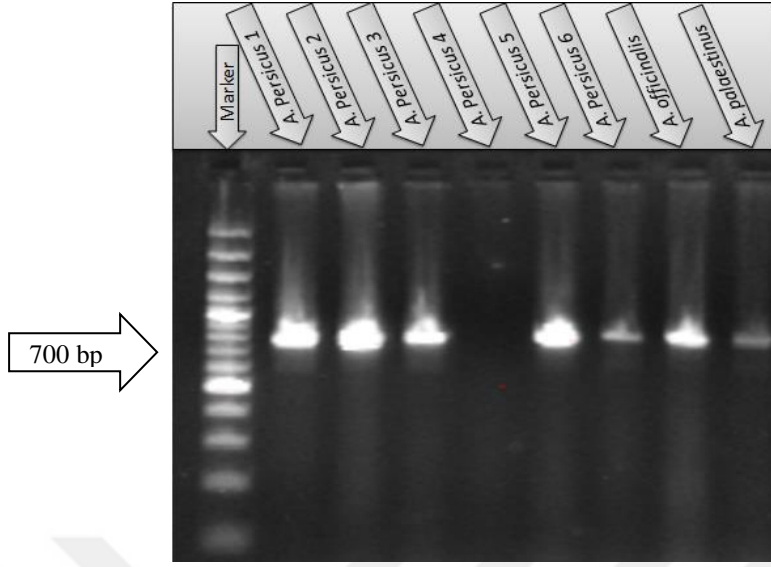
DNA izolasyonu, Doyle and Doyle (1987) tarafından geliştirilen ve Karaca ve ark (2005) tarafından modifiye edilen CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) metoduna göre yapılmıştır. Agaroz-Jel ile yapılan DNA kalite tespit çalışmasında PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) için yeterli DNA'nın elde edildiği saptanmıştır. *Asparagus* türlerine ait gDNA'larının (genomik DNA) agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de olduğu gibi elde sunulmuştur.



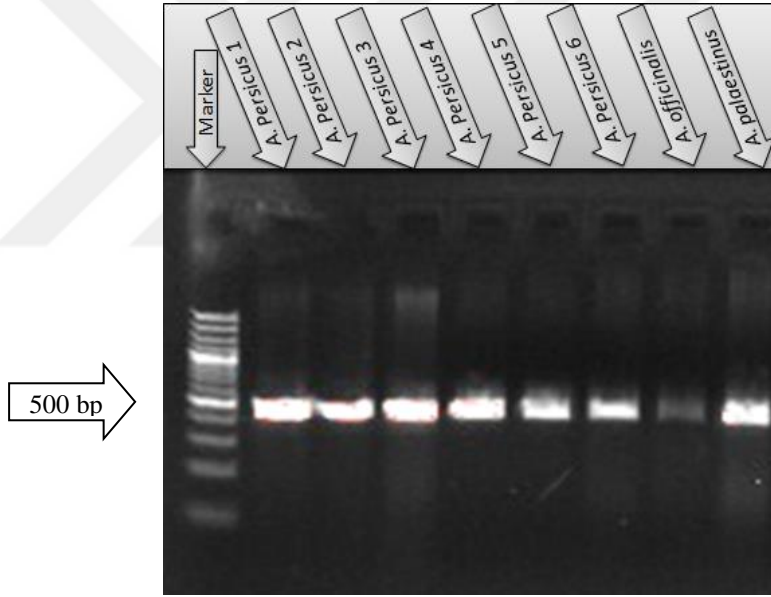
Şekil 4.1. *Asparagus* türlerine ait gDNA'larının agaroz jel görüntüsü

#### 4.1.2 PZR sonuçları

İzole edilen gDNA'ların ITS bölgeleri ITS4 ve ITS5A primerleri kullanılarak, kloroplast organeline ait *trnL-F* bölgeleri ise *trnL-Ff* ve *trnLe* primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltılmış olup, elde edilen PZR jel görüntüleri Şeki 4.2'deki gibidir. PZR'den daha fazla ürün almak ve polimeraz aktivitesini hızlandırmak amacı ile reaksiyondaki son hacmi 1 mg/ ml konsantrasyonunda olacak şekilde BSA (bovine serum albumin) eklenmiştir.



Şekil 4.2. Bazı *Asparagus* türlerinin ITS Bölgesine Ait Jel Görüntüsü



Şekil 4.3. Bazı *Asparagus* türlerinin trnL-F bölgesine ait jel görüntüsü

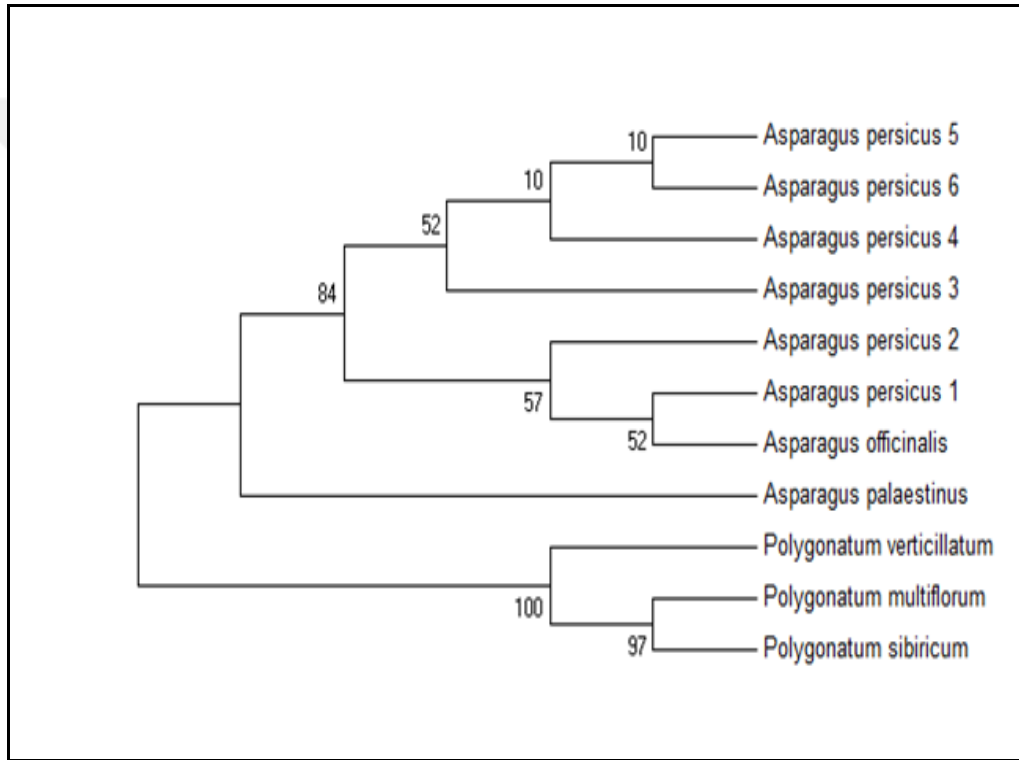
#### 4.1.3 Dizileme analizi

Elde edilen PZR ürünleri dizileme amacıyla İONTEK firmasına gönderilmiştir. Her örneğe ait DNA dizisi tek yönlü olarak okutuldu. Firmadan gelen diziler BioEdit sequencher programıyla analiz edilmiştir (Şekil 4.4).

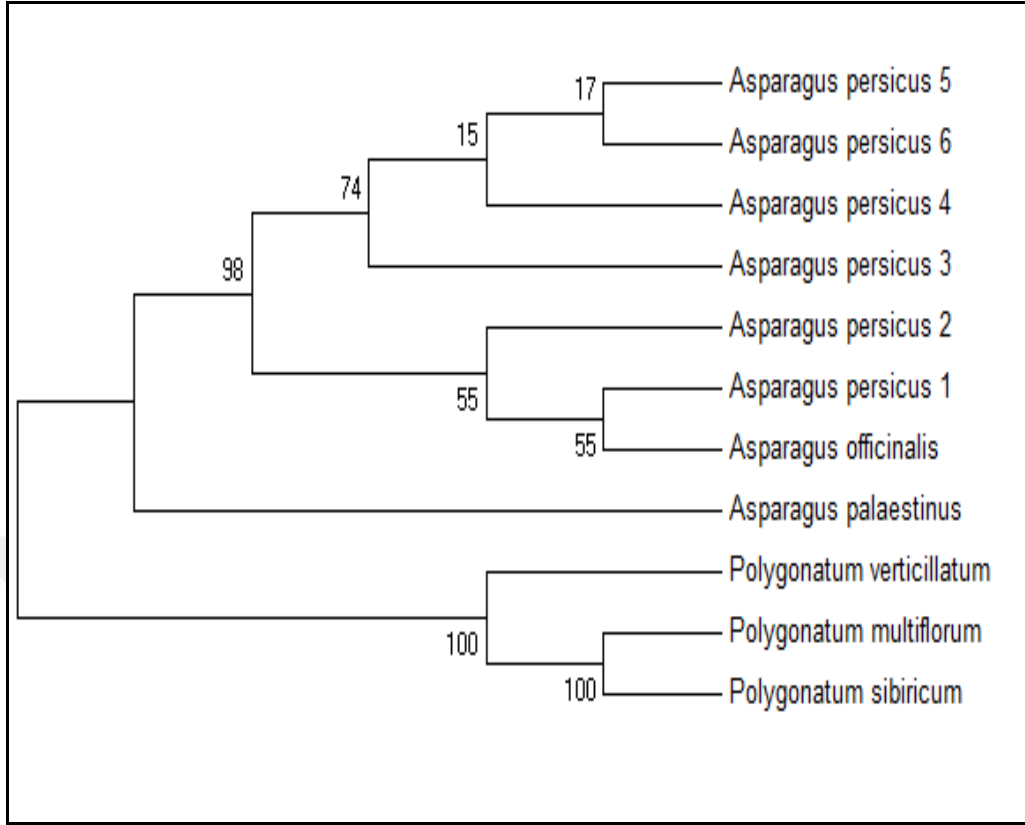


çifti arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Genetik uzaklık ağacı oluşturmada mesafe temelli yöntemlerden Neighbour Joining (NJ) yöntemi, karakter temelli yöntemlerden Maximum likelihood yöntemi kullanılmıştır.

Bootstrap analizi, elde edilen ağaçların dallarının güvenilirlik derecesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Kress ve ark. (2002) tarafından karakterize edilen bootstrap destek kriterlerine göre,  $\geq 85$  güçlü, %75-80 arası orta, %50-70 arası zayıf ve  $< 50$  çok zayıf şeklinde tanımlanmıştır.



**Şekil 4.6.** ITS bölgesinin Neighbour-Joining analizi sonucu oluşan ağacı  
(Filogenetik ağacın nodlarında yer alan rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir)



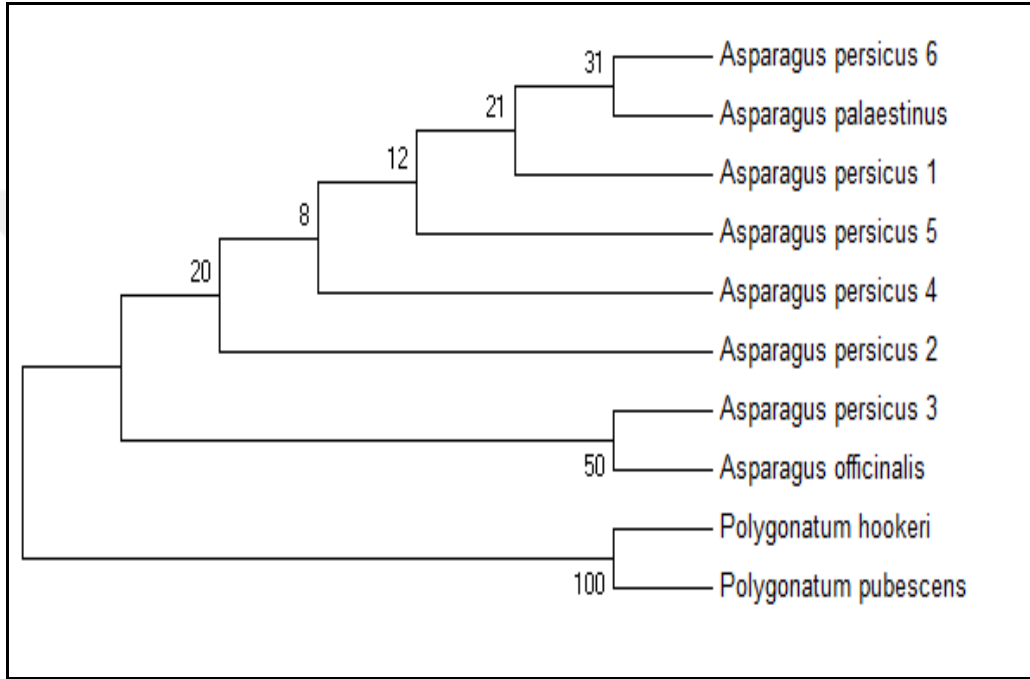
**Şekil 4.7.** ITS bölgesinin Maximum Likelihood analizi sonucu oluşan ağacı (Filogenetik ağacın nodlarında yer alan rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir)

ITS bölgesine ait dizi verileri kullanılarak oluşturulan NJ ve ML ağaçları farklı türleri ve farklı lokasyonlardan toplanan aynı türe ait örnekleri ayırmada başarılı olmuştur. Farklı lokasyonlardan toplanan *A. persicus* ait örnekler aynı gruplar içinde toplanmıştır. Her iki metodla yapılan analiz sonucu üç grup oluşmuştur. Ancak bu çalışma için bootstrap değerleri gözönünde bulundurulduğunda ML yönteminin daha güvenilir bilgiler verdiği görülmektedir. Bu çalışmada bulunan sonuçlar Saitou ve Imanishi (1989)'nin çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Bahsedilen çalışmada filogenetik ağaç oluşturmada kullanılan yöntemler bilgisayar simülasyonu ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla baz dizisi 300-600 bp arasında değişen 6 DNA dizisi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre dallar arasındaki değişim oranları önemli oranda değiştiğinde ML metodu NJ metoduna göre daha güvenilir bilgiler sunmuştur. Yapılan bir diğer çalışmada da bilgisayar simülasyonu kullanılarak NJ ve ML metodlarının güvenilirlikleri karşılaştırılmıştır. DNA dizisindeki yer değiştirmeler Jukes-Cantor, Kimura ve gamma metodları kullanılarak hesaplanmıştır. Metodların değerlendirilmesinde köksüz ağaçların doğru bir şekilde tahmin edilebilme durumları

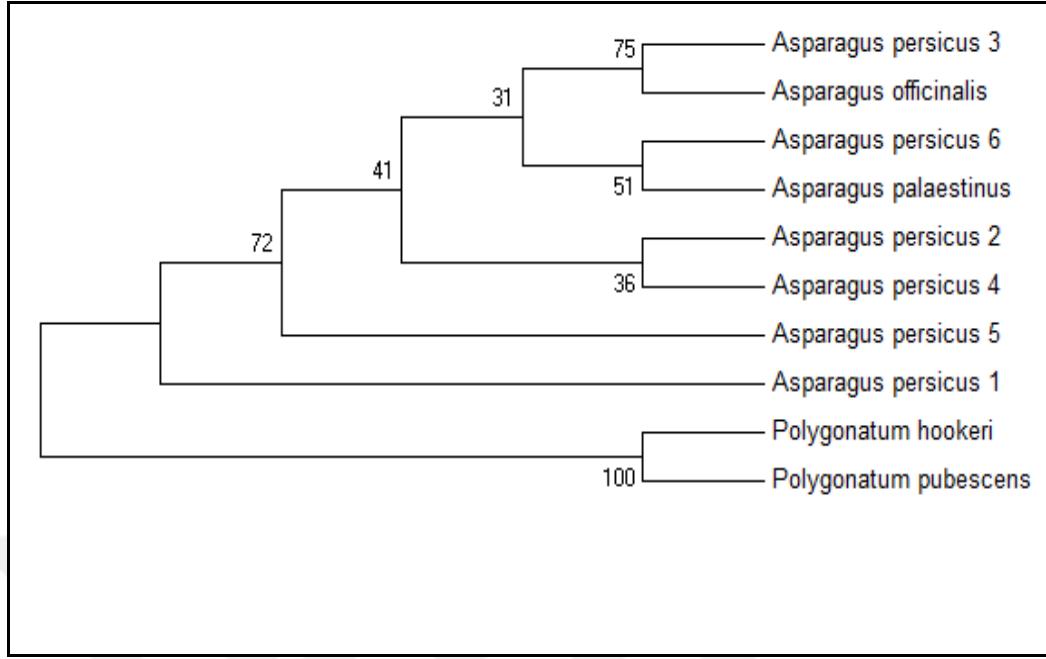


gözönünde bulundurulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 36 farklı durumun 29 tanesinde ML metodu NJ metoduna kıyasla daha güvenilir bilgiler sağlamıştır. Ayrıca 180 simülasyonun 133 tanesinde ML metodu NJ metoduna oranla daha yüksek performans göstermiştir (Huelsenbeck., 1995).

#### 4.1.5 *trnL-F* bölgesine ait filogenetik ağaçlar ve analizi



**Şekil 4.8.** *trnL-f* bölgesinin Neighbour-Joining analizi sonucu oluşan ağacı (Filogenetik ağacın nodlarında yer alan rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir)



**Şekil 4.9.** *trnL-f* bölgesinin Maximum Likelihood analizi sonucu oluşan ağacı (Filogenetik ağacın nodlarında yer alan rakamlar bootstrap değerlerini göstermektedir)

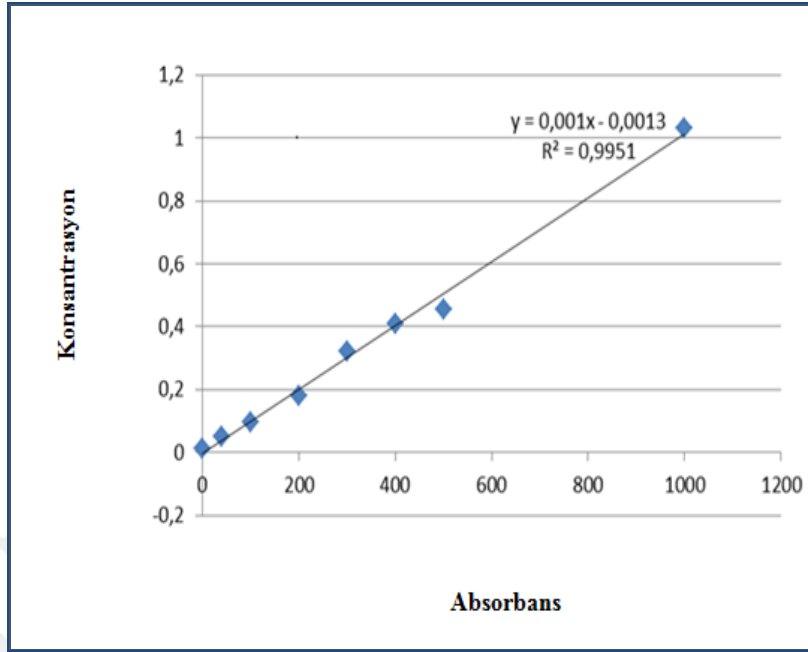
*trnL-f* bölgesinin ML ve NJ metodları kullanılarak oluşturulan ağaçlar farklı türleri ve aynı türe ait bireyleri ayırmada çok anlamlı sonuçlar vermemiştir. Örneğin NJ analizi sonucu *A. persicus* (6) ve *A. officinalis* aynı grupta çıkmıştır. Yine ML analizi sonucu *A. persicus* (3) ve *A. officinalis* aynı grupta çıkmıştır.

Yapılan tüm analizler sonucu ITS bölgesinden elde edilen dizilerin analiz edilmesi sonucu elde edilen ağaçlar *trnL-f* bölgesine göre hem bootstrap değerleri hem de oluşan gruplar açısından daha anlamlı sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlara bakılarak, ITS bölgesinin yeterli bilgiyi verecek uzunluğa sahip olması (~ 660 bp) ve *trnL-f* bölgesine göre daha yüksek polimorfizme sahip olması sebep olarak gösterilebilir.

## 4.2 Antioksidan Aktivite Tayin Sonuçları

### 4.2.1 Toplam fenolik madde konsantrasyonu

Bu çalışmada toplam fenolik madde tayini, Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır. Standart olarak kullanılan gallik asitin 0.05-1 mg/ml konsantrasyon aralığında regresyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.10).



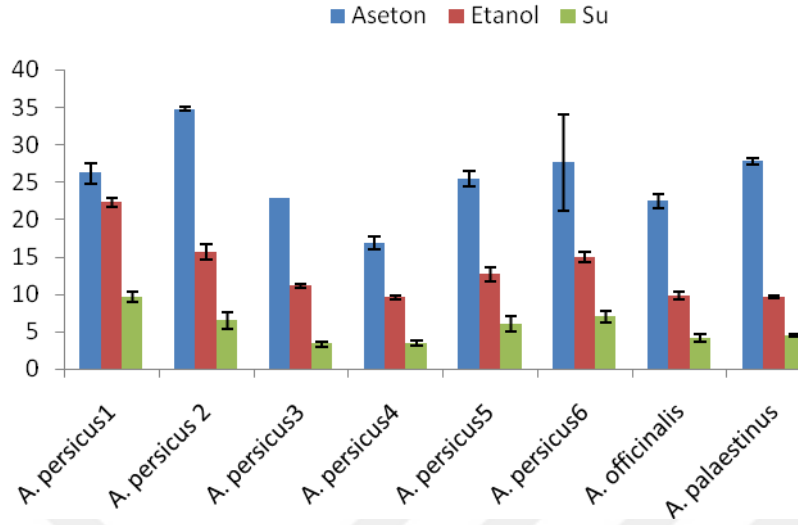
Şekil 4.10. Gallik asit standart regresyon eğrisi

Total fenolik madde içeriği 1 mg/g konsantrasyona göre hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Elde edilen sonuçlara göre total fenolik madde içeriği kullanılan çözügene göre farklılık göstermiştir. Buna göre asetonla yapılan ekstraksiyon sonucu en yüksek total fenolik madde içeriği *A. persicus* (2)' de görülmüş (34,768), buna karşın en düşük içerik *A. persicus* (4)'te görülmüştür (16,890). Etanol ekstraksiyonu sonucu yapılan analizlerde en yüksek fenolik madde içeriği *A. persicus* (1)' de görülürken (22,283) en düşük içerik *A. persicus* (4)' te görülmüştür (9,574). Su ekstraktları ile yapılan okumalarda ise en yüksek değer *A. persicus* (1)' de gözlemlenirken (9,49) en düşük değer *A. persicus* (3)' te görülmüştür (3,358).

**Tablo 4.1.** Fraksiyonlama sonucu elde edilen, *Asparagus L.* türlerine ait fenolik madde içerikleri (mg/gr)

Tür	Fenolik madde içeriği (mg/g gallik asit)		
	Aseton	Etanol	Su
<i>A. persicus 1</i>	26,183	22,283	9,649
<i>A. persicus 2</i>	34,768	15,633	6,491
<i>A. persicus 3</i>	22,768	11,108	3,358
<i>A. persicus 4</i>	16,890	9,574	3,458
<i>A. persicus 5</i>	25,466	12,641	6,074
<i>A. persicus 6</i>	27,583	14,999	7,041
<i>A. officinalis</i>	22,508	9,866	4,158
<i>A. palaestinus</i>	27,749	9,658	4,491

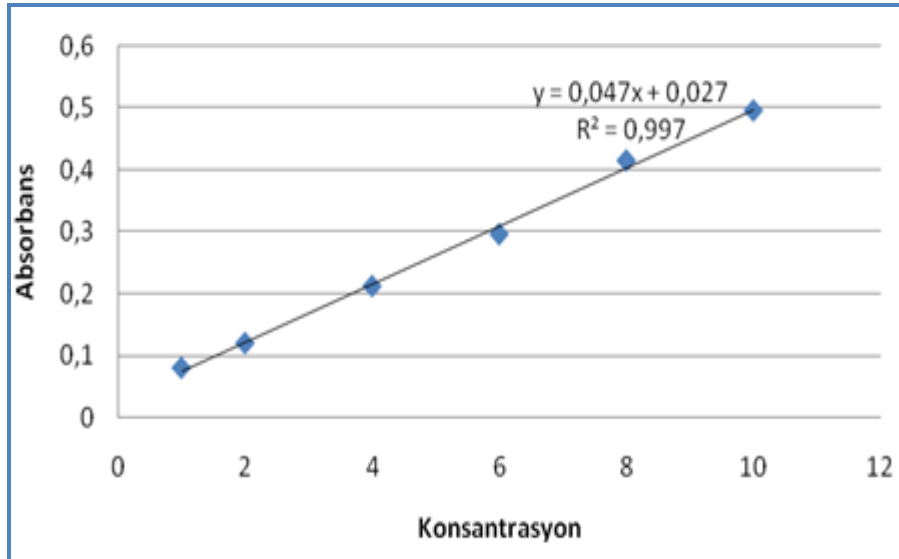
Bitki materyallerinde bulunan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, kullanılan ekstrakt tipinden önemli derecede etkilenmektedir. Dahası solvent polaritesi fenolik maddelerin çözünürlüğünde kilit öneme sahiptir (Naczka ve Shadidi, 2006). Kullanılan solventler arasında aseton ekstraktlarının total fenolik içeriklerinin su ve etanol ekstraktlarına göre daha yüksek içeriğe sahip olduğu bulunmuştur. Bu durumun bir sebebi olarak, asetonun etanole göre çok az da olsa daha yüksek polariteye sahip olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte fraksiyonlama durumu da göz önünde bulundurulduğunda iki çözücü ekstraktlarının total fenolik içerikleri arasındaki fark daha az önem arz eder. Bu çalışmada bulunan sonuçlar solvent olarak aseton, etanol ve suyun kullanıldığı diğer çalışmalarla korelasyon göstermekte iken (Kallithraka ve ark., 1996; Yılmaz ve ark., 2006). Mohammedi ve Atik. (2011)' in yaptıkları çalışmanın sonuçları açısından farklılık göstermektedir. Bu çalışmada materyal olarak şeker elma (*Annona squamosa*) kullanılmıştır. Bahsedilen çalışmada görülen farklılıklar ise temel olarak molekül boyutu, hidroksil gruplarının varlığı ve hidrokarbonların uzunluğuna bağlanmıştır.



Şekil 4.11. *Asparagus* türlerinin fenolik madde içerikleri

#### 4.2.2 Toplam flavonoid madde tayini

Total flavanoid madde içeriği alüminyum şelatlamaya dayalı bir metodla yapılmıştır. Standart olarak kullanılan rutin 0.05-1 mg/ml konsantrasyon aralığında regresyon eğrisi çizildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Rutin standart regresyon eğrisi

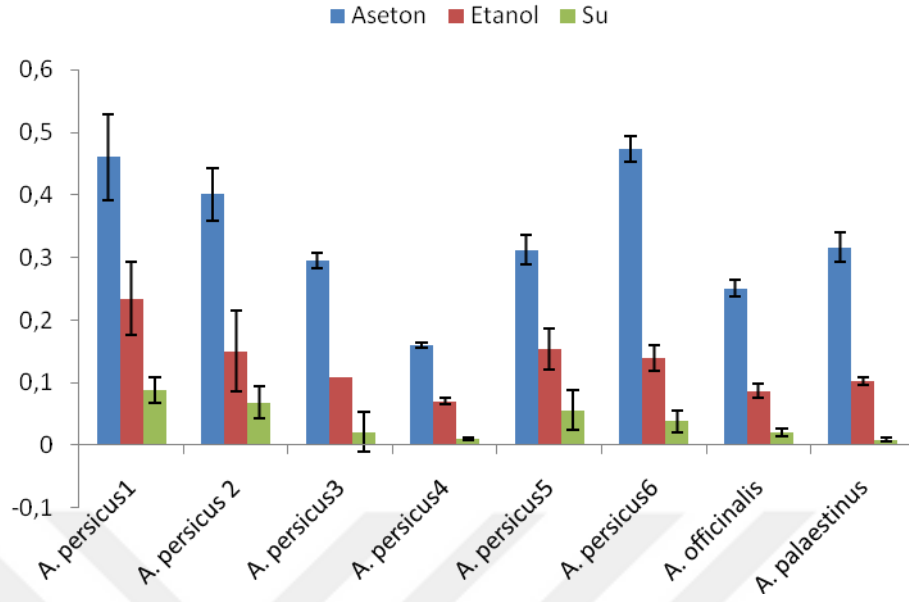
Total flavanoid madde içeriği 1 mg/g konsantrasyona göre hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Farklı çözümlerle yapılan ekstraktların total flavanoid madde içerikleri arasında belirgin farklılıklar görüldü. Aseton ekstraktları arasında en yüksek değer *A. persicus*

(6)'da gözlemlenirken (0,474) en düşük değer *A. persicus* (4)'te ölçüldü (0,160). Etanol ekstraktları arasında *A. persicus* (1) belirgin bir şekilde en yüksek değeri gösterirken (0,234), en düşük değer *A. persicus* (4) nolu örnekte görüldü (0,070). Suyla yapılan ekstraksiyon sonucu örnekler arasında büyük farklılıklar görüldü. Yapılan ölçümler sonucu *A. persicus* (1) nolu örnek (0,088) değeriyle en yüksek aktiviteyi gösterirken, (0,010) değeriyle en düşük aktivite *A. palaestinus*'ta ölçüldü. Bu durumun sebepleri arasında ekolojik farklılıklarla birlikte antioksidan aktivitenin temelini oluşturan saponinler, flavanoidler, antisiyaninler ve fenolik bileşik içerikleri arasındaki farklılıklar sayılabilir.

**Tablo 4.2.** Fraksiyonlama sonucu elde edilen, Kuşkonmaz türlerine ait flavanoid madde içerikleri (mg/g)

Tür	Flavanoid madde içeriği (mg/g rutin)		
	Aseton	Etanol	Su
<i>A. persicus</i> 1	0,460	0,234	0,088
<i>A. persicus</i> 2	0,400	0,150	0,068
<i>A. persicus</i> 3	0,296	0,108	0,021
<i>A. persicus</i> 4	0,160	0,070	0,011
<i>A. persicus</i> 5	0,312	0,154	0,056
<i>A. persicus</i> 6	0,474	0,140	0,038
<i>A. officinalis</i>	0,250	0,086	0,021
<i>A. palaestinus</i>	0,316	0,102	0,010

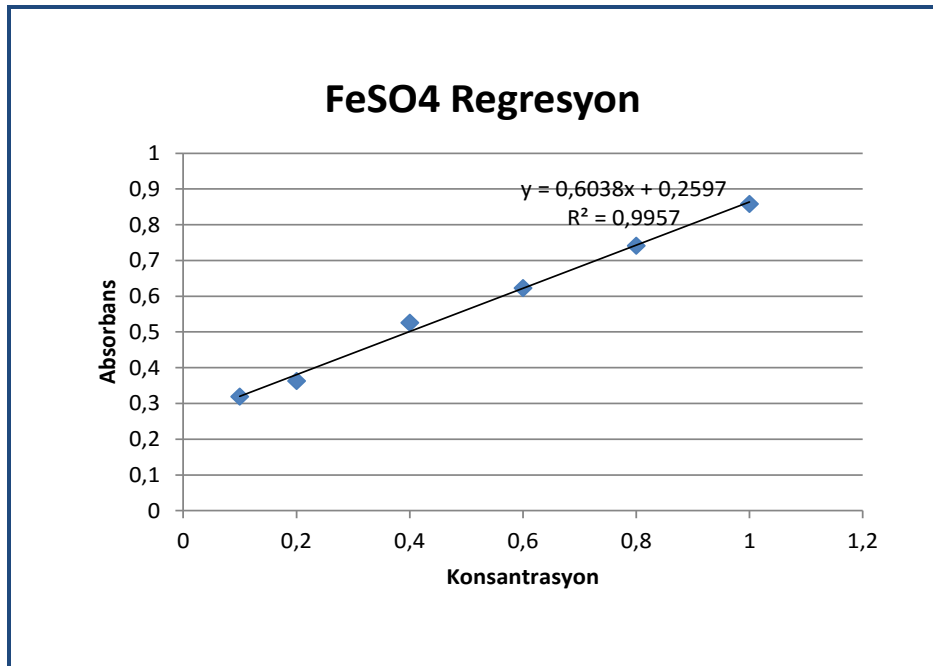
Bu çalışmada bulunan sonuçlar Sun ve ark. (2007)' nin çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Bahsedilen çalışmada materyal olarak kuşkonmaz ve brokoli ve bunların suyu, çözücü olarak ise aseton, metanol ve su kullanılmıştır. Çalışma sonucunda aseton ekstraktlarının en yüksek total flavanoid içeriğine sahip olduğu belirtilirken, su ekstraktlarının en düşük içeriğe sahip oldukları rapor edilmiştir. Ayrıca kuşkonmaz için suyun tek başına iyi bir solvent olmadığı belirtilmiştir.



Şekil 4.13. *Asparagus* türlerinin flavanoid madde içerikleri

#### 4.2.3. Demir (III) indirgeme kapasitesi (FRAP) tayini

Regresyon eğrisi ferrosülfat ile hazırlandı. Sonuçlar kurutulmuş ağırlığın her gramına karşılık gelen mM Fe<sup>-2</sup> olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.14. Ferrosülfat standart regresyon eğrisi

Çözgen çeşidine bağlı olarak farklı türler ve farklı lokasyonlardan toplanan aynı türe ait farklı örneklerin FRAP aktiviteleri arasında önemli farklılıklar görülmüştür (Tablo 4.3). Asetonla yapılan ekstraktlar üzerinde yapılan analizlerde en yüksek FRAP aktivitesini *A. persicus* (3) nolu örnek gösterirken (0,061), etanol ve su ekstraktlarında en yüksek aktivite *A. persicus* (1) nolu örnekte ölçüldü (0,043-0,016). Ayrıca su ekstraktları üzerinde yapılan analizlerde kimi örneklerde herhangi bir aktivite görülmedi. Farklı lokasyonlardan toplanan *A. persicus* türüne ait örneklerde lokasyonlara göre farklı aktiviteler gözlemlendi. Örneğin birinci lokasyona ait örneklerin aktiviteleri ikinci lokasyondan toplanan örneklere göre genel olarak daha yüksek olduğu bulundu. Bu durum genel anlamda *A. persicus* türüne ait örnekler için kullanılan çözügene göre farklılık göstermediği belirlenmiştir.

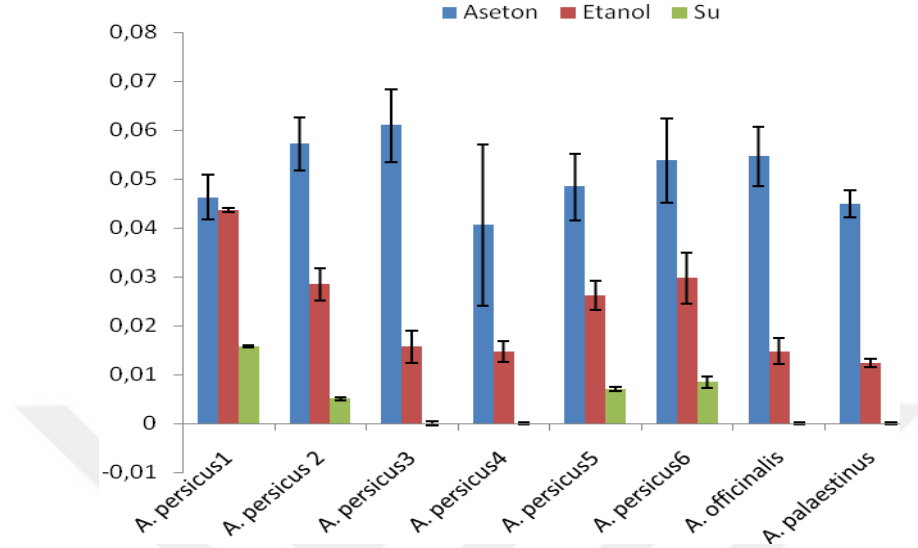
**Tablo 4.3.** *Asparagus* türlerinin FRAP aktiviteleri ( $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ )

Tür	FRAP aktivitesi ( $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ )		
	Aseton	Etanol	Su
<i>A. persicus</i> 1	0,046	0,043	0,016
<i>A. persicus</i> 2	0,058	0,028	0,005
<i>A. persicus</i> 3	0,061	0,016	0
<i>A. persicus</i> 4	0,041	0,015	0
<i>A. persicus</i> 5	0,048	0,026	0,007
<i>A. persicus</i> 6	0,054	0,023	0,008
<i>A. officinalis</i>	0,055	0,015	0
<i>A. palaestinus</i>	0,045	0,012	0

Çalışma sonuçları materyal olarak bira posası ve çözgen olarak aseton, etanol, su, hekzan, metanol, etil asetat ve bunların suyla karışımlarının kullanıldığı Meneses ve ark. (2013)' nın çalışma sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Çalışma sonucunda aseton ekstraktı, etanol, metanol ve su ekstraktına göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte yukarıda adı geçen ekstraktların su ile karıştırılarak hazırlanan hallerinin saf olarak kullanıldığı duruma göre daha etkili sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Rodriguez-Rojo ve ark. (2012)'e göre aseton, fenolik



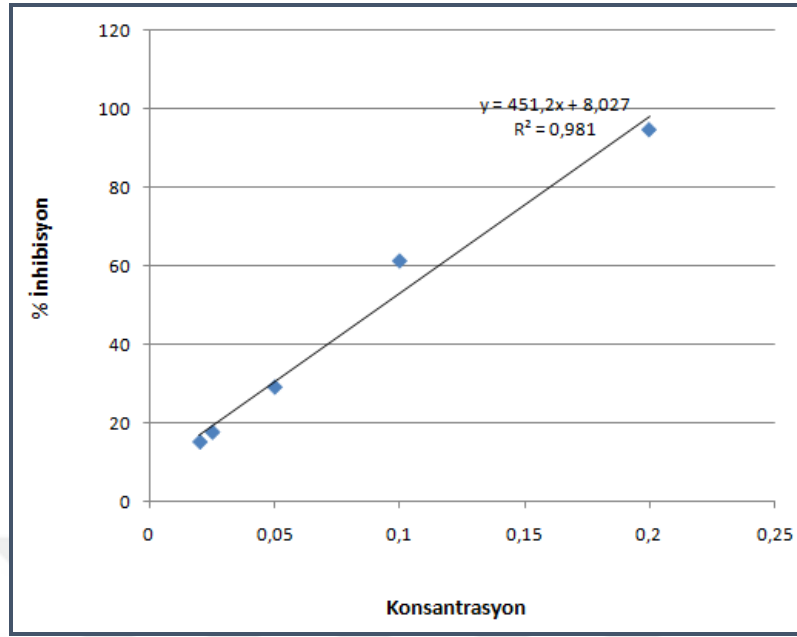
bileşiklerin ekstraksiyonu için çok önemli olan hidrojen bağlayıcı özelliğinden dolayı antioksidan aktivite açısından yüksek verim sağlamaktadır.



Şekil 4.15. *Asparagus* türlerinin FRAP aktiviteleri (µmol Fe(II)/g)

#### 4.2.4. Serbest radikal (DPPH) giderme aktivitesi

DPPH giderme aktivitesi temelde antioksidanlar tarafından verilen protonun DPPH radikali tarafından yakalanması ve indirgenmesi ilkesine dayanır. Buna göre standart olarak kullanılan trolox'un 0,02-0,2 mg/ml arasındaki 5 farklı konsantrasyonuna göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.16). Sonuçlar mg/ml trolox eşdeğeri cinsinden ifade edildi (Tablo 4.4).



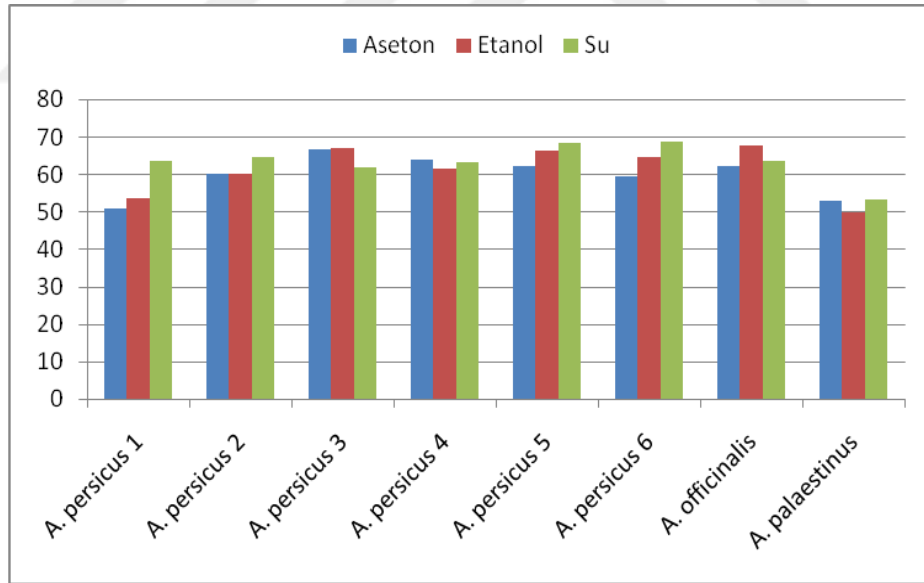
Şekil 4.16. Trolox kalibrasyon eğrisi

Yapılan analizler sonucu en yüksek DPPH aktivitesi *A. persicus* 6 nolu örnekte görülürken (0,401), en düşük aktivite *A. palaestinus*'ta görüldü (0,275). *A. persicus* 1 nolu örnek hariç kullanılan çözügene bağlı olarak diğer örneklerin kendi içerisindeki DPPH aktiviteleri arasında çok önemli farklılıklar görülmedi.

Tablo 4.4. *Asparagus* türlerinin DPPH aktiviteleri (mg/ml Trolox)

Tür	DPPH aktivitesi (µg/ml Trolox eşdeğeri)		
	Aseton	Etanol	Su
<i>A. persicus</i> 1	0,284	0,299	0,368
<i>A. persicus</i> 2	0,344	0,344	0,375
<i>A. persicus</i> 3	0,388	0,390	0,356
<i>A. persicus</i> 4	0,370	0,353	0,365
<i>A. persicus</i> 5	0,359	0,385	0,400
<i>A. persicus</i> 6	0,339	0,374	0,401
<i>A. officinalis</i>	0,359	0,394	0,366
<i>A. palaestinus</i>	0,295	0,275	0,298

Bulduğumuz sonuçlar; materyal olarak kuşkonmaz ve brokolinin, çözen olarak ise aseton, metanol ve suyun kullanıldığı Sun ve ark. (2007)'nin sonuçlarıyla uyum göstermektedir ve bahsedilen çalışmada farklı çözenlerle elde edilen ekstraktların DPPH aktiviteleri arasında çok önemli farklılıklar görülmemiştir. Ancak Moure ve ark. (2000)' in çalışma sonuçlarıyla farklılık göstermiştir. Bahsedilen çalışmada farklı çözenlerle (Aseton, etanol, su, metanol, bütanol, etil asetat) bir süs bitkisi olan Chilean Hazel (*Gevuina avellana*)'in kabuklarından ekstraksiyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda etanol ve metanolla elde edilen ekstraktların en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunurken, su ile elde edilen ekstraktların en düşük aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca antioksidan aktivitenin tespit edilmesinde kullanılan yöntemlerin sonuçlar üzerinde farklı etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Örneğin farklı domates varyeteleriyle yapılan bir çalışmada antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılmış, sonuçlar kullanılan yöntemlere göre önemli derecede farklılık göstermiştir (Martinez ve ark., 2002).



Şekil 4.17. *Asparagus* türlerinin DPPH aktiviteleri (%)

Bu çalışmada antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerden DPPH, FRAP ve total fenolik tayininde bulunan sonuçlar arasında doğrusal bir korelasyon görülmüştür. Örneğin *A. Persicus* (1) nolu örnek her üç yöntem açısından da en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Ancak asetonla yapılan ekstraksiyon sonucu yapılan analizler bu durumla uygunluk göstermemiştir.

Antioksidan belirleme yöntemlerinden DPPH metodu ise diğer yöntemlerden farklı sonuçlar vermiştir. DPPH yönteminde aseton, etanol ve su ekstraktları ile yapılan analizlerde gözlemlenen en yüksek değerler ile diğer üç yöntemde bulunan sonuçlar birbirinden tamamen farklıdır. Bu durum muhtemelen bitkilerin bulunduğu ekolojik şartlarla birlikte çözgen polariteleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.





## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada çalışılan türlerin moleküler karakterizasyonu amacıyla kloroplast DNA'sının *trnL-F* bölgesi ve çekirdek DNA'sının ITS bölgesi kullanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturmada mesafe temelli yöntemlerden Neighbourjoining (NJ ) metodu ve karakter temelli yöntemlerden Maximum Likelihood (ML) yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılan yöntem açısından incelendiğinde ML metodu daha güvenilir sonuçlar verirken, kullanılan bölgeler gözönünde bulundurulduğunda ITS bölgesi daha bilgilendirici sonuçlar vermiştir.

Buna göre ITS bölgesinin Neighbour-Joining analizi sonucu elde edilen ağaç topolojisi incelendiğinde dış grup hariç iki grup meydana gelmiştir, *A.persicus* ve *A. officinalis* türleri bir grupta toplanırken *A.palaestinus* ayrı bir grup oluşturmuştur. . ITS bölgesinin Maximum Likelihood analizi sonucu oluşan ağaç topolojisi incelendiğinde benzer durumlar elde edilmiştir. *A.persicus* ve *A. officinalis* türleri bir grupta toplanırken *A.palaestinus* ayrı bir grupta yer almıştır. Ancak NJ yöntemine göre dallar daha yüksek bootstrap değerleriyle desteklenmiştir.

Kloroplast DNA'sının *trnL-F* bölgesine ait dizilerin Neighbour-Joining analizi sonucu oluşan ağaçta *A. persicus* (3) nolu örnek ve *A. officinalis* aynı grupta yer alırken diğer örnekler ayrı bir grupta toplanmıştır. *trnL-f* bölgesinin Maximum Likelihood analizi sonucu oluşan ağaç topolojisinde *A. persicus* (5) nolu örnek tek başına bir grup oluştururken diğer örnekler başka bir grup oluşturmuştur. Ancak ML yönteminde dallar daha yüksek bootstrap değerleriyle desteklenmiştir.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen antioksidan çalışmaları değerlendirildiğinde, total fenolik içerikleri açısından türler arasında önemli ölçüde farklılıklar gözlemlenmiştir. Ancak bu durum kullanılan çözügen tipine göre farklılık göstermiştir. Örneğin asetonla yapılan ekstraksiyon sonucu en yüksek total fenolik madde içeriği *A. persicus* (2)' de görülürken, etanol ile yapılan ekstraksiyonda *A. persicus* (1)' de ve su ekstraktlarında da yine *A. persicus* (1)' de gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar total flavanoid için değerlendirildiğinde benzer sonuçlar görülmüştür. Örneğin Aseton ekstraktları arasında en yüksek değer *A. persicus* (6)'da gözlemlenirken etanol ekstraktları arasında *A. persicus* (1) belirgin bir şekilde en

yüksek değeri göstermiştir, ayrıca suyla yapılan ekstraksiyon sonucu *A. persicus* (1) nolu örnek en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Bu durum ekolojik farklılıklarla birlikte antioksidan aktivitenin temelini oluşturan saponinler, flavanoidler, antisiyaninler ve fenolik bileşik içerikleri arasındaki farklılıklara bağlanabilir.

Çalışılan türler FRAP aktiviteleri yönünden değerlendirildiğinde hem tür içi hem de türler arasında kullanılan çözüme bağlı olarak FRAP aktiviteleri arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Örneğin asetonla yapılan ekstraktlarda en yüksek FRAP aktivitesini *A. persicus* (6) nolu örnek gösterirken, etanol ve su ekstraktlarında en yüksek aktivite *A. persicus* (1) nolu örnekte ölçülmüştür. Ayrıca su ekstraktları üzerinde yapılan analizlerde kimi örneklerde herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır.

Antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinden DPPH yöntemi kullanılarak türler arasındaki aktivite farklılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analizler sonucu en yüksek DPPH aktivitesi *A. persicus* (6) nolu örnekte görülürken, en düşük aktivite *A. palaestinus*'ta görülmüştür. *A. persicus* (1) nolu örnek hariç kullanılan çözüme bağlı olarak diğer örneklerin kendi içerisinde ki DPPH aktiviteleri arasında çok önemli farklılıklar saptanmamıştır.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan bütün yöntemler göz önünde bulundurulduğunda DPPH, FRAP ve toplam fenolik tayininde elde edilen sonuçlar birbiriyle uyumludur. Ancak toplam flavanoid tayininde bulunan sonuçlar farklılık göstermiştir. Bu durum kullanılan çözüme ve ekolojik farklılıklara bağlanabileceği gibi kullanılan yöntemlere göre de değişebilmektedir.

## 5.2. Öneriler

Bu çalışma sonucu elde edilen veriler bize Van Gölü Havzası'nda yetişen yabani kuşkonmaz türlerini farklı yönlerden kıyaslama imkânı vermiştir. Elde edilen veriler ışığında özellikle *A.persicus* bu çalışmada kullanılan diğer tür olan *A.palaestinus*'a göre hem moleküler anlamda hem de antioksidan aktivite açısından kuşkonmazın kültür formu olan *A.officinalis*'e daha yakın çıkmıştır. Ayrıca çeşitli yöntemlerle yapılan antioksidan aktivite tayini sonucu diğer türlere göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu yüzden bu türün kültüre alınabilirlik durumunun incelenmenin önemli olacağı kanaatindeyim.

## 6. KAYNAKLAR

- Acharya, S.R., Acharya, N.S., Bhangale, J.O., Shah, S.K., Pandya, S.S., 2012. Antioxidant and hepatoprotective action of *Asparagus rasemosus* willd. root extracts. *Indian journal of experimental Biology*, 50, 795-850.
- Alventosa, J.M.F., Carmona, S.J., Gutiérrez, G.R., Arcos, R.R., Bolaños, J.F., Bejarano, R.G., Calvo, J.A.E., Araujo, A.R., 2009. Effect of the extraction method on phytochemical composition and antioxidant activity of high dietary fibre powders obtained from asparagus by-products. *Food Chemistry*, 116, 484-490.
- Anonim, 2015. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kloroplast>. erişim tarihi: 09.11.2015.
- Anonim, 2016. <http://www.sifalibitkitedavisi.com/kuskonmaz-faydalari-nelerdir.html>. erişim tarihi: 20.07.2016.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F. and Donoghue, M.J., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny, *Ann. Mo. Bot. Gard*, (1995) 82, 247.
- Barkman, T. J., et al., 2007. Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants, *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 248.
- Blois, M.S. 2002. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 26, 1199-1200.
- Burleigh, J. G. and S. Mathews., 2004. Phylogenetic signal in nucleotide data from seed plants: implications for resolving the seed plant tree of life, *American Journal of Botany*, 91(10): 1599-1613.
- Burleigh, J. G., et al., 2011. Genome-scale phylogenetics: inferring the plant tree of life from 18,896 gene trees, *Systematic Biology*, 60(2): 117-125.
- Cantürk, K.M., Emre, R., Ulucan, H., 2015. Single nucleotide polymorphism applications in forensic genetics. *Med Genet 1*.
- Caruso, M., Federici, C.T. and Roose, M.L., 2008. EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. *Molecular Breeding*, 21(2):195-204.
- Castro, P., Gil, J., Cabrera, A., and Moreno, R., 2013. Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Asparagus* species related to *Asparagus officinalis*. *Genetic resource and crop evolution*. 60(4):1275-1288.
- Castro, A.J., Picornell, A., Ramon, M., 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies, *International Microbiol*, 1, 324-332.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of food and drug analysis*, 10.
- Conte, M.G., Gaillard, S., Lanau, N., Rouard, M., Périn, C., 2008. GreenPhylDB: a database for plant comparative genomics. *Nucleic acids research* 36, D991-D998.



- Clifford, H.T., Conran, J.G., 1987. Asparagaceae. In: George AS (ed) Flora of Australia. Australian Government Publishing Service, Canberra, p. 159–164.
- Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T. and Yeo, P.F., 1985. The families of monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy. *Springer*, Berlin.
- Davis, P.H., 1965. Flora of Turkey and the east Aegean islands. Edinburgh University Press.
- Doyle J. J, Doyle J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Dröge , W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiol Rev*, 82, 47-95.
- Fan, R., Yuan, F., Wang, N., Gao, Y. and Huang, Y., 2015. Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of *Asparagus officinalis* L. *Journal of food science and technology*. 52(5):2690-2700.
- Gao, L., et al., 2010. Plastid genome sequencing, comparative genomics, and phylogenomics: current status and prospects, *Journal of Systematics and Evolution*, 48(2): 77-93.
- Gerlach, H.K. and Stosser, R., 1998. Sweetcherry cultivar identification using RAPD derived DNA fingerprints. *Acta Horticulture*. 468:63–69.
- Gill, S.S., Tuteja, T., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*. 48, 909-930.
- Gupta, M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson., J.L. Owen., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998–1006.
- Hildah, P.M.A., Mashele, S., 2014. Phytochemical screening, antibacterial and antioxidant activities of asparagus laricinus leaf and stem extracts. *Bangladesh J Pharmacol*, 9, 10-14.
- Huelsenbeck, J.P., 1995. The robustness of two phylogenetic methods: four-taxon simulations reveal a slight superiority of maximum likelihood over neighbor joining. *Molecular biology and evolution*, 12: 843-849.
- John, J.C., Oliveria, J.F., Jiang, Y., Kelly, R., Salah, R., 2010. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*, 16 (4), 488-509.
- Kallithraka S, Garcia-Viguera C, Bridle P, Bakker J., 1996. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics. *Phytochem. Anal*, 6:265-267.
- Kanno, A., S. Kubota and K. Ishino., 2014. Conversion of a male-specific RAPD marker into an STS marker in *Asparagus officinalis* L. *Euphytica*, 197(1): 39-46.
- Karaca Mehmet, Ayşe Gül ince, Safinaz Y. Elmasulu, A. Naci Onus, Kenan Turgut 2005. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Analytical Biochemistry*, 343 (2005) 353–355.

- Khorasani, A., Sani, W., Philip, K., Taha, R.M., Rafat, A., 2010. Antioxidant and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Asparagus officinalis* cv. Mary Washington: Comparison of *in vivo* and *in vitro* grown plant bioactivities. *African Journal of Biotechnology*, 9(49), 8460-8466.
- Kress, W. J., L. M. Prince, and K. J. Williams. 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *American Journal Botany*, 89: 1682–1696.
- Kubitzki, K., Rudall, P., 1998. Asparagaceae, Flowering Plants· Monocotyledons. *Springer*, pp. 125-129.
- Kubota, S., Konno, I., Kanno, A., 2012. Molecular phylogeny of the genus *Asparagus* (Asparagaceae) explains interspecific crossability between the garden asparagus (*A. officinalis*) and other *Asparagus* species, *Theor Appl Genet*, 124, 345–354.
- Kunwar, A., Priyadarsini, K.I., 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health, *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1 (2), 53-60.
- Lee, E. K., et al., 2011. A functional phylogenomic view of the seed plants, *PLoS Genet*, 7(12): e1002411.
- Lee, J.W., Lee, J.H., Yu, I.H., Gorinstein, S., Bae, J.H. and Ku, Y.G., 2014. Bioactive Compounds, Antioxidant and Binding Activities and Spear Yield of *Asparagus officinalis* L, *Plant foods for human nutrition*, 69(2):175-181.
- Iezzoni, A., Brettin, T., 1997. Utilization of molecular genetics in cherry, III International Cherry Symposium 468, pp. 53-62.
- Logacheva, M.D., Samigullin, T.H., Dhingra, A., Penin, A.A., 2008. Comparative chloroplast genomics and phylogenetics of *Fagopyrum esculentum* ssp. *ancestrale* – A wild ancestor of cultivated buckwheat, *BMC Plant Biology*.
- Maro, A.D., Pacifico, S., Fiorentino, A., Galasso, S., Gallicchio, M., Guida, V., Severino, V., Monaco, V., Monaco, P., Parente, A., 2013. Raviscanina wild asparagus (*Asparagus acutifolius* L.): A nutritionally valuable crop with antioxidant and antiproliferative properties, *Food Research International*, 53, 180–188.
- Martinez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A., 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323–330.
- Meneses, N.G.T., Martins, S., Teixeira, J.A., Musatto, I., 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains, *Separation and Purification Technology*. 108, 152–158.
- Mohammedi, Z., Atik, F., 2011. Impact of Solvent Extraction Type on Total Polyphenols Content and Biological Activity from *Tamarix Aphylla* (L.) Karst, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 609-615.

- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., & Lema, J. M., 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3890–3897.
- Mukhopadhyay, S. and Ray, S., 2013. Chromosome and marker-based genome analysis of different species of *Asparagus*, *Cytologia*, 78(4):425-437.
- Naczka, M. and Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese Journal of Nutrition*, 103, 413-419.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.Y., Chen, S., Corpe, S., Butta, A., Dutta, S.K., Levine, M., 2003. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention, *Journal of the American College of Nutrition*, 22 (1), 18-35.
- Palmer, J.R., 1985. Chloroplast DNA and Molecular Phylogeny, *Bioassay*, 2 (6), 263-267.
- Papoulias, E., Siomos, A.S., Koukounaras, A., Gerasopoulos, D., Kazakis, E., 2009. Effects of Genetic, Pre- and Post-Harvest Factors on Phenolic Content and Antioxidant Capacity of White *Asparagus* Spears, *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 5370-5380.
- Potduang, B., Meeploy, M., Giwanon, R., Benmart, T., Kaewduang, M., Supatanakul, W., 2008. Biological Activities of *Asparagus Racemosus*, *Afr. J. Traditional Complementary and Alternative Medicines*, 5, 230-237.
- Powell W, Machray GC, Provan J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*,1:215–222.
- Quandt, D. and Stech, M., 2005. Molecular evolution of the trnLUAA intron in bryophytes, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, 429-443.
- Quandt, D., Müller, K., Stech, M., Frahm, J.P., Frey, W., Hilu, K.W., Borsch, T., 2004. Molecular Evolution of the Chloroplast TRNL-F region in Land Plants, *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 98, 13-37.
- Pirie, M.D., Vargas, M.P.B., Bo1termans, M., Bakker, F.T., Chatrau, L.W., 2007. Ancient paralogy in the cpdna trnl-f region in annonaceae: implications for plant molecular systematics, *American Journal of Botany*, 94 (6), 1003-1016.
- Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1993. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines, *Elsevier* 9 (8), 275-280
- Ray, S., Madhumita, J.M. and Sandip, M., 2010. Phylogenetic relationship among six economically important species of *Asparagus* utilizing RAPD, ISSR and isozyme polymorphism, *Biores. Bull.* 3:153-160.

- Rasmussen, H.B., 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PZR-Amplified Fragments (PZR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), 315-334.
- Regalado, J.J., Gil, J., Castro, P., Moreno, R. and Lopez-Encina, C., 2014. Short communication. Employment of molecular markers to develop tetraploid "supermale" asparagus from andromonoecious plants of the landrace 'Morado de Huétor', *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(4):1131-1136.
- Ridout, C.R. and P. Donini. 1999. Use of AFLP in cereals research, *Trends in Plant Science*. 4:76-79.
- Rodriguez, R., Jaramillo, S., Espejo, J.A., Guillen, R., Bolanos, J.F., Heredia, A., Jimenez, A., 2005. Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts from Several Asparagus Cultivars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5212-5217.
- S. Rodríguez-Rojo, A. Visentin, D. Maestri, M.J. Cocero, Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents, *J. Food Eng*, 109 (2012) 98–103.
- Saha, P.S., Ray, S., Sengupta, M. and Jha, S., 2014. Molecular phylogenetic studies based on rDNA ITS, cpDNA trnL intron sequence and cladode characteristics in nine Protasparagus taxa, *Protoplasma*. 252(4):1121-1134.
- Sahare, P., 2013. EcoRV digestion patterns in ITS region of medicinal plants, *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 4 (6), 558.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Erlich, Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239, 487-491.
- Saitou, N., Imanishi, T., 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree, *Mol Biol Evol* 6: 514-525.
- Sancaktaroğlu, S., Eryiğit T. ve Kumlay, A.M., 2011. Kuşkonmaz (*Asparagus spp.*) Bitkisinin Özellikleri ve Kullanım Alanları, *Uluslararası Katılımlı I. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi ve Fuarı*, s. 1-3.
- Sanderson, M. J. and M. M. McMahon., 2007. Inferring angiosperm phylogeny from EST data with widespread gene duplication, *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 1.
- Sarabi, B., Hass andokht, M.R., Hassani, M.E., Masoumi, T.R. and Rich, T., 2010. Evaluation of genetic diversity among some Iranian wild asparagus populations using morphological characteristics and RAPD markers, *Scientia horticultrae*, 126(1):1-7.
- Sarma, A.D., Mallick, A.R., Ghosh, A.H., 2010. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions, *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3), 2010, 185-192.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: Automation and Comparison with Manual Methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.

- Small, R.L., Cronn, R.C., Wendel, J.F., 2004. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants, *Australian Systematic Botany*, 17, 145-170.
- Štajner, N., Bohanec, B. And Javornik, B., 2002. Genetic variability of economically important *Asparagus* species as revealed by genome size analysis and rDNA ITS polymorphisms, *Plant Science*, 162(6):931-937.
- Su, L., Yin, J. J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J., Yu, L. L., 2007. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf., *Food Chemistry*, 100: 990-997.
- Sun, T., Powers, J.R., Tang, J., 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices, *Food Chemistry*, 105: 101-106.
- Tanaka, M., Takahata, Y., Nakayama, H., Yoshinaga, M., Kumagai, T., Nakatani, M., 2010. Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)-based markers for identification of sweetpotato cultivars, *Elsevier*, 123, 436-442.
- Tanksley, S.D., M.V. Ganai, J.P. Prince, M.C. de Vicente, M.W. Bonierbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandillo, G.B. Martin, R. Messeguer, J.C. Miller, L. Miller, A.H. Peterson, O. Pineda, M.S Roder, R.A. Wing, W. Wu and N.D. Young., 1992. High density molecular maps of the tomato and potato genomes, *Genetics*, 132:1141- 1160.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., et. Al., 1980. *Flora Europaea*, Vol. 5, Cambridge University Press, Cambridge, 71-73.
- Wang, B.S., Chang, L.W., Wu, H.C., Huang, S.H., Chu, H.L., Huang, M.H., 2011. Antioxidant and antityrosinase activity of aqueous extracts of green *Asparagus*, *Food Chemistry*, 127, 141–146.
- Yilmaz Y, Toledo R., 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols, *J. Food Compost. Anal*, 19:41- 48.
- Yücel, E., Tülükoğlu, A., 2000. Gediz (Kütahya) çevresinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler, *Ekoloji (Çevre Dergisi)*, 9/36. 12-14.
- Zhu, X.-Y., et al., 2007. Mitochondrial matR sequences help to resolve deep phylogenetic relationships in rosids, *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): 1.

## EKLER

### EK-1 Çalışılan Türlerin ITS Bölgesine Ait Diziler

#### *Polygonatum verticillatum* (Dış grup)

GCGGAGGAAAAGTCCCCGAAGGGGGAGATGGAGGGCAGATGTTCCAGATC  
ACCAAATCCCTCTACCTCGAGGCCGACATGTCGCCCCCGCGCTGCCTCGCTG  
TACGACATGCTGAGACAACAATACCCGGCATGGTGGGTGCCACGGACCCAT  
GATGTCCGAGAGCGCTGCACGCCAGCCCCGGCGTGGGGGTCTRATCTTTCCA  
TACGTGCGAACTTTTACGACTCTCAGCAACGGATATCTTGGCTCTCACATTGA  
TGAAGAACGTAGTGAAATGCGATGCCTGTTGTGAATTGTAGAATACCGTGA  
ACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGTGCCCGAGGCTATCCGACCGAGGGC  
ACTCCTGCCTAGGCATCACGCCTTACCTACTCCGCACACCCTGACCCCCTG  
CCTTGGGGAGGCGGCGGATGCAGATGCGGATGCAGAGATTGGCCCCCATG  
CCTCCCAACGTGATGGGATGAAGTTCGGGCGCCGACCGGGATGGACGCGG  
CTAGTGGTGAACGGACACATATGGTGCTTAATGTCGCATCCAGCCCTCGGC  
ACCAGCGGCGCAT

#### *Polygonatum multiflorum* (Dış grup)

AAGGATCATTGTCGAGACCCGAACGGACGATCGCGAACCCGTCAACGCTCC  
CGCGGGGGGCGGAGGGAGGGCGGACGTTCCGGCCGCCCGAACCCCGCCAC  
CCCGGGGCCCCAATGCCGCCCCCGCCCCGCTCGCTGCGGGACGGGCGGCG  
GGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGAACACTGATGTCGGAGAGC  
GCCGCACGCCGGTCCCGGCGCGCGGCGCGATCCTTCCATACGTCGAACTTTT  
ACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC  
GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTT  
GAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCTATCCGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGC  
ATCACGCCTCGGGTCGCTCCGCGCACCCCGCCCCCGGGCCCGGGAGGGC  
GCGGGCGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCTCGCGGGCGCGGGCGGCG  
GAAGTGCGGGCCGCCGGCCGGGACGGACGCGGGCGAGTGGTGGACGGACAC  
GTACGGCGCTTTACGCCGCTCCGGACCCCGGCCCCAGCGGCGCATGCAA  
GGAACCCACGCCGAGCACGGCTCGGAACAC

#### *Polygonatum sibiricum* (Dış grup)

ATCGCGAACCCGTCAACGCTCCCGCGGGGGGCGGAGGGAGGGCGGACGCT  
AAAGCCGCCC GAACCCCGCCACCCCGGGGCCCAAATGCCGCCCCCGCCCCG  
CCTCGCTGCGGGACGGGCGGCGGGAACAAAACCCGGCGCGGTGGGCGCCA  
AGGAACACTGATGTCGGAGAGCGCCGCACGCCGTCCCGGCGCGCGGGCGCG  
ATCCTTCCATACGTCGAACTTTTACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTC  
TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGA  
ATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAGGCTATCCG  
GCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCATCACGCCTCGCGTCGCTCCGCGCACCC  
CGCCCCCTCCGGGCGGCGGGCGCGGACGCGGAGATTGGCCCCCGTGCCTC  
GCGGCGCGGCGGGCCGAAGTGCGGGCCCGCCGGCCGGGACGGACGCGGCGA

GTGGTGGACGGACACGTACGGCGCTTAACGCCGCCTCCGGCCCCCGGCC  
AGCGGCGCATGCAAAGGAACCCATGCCGAGCAC

*Asparagus persicus 1*

AGCTCGATAGTGACCTGCGGAAGATCATTGTCGAGACCCGAGCGGACGACT  
GTGAACTAGTAAACCCGTCCGGGAGATCCGAGGGAGGGCGACTTCTGTCGC  
TTACCCCGGCCTCCTTGGGCACCTATGGCCGCCCCCGTCCTGCCTCGTTGCA  
GAACGGGCGGCGGGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGACTAGTG  
CTTTAGAGGATCACCGTGTGCTGCATCGCCCGTCGAGGCGGCGCACGATGT  
GGTCTGGTAATCATACCATGAACTTTACGACTCTTGGCAACGGATATCTTGG  
CTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGC  
AGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT  
TTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCATGCCTCACATCGCTCAGTGCCC  
CCCGCCTCCCAAGGCCATAGCATTGGGAAGCCGCGCGCCGGCATGCATACA  
TTGACCTCCCCTCGCCTGGCGTAGCGGCCGGCTGAAATGATTGTGCGTGTGTC  
GGTCCGGACACACAGAATGGATGGACGGACACACATGACTGTGACTGATGT  
GTACTGCGACTCCGTAACCTCAAACCAGGGCGTGCCTGCAGCGCATGCCAT  
ACCGGACGGTCATAACGACGTCGCACGCACACCCGACCCGACCCAGTCAGGGCC  
GAGCCCGCTCGACTGAATCTAATCTCTACCGGTGGGGGAGAGAGAGAAA

*Asparagus persicus 2*

AGCAGTACGATAGTGACTGCGGAGGATCATTGTCGAGACCCGAGCGGACGA  
CTGTGAACTAGTAAACCCGTCCGGGAGATCCGAGGGAAGGGCGACTTCTGTC  
GCTTACCCCGGCCTCCTTGGGCACCTATGGCCGCCCCCGTCCTGCCTCGTTG  
CAGAACGGGCGGCGGGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGACTAG  
TGCTTTAGAGGATCACCGTGTGCTGCATCGCCCGTCGAGGCGGCGCACGAT  
GTGGTCTGGTAATCATACCATGAACTTTACGACTCTTGGCAACGGATATCTT  
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATT  
GCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTCTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCT  
ATTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCATGCCTCACATCGCTCAGTGC  
CCCCCGCCTCCCAAGGCCATAGCATTGGGAAAGCGCGCCGCGCATGCATAC  
ATTGATCGCCCGTGCCTTGTCTTAGCGCCCGTTGAAATGATTGACTGTGGTT  
GGGTCGGACACACACGATGAAGGACGGACACACATGACTGTGACTGATGTG  
TACTCGATCGTAACTAAAGCAGCGGTGCCTGCAGCGCATGCCTACCGACG  
TTCATTAACGCCCTTCGCACCACGACCCACCGTCAAGTCGGGGCCGACCCG  
CTGAGCTGTAGTTCATAGTCAATCCAAACAGAGAGAGGAAAGGA

*Asparagus persicus 3*

CTTAGCCTTTTCCCTTGTGACCTGCGGAGATCATTGTCGAGACCCGAGCGGA  
CGACTGTGAACTAGTAAACCCGTCCGGGAGATCCGAGGGAGGGCGACTTCT  
GTCGCTTACCCCGGCCTCCTTGGGCACCTATGGCCGCCCCCGTCCTGCCTCG  
TTGCAGAACGGGCGGCGGGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGAC  
TAGTGCTTTAGAGGATCACCGTGTGCTGCATCGCCCGTCGAGGCGGCGCAC  
GATGTGGTCTGGTAATCATACCATGAACTTTACGACTCTTGGCAACGGATAT  
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGA

ATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAG  
GCTATTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCATGCCTCACATCGCTCAG  
TGCCCCCGCCTCCCAAGGCCATAGCATTGGGAAAGCGGTTCGCGGCGCGGA  
TGCGGAGATTGACCTCCCGTGCCTTACGGCGCGGCGGGTTGAAATGATTGTC  
GCTGGTTCGGGTCGGACACGGCGAATGGTGGACAGACACAAATGACGCTGA  
GCGCTGTGTACTCGAACCTAAGCCAAAGCGGCGCGTGCAAGGAGCCCATGC  
CGACGGGCGTTCAAGAACGCCCTCGGACCACGACCCAGGTCAGGCCGGG  
GCCACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGGAGGAA

*Asparagus persicus* 4

GGGTCGATAGTGACCTGCGGAGGATCATTGTCGAGACCCGAGCGGACGACT  
GTGAACTAGTAAACCCGTCCGGGAGATCCGAGGGAGGGCGACTTCTGTGCG  
TTACCCCGGCCTCCTTGGGCACCTATGGCCGCCCCCGTCCTGCCTCGTTGCA  
GAACGGGCGGCGGGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGACTAGTG  
CTTTAGAGGATCACCGTGTGCTGCATCGCCCGTCGAGGCGGCGCACGATGT  
GGTCTGGTAATCATACCATGAACTTTACGACTCTTGGCAACGGATATCTTGG  
CTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGC  
AGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCTAT  
TTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCATGCCTCACATCGCTCAGTGCC  
CCCGCCTCCCAAGGCCATAGCATTGGGAAAGCGGTTCGCGGCACGGATGCAG  
AGATTGACCTCGCGTGCCTTACGGCGCGGCGGGTTGAAATGATTGTCGCTG  
GTCGGGTCGGACACGGCGAATGGTGGACAGACACGAATGACACTGATCGCT  
GTGTACTCGAACCTCAGCCAAAGCGGCGCGTGCAACGAGCCCATGCCGACG  
GGCGTTCAAGAACGCCCTCGGACCACGACCCGCAAGTCAGGCCGGGGCCACC  
CGCTGAGTTTAAGCATTCAATGGGGGGGGGGGGGGGA

*Asparagus persicus* 5

TGGAGAACGATAGTGACCTGCGGAGGATCATTGTCGAGACCCGAGCGGACG  
ACTGTGAACTAGTAAACCCGTCCGGGAGATCCGAGGGAGGGCGACTTCTGT  
CGCTTACCCCGGCCTCCTTGGGCACCTATGGCCGCCCCCGTCCTGCCTCGTT  
GCAGAACGGGCGGCGGGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGACTA  
GTGCTTTAGAGGATCACCGTGTGCTGCATCGCCCGTCGAGGCGGCGCACGA  
TGTGGTCTGGTAATCATACCATGAACTTTACGACTCTTGGCAACGGATATCT  
TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT  
TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGC  
TATTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCATGCCTCACATCGCTCAGTG  
CCCCCGCCTCCCAAGGCCATAGCATTGGGAAAGCGGTTCGCGGCACGGATG  
CAGAGATTGACCTCGCGTGGCTTACCGCGCGGCGGATTGAAATGATTGTCG  
CTGGTTCGGGACGGACACAGTGAATGATGGACAGACACGAATGACACTGATG  
TCTGTGTACTCGAACCTCAGCCAGACCCGTGCGTGCAGCGCGTGCATGCCG  
ACGGTCGTTCAAGACCTTCGCTCGGACCACCCACCGCCAGTCAGGGCGCGG  
GCCACCCGACTTGAGTTCTAATCATATCACATGGGGGGGGGGAGGGGA



*Asparagus persicus* 6

CAGGGTTTCGATAAGTGACCTGCGGAGGATCATTGTCGAGACCCGAGCGGA  
CGACTGTGAACTAGTAAACCCGTCCGGGAGATCCGAGGGAGGGCGACTTCT  
GTCGCTTACCCCGGCCTCCTTGGGCACCTATGGCCGCCCCCGTCCTGCCTCG  
TTGCAGAACGGGCGGCGGGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGAC  
TAGTGCTTTAGAGGATCACCGTGTGCTGCATCGCCCGTCGAGGCGGCGCAC  
GATGTGGTCTGGTAATCATACCATGAACTTTACGACTCTTGGCAACGGATAT  
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGA  
ATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGAG  
GCTATTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCATGCCTCACATCGCTCAG  
TGCCCCCGCCTCCCAAGGCCATAGCATTGGGAAAGCGGTGCGGGCGCGGA  
TGCAGAGATTGACCTCGCGTGCCTTACGGCGCGGCGGGTTGAAATGATTGT  
CGCTGGTTCGGGACGGACACGGCGAATGGTGGACAGACACGAATGACGCTG  
AGCGCTGTGTAICTCGAACCTAAGCCAAAGCGGCGCGTGCAAGGAGCCCATG  
CCGACGGGCGTTCAAGAACGCCCTCGGACCACGACCCCAAGTCAGGCGGG  
GCCACCCGCTGAGATTTATAGTCATATCAAATAGAGACGGGAGGAA

*Asparagus officinalis*

TGCGCTTATCTAATAGTGACCTGCGGAGGATCATTGTCGAGACCCGAGCGG  
ACGACCGTGAACCTAGTAAACCCGTCCGGGAGATCCGAGGGAAGGCGACATC  
TGTCGCTTACCCCGGCCTCCTTGGGCACCTATGGCCGCCCCCGTCCTGCCTC  
GTTGCAGAACGGGGGGCGGGAACAATACCCGGCGCGGTGGGCGCCAAGGA  
CTAGTGCTTTAGAGGATCACCGTGTGCTGCATCGCCCATCGAGGCGGCGCA  
CGATGTGGTCCGGTAATCATACCATGAACTTTACGACTCTTGGCAACGGATA  
TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTG  
AATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCGA  
GGCTATTTGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCATGCCTCACATCGCTCA  
GTGCCCCCGCCTCCCAAGGCCATAGCATTGGGAAGCGGCGGCGCGGATGC  
GGAGATTGACCTCCCGTGCCTTGCGGCGCGGCGGGTTGAAATGATTGTGCT  
GGTTCGGGTCGGACACGGCGAATGGTGGACAGACACAAATGACGCTGAAAC  
GCTGTGTAICTCGACCCTAAGCCAAAGCGGCGCGTGCAAGGAGCCCATGCCG  
ACGGGCGTTCAAGAACGCCCTTCGGACCACGACCCCAAGTCAGCGGGGCCA  
CCCGCTGAGTTTAAGCATATCAAAAAAAGGGCGGAGAGAGA

*Asparagus palaestinus*

GGTGGGCCGGCACTTTTTTTTGTACTCTTTTTTTCTTTTTAATGATCTTGGC  
CCCACACCCAAGCGGACTACCGTTTAAATAATACTTTTAAAAAAGGGAGAT  
CCGAGGGAGGGCGACTTCGGTTCGGTGGGCCCCGGCCTACTTGCACCTAA  
AAAAAAGACCCCGTCCTGCCTCGTTGCAAACGGGCGGCGGAGGAGAATACC  
TTTGCTCCAAAGGAAAGACAAGGACTATTTTCTTTATAGGATCACCGTGTGC  
TGCATCGCCCATCGAGGCGGCGCACGATGTGGTCCGGGTAATCATACCATG  
AACTTTACGACTCTTGGCAACGGATATCTTGGGCTCTCGCATCGATGAAGAA  
CGTAGCGAAATGCGATACTTGGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATC  
GAGTCTTCGAACGCAAGTATGCGCCCCGAGGCTTTTTTGGCCGAAGGCACGCC

TGCCTGGGCGTCATGCCTCAACTTCGCTCAATGCCCCCGCCTCCCAAGGCC  
CATAGCATTGGAAACTCGG



## EK-2 Çalışılan Türlerin trnL-F Bölgesine Ait Diziler

### *Polygonatum hookeri* (Dış grup)

AATAAAAAGCCCATTTTACTTCTTAACTATTTAGTTATTCTCTTTTTTTTTTCAT  
AAGAAGTTCAAAGAAAATTCAATATCTTTCTCATTTCATTCTACTCTTTCACA  
AACGGATCCGAACAGAAATCTTTTGATCTTATCCTAATTTGGTTTGAATGGA  
TACGATACCTGTACAAATAAACATATATAATTGACATAATTGAAGTCCATAT  
CACTTACAACCTTACATTCAAAAATAAAGTCTTCTTTTTGAAGATCTAAGAAA  
TTCGGGGACTAGGTCAAATTTTGGGAATACCTTTTTTAGTCTATGTAATTTCCA  
TAGATACAAGTACTCCGCTAGTATGATGCGCGGGAAATGGTTCGGGAGGCTC  
AGTG

### *Polygonatum pubescens* (Dış grup)

CTCTATCCCCAATAAAAAGCCCATTTTACTTCTTAACTATTTAGTTATTCTCT  
TTTTTTTTTCATAAGAAATTCAAAGAAAATTCAATATCTTTCTCATTTCATTCT  
ACTCTTTCACAAACGGATCCGAACAGAAATCTTTTGATCTTATCCTAATTTG  
GTTTGAATGGATACGATACCTGTACAAATAAACATATATAATTGACATAATT  
GAAGTCCATATCACTTACAACCTTACATTCAAAAAGAAAGTCTTCTTTTTGAA  
GATCTAAGAAATTCGGGGACTAGGTCAAATTTTGGGAATACTTTTTTTAGTCT  
ATCTAATTTCCATAGATACAAGTACTCCGCTAGTATGATGCACGGGAAATG  
GTCGGGATAGCTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGTCC

### *Asparagus persicus 1*

GGGCTTCAACTGAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGGATCCTAGTAGAA  
GTAAGTGGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAAGTATTTAAAAATTT  
AACCTAGTCCCCGATTTCTTAGATCTTTAAAAAGAAGAATCCTCTGTAAGTT  
GTAAGTGGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAAGTATTTAAAAATTT  
TATGTTTCAATTCGTACATGTATGAGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAGA  
TCCAAAGATTTTCCGTTTCGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAAC  
AGATATTTGAATTTTTCTTTTGAACCTTCTTATGAAAAAAAAGAGGATAAA  
ATAGTTAATTTAAAAAATGGGGCTTTTTATTGGGGATAGAGGGCCTTTGAAA  
CAA

### *Asparagus persicus 2*

AAGTCTGCTTCACTGAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGATCCTAGTAGA  
GTAAGTGGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAAGTATTTAAAAATTTA  
ACCTAGTCCCCGATTTCTTAGATCTTTAAAAAGAAGACTTTCTGTAAGTTGT  
AAGTGGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAAGTATTTAAAAATTTA  
GTTTCAATTCGTACATGTATGGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAGATCCA  
AAGATTTCTGTTTCGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAACAGATA  
TTGAATTTCTTTGAACCTTCTTATGAAAAAAAAGAGGATAAATAGTTAAT  
TAAAAAATGGGGCTTTTTATTGGGGATAGAGAACTTGGGACCA

*Asparagus persicus 3*

GGTCCGCTCTCACTGAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGATCCTAGTAG  
AGTACTTGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAGTATTTAAAAATTT  
AACCTAGTCCCGATTTCTTAGATCTTTAAAAAGAAGACTTTCTGTAAGTTG  
TAAGTGATATGGACTGTGAATAATTCAATAATGGGTAATTCCTTGACCATAT  
ATGTTCAATTTGTACATGTATGGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAGATC  
CAAAGATTTCTGTTCTGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAACAG  
ATATTGAATTTTCTTTTGAACCTTCTTATGAAAAAAAAAAGAGGATAAATAGT  
TAATTAATAAATGGGCTTTTTATTGGGGTAGAGGGACTTTTGAACCCA

*Asparagus persicus 4*

CTGGCTTCACTGAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGATCCTAGTAGAGT  
ACTTGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAGTATTTAAAAATTTAA  
CCTAGTCCCGATTTCTTAGATCTTTAAAAAGAAGACTTTCTGTAAGTTGTA  
AGTGATATGGACTGTGAATAATTCAATAATAGGTAATTCCTTGACCATATAT  
GTTCAATTTGTACATGTATGGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAGATCCA  
AAGATTTCTGTTCTGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAACAGATA  
TTGAATTTTCTTTGAACTTCTTATGAAAAAAAAAAGAGGATAAATAGTTAAT  
TAAAAAATGGGCTTTTTATTGGGGATAGAGGAACCTTAGAACCA

*Asparagus persicus 5*

ATTGGCTCTCCAAGTCTGAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGATCCTAGTA  
GAGTACTTGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAGTATTTAAAAAT  
TTAACCTAGTCCCGATTTCTTAGATCTTTAAAAAGAAGACTTTCTGTAAGT  
TGTAAGTGATATGGACTGTGAATAATTCAATAATGGTAATTCCTTGACCATA  
TATGTTCAATTTGTACATGTATGGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAGAT  
CCAAAGATTTCTGTTCTGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAACAG  
ATATTGAATTTTCTTTGAACTTCTTATGAAAAAAAAAAGAGGATAAATAGTT  
AATTAATAAATGGGCTTTTTATTGGGGATAGAGGACCTTGAACCAA

*Asparagus persicus 6*

ATCCCGGCCCTAAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGATCCTAG  
TAGAGTACTTGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAGTATTTAAAA  
ATTTAACCTAGTCCCGATTTCTTAGATCTTTAAAAAGAAGACTTTCTGTAA  
GTTGTAAGTGATATGGACTGTGAATAATTCAATAATGGTAATTCCTTGACCA  
TATATGTTCAATTTGTACATGTATGGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAG  
ATCCAAAGATTTCTGTTCTGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAAC  
AGATATTGAATTTTCTTTGAACTTCTTATGAAAAAAAAAAGAGGATAAATA  
GTTAATTAATAAATGGGCTTTTTATTGGGGATAGAGGGACTTGAACCA

*Asparagus officinalis*

GCTGTCTTCCACTGAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGATCCTAGTAGA  
GTAAGTACTTGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAGTATTTAAAAATTTA  
ACCTAGTCCCGATTTCTTAGATCTTTAAAAAGAAGACTTTCTGTAAGTTGT  
AAGTGATATGGACTGTGAATAATTCAATAATGGGTAATTCCTTCGACCATAT  
ATGTTCAATTTGTACATGTATGGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAGATC  
CAAAGATTTCTGTTTCGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAACAG  
ATATTGAATTTTCTTTGAACTTCTTATGAAAAAAAAAAGAGGATAAATAGTTA  
ATTAATAAATGGGGCTTTTTATTTGGGGTAAGATGAACTTTGAAACAA

*Asparagus palaestinus*

ATTTAGACTATCAACTGAGCTATCCCGACCATTTCCCGCGCATGATCCTAGT  
AGAGTACTTGTATCTATGGAAATTAATAGACTAAAAAAGTATTTAAAAA  
TTAACCTAGTCCCGATTTCTTAGATCTTTAGAGAGAAGACTTTCTGTAAG  
TTGTAAGTGATATGGACTGTGAATAATTCAATAATGGTAATTCCTTGACCAT  
ATATGTTCAATTTGTACATGTATGGTATCTATTCAAACCAAATTAGGATAAGA  
TCCAAAGATTTCTGTTTCGAATCCGTTTTTTGAAAGAGTCGAATCAATGAAACA  
GATATTGAATTTTCTTTGAACTTCTTATGAAAAAAAAAAGAGGATAAATAGT  
TAATTAATAAATGGGGCTTTTTATTTGGGGATAGAGGGACTTGAACC

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Serdar ALTINTAŞ  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Siverek 03.07.1988  
**Telefon** : 544-2711116  
**E-posta** : serdaraltintas@siirt.edu.tr  
**Adres** : Siirt Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Özel Murat Koleji	2005
Üniversite	: Uludağ Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	: Siirt Üniversitesi	2016

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2013- Devam ediyor	Siirt Üniversitesi	Arş. Gör.

### UZMANLIK ALANI

Sebze Yetiştiriciliği ve Islahı, Tarımsal Biyoteknoloji

### YABANCI DİLLER

İngilizce