

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***GALANTHUS SSP. TÜRLERİNDE GENETİK
VARYASYONUN AFLP (Amplified Fragment Length
Polymorphism) DNA MARKÖRLERİYLE
SAPTANMASI***

İbrahim UZAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi:03.08.2010

**Bornova-İZMİR
2010**

İBRAHİM UZAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*GALANTHUS SSP.* TÜRLERİNDE GENETİK VARYASYONUN AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) DNA MARKÖRLERİYLE SAPTANMASI” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.08.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : DOÇ.DR. BAHATTİN TANYOLAÇ
Raportör Üye : PROF.DR. AYNUR GÜREL
Üye : PROF.DR. MUZAFFER TOSUN

İmza



ÖZET***GALANTHUS SSP. TÜRLERİNDE GENETİK VARYASYONUN
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) DNA
MARKÖRLERİYLE SAPTANMASI***

UZAN, İbrahim

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç.Dr. Bahattin TANYOLAÇ

Eylül 2010, 49 Sayfa

Bu tezde, sistematik ve taksonomik olarak tartışmalara neden olan ve ekonomik olarak önem taşıyan, ülkemizdeki bazı *Galanthus* türlerinin AFLP yöntemiyle aralarındaki benzerlikler analiz edilmiştir.

Galanthus cinslerinde, taksonomik ve sistematik olarak gelişen problemler, bu cinsteki türlerin morfolojik olarak yakın özellik taşımasından ve ayırt edici özellik oranlarının az olmasından meydana gelmektedir.

Bu sorunun çözümüne yardımcı olabilmek için AFLP DNA markır tekniğini kullanılarak, daha tutarlı sonuçlar elde edilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar sözcükler: AFLP, *Galanthus*, taksonomi, sistematik.

ABSTRACT

GENETIC VARIATION ANALYSIS OF GALANTHUS SSP. BY AFLP (Amplified fragment Length Polymorphism) DNA MARKERS

Uzan, Ibrahim

MSc in Biotechnology Department

Supervisor: Assoc.Prof. Bahattin TANYOLAÇ

September 2010, 49 Pages

In this thesis, some of the native *Galanthus* species, has economical value, have been analysed, which are cause in taxsonomical and systematical debates,

In genus of *Galanthus*, taxanomical and systematical problems have been continuing because of their similarities of morphological properties.

It was aimed that using of AFLP DNA marker technique which can search whole genom, may have solved this problem.

Key words: AFLP, Galanthus, taxanomi, systematic

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Doç.Dr. Bahattin TANYOLAÇ'a, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme özellikle ağabeyim Op. Dr. Ümit Uzan'a, laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Filiz ALTAN'a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma ve hep desteklerini hissettiğim arkadaşlarım Melis OLÇUM'a, Tuna NESİL'e Ayrıca TÜBİTAK-BSAG'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR VE SİMGE DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	7
3.1 Gereç.....	7
3.1.2 Yöntem	9
3.1.2.1 DNA İzolasyonu	9
3.1.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)Analizi10	
3.1.2.2.1 Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi ..	10
3.1.2.2.2 Adaptörlerin Ligasyonu	11
3.1.2.2.3 Pre-Amplifikasyon.....	11
3.1.2.2.4 Selektif AFLP Amplifikasyonu	11
3.1.2.2.5 Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	13
3.1.2.2.6 AFLP Bilgisayar Programlarının Çalıştırılması	13
3.1.2.2.7 Cam Aparatların Cihaza Yerleştirilmesi.....	14
3.1.2.2.8 Örneklerin Yüklenmesi.....	14
3.1.2.2.9 Markör Analizlerinin Sonuçlarının Skorlanması.....	14
4. BULGULAR	15
5. TARTIŞMA.....	25
EKLER	28
KAYNAKALAR DİZİNİ.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil 1.1 : Ülkemizde ve Dünya’da yayılış gösteren bazı Galanthus türleri	11
Tablo: 3.1 Çalışmada kullanılan Galanthus türleri ve lokasyonları.....	16
Tablo: 3.1 Çalışmada kullanılan Galanthus türleri ve lokasyonları (devamı)	17
Tablo: 3.1 Çalışmada kullanılan Galanthus türleri ve lokasyonları(devamı)	18
Tablo 3.2 Bir örnek için kullanılan kokteyl içeriği ve miktarları	19
Tablo 3.3 Bir örnek için ligasyon amacı ile hazırlanan kokteyl içeriği ve miktarları	19
Tablo 3.4 Bir örnek için pre-amplifikasyonda hazırlanan kokteyl içeriği ve miktarları	20
Tablo 3.5 PCR için uygulanan reaksiyon basamakları	20
Tablo 3.6 Selektif amplifikasyon için kullanılan kokteyl içeriği ve miktarları .	20
Tablo 3.7 AFLP analizlerinde kullanılan primer kombinasyonları	21
Tablo 3.8 Selektif amplifikasyon için uygulanan reaksiyon basamakları	21
Şekil 4.1: MCTC- EAGG (800) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü.....	24
Şekil 4.2: MCTA- EACA (700) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü.....	25
Şekil 4.3: MCAA- EAAC (700) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü	26
Şekil 4.4 : MCAA- EAAG (700) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü	27
Tablo 4.1: Denenmiş primer kombinasyonları ve elde edilen polimorfik bant sayıları	28
Tablo 4.2: Çalışmada kullanılmış Galanthus türlerinin aralarındaki benzerliklere göre dağılımı.....	29
Tablo 4.3: Galanthus türleri arasındaki benzerlikleri gösteren analiz tablosu	30
Tablo 4.4: G. trojanus türlerinin tür içi benzerlik tablosu.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

	Sayfa
Tablo 4.5: <i>G.rizehensis</i> türlerinin tür içi benzerlik tablosu.....	31
Tablo 4.6: <i>G. fosterii</i> türlerinin tür içi benzerlik tablosu.....	31
Tablo 4.9: <i>G.elwesii</i> türlerine ait tür içi benzerlik tablosu.....	31
Tablo 4.8: <i>G.woronowii</i> türlerine ait tür içi benzerlik tablosu.....	31
Tablo 4.7: <i>G.gracilis</i> türlerinin tür içi benzerlik tablosu	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
PCR	Polimerase Chain Reaction
<i>ng</i>	Nanogram

1.GİRİŞ

Amaryllidaceae familyası, 75 cins, 1100 tür içeren büyük bir familyadır. Bu familya üyeleri sıcak ılıman, subtropikal, ve tropikal bölgelerde yayılış gösteren ekonomik değere sahip üyelerdir. Özellikle familya içinde *Galanthus* (Kardelen) ve *Narcissus* cinsleri dünyada yaygın şekilde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Heywood, 1978). Genelde bütün türleri kültüre edilmiş ve 500'ün üzerinde kültür formu tanımlanmıştır (Bishop et al. 2001).

Galanthus cinsine ait türlerin yayılış alanı Avrupa, Anadolu ve yakın doğudur (Davis 1999, Bishop et al. 2001). Kaynaklarda *Galanthus* üzerine çok fazla bilgi olmasına rağmen (Stern 1956, Artjushenko 1966, Davis 1999, Bishop et al. 2001), *Galanthus* cinsinin taksonomik olarak tanımlanması genelde zordur. (Zonneveld et. al, 2003). Türkiye florasında bulunan *Galanthus* türleri tartışmalara neden olacak kadar yakın morfolojik özelliklere sahiptir. Özellikle *Galanthus*, *Leucojum* cinsleri arasında bu durum fark edilmektedir. Fakat çiçek sayısı, anterlerin yapısı gibi morfolojik farklılıklar ile ayrılmıştır (Brickell, 1984.)

Galanthus, içeriğinde antiviral, sitotoksik, antimalarial ve antiinflamatuvar etkiye sahip olan Lycoserin alkaloidi ve aynı zamanda lektin içermesi nedeniyle tıbbi açıdan önem taşıyan bir cinstir. Lycoserin alkaloidi, özellikle Alzhemier hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların içeriğinde bulunmaktadır. Türkiye'de halk arasında, toprak üstü kısımları kalbi kuvvetlendirici, mideye iyi gelen ve adet söktürücü ilaç; toprak altı kısımları ise taze haldeyken ezilerek, çıbanları olgunlaştırmak için hazırlanan lapa olarak kullanılır.



Şekil 1.1 : Ülkemizde ve Dünya’da yayılış gösteren bazı Galanthus türleri (üsttekiler soldan sağa sırasıyla: *G.trojanus*, *G.peshmeni*, *G.plicatus subsp. bryzantianus*, *G.elwesii*; alttakiler soldan sağa sırasıyla: *G.fosterii*, *G.gracilis*, *G.krasnovii*, *G.woronovi*)

Son 20 yılda, DNA parmak izi analiz yöntemlerinin gelişmesiyle, bitkilerde genetik çeşitliliğin belirlenmesi hız kazanmıştır. RAPD, ISSR, SSR gibi birçok markör tekniği kültüre edilmiş ya da yabani formda bulunan bitkilerin genetik varyasyonunu bulmak için kullanılmıştır (Yang et. al., 2008). Ülkemizde yayılış gösteren 12 *Galanthus* türünde, daha önce yapılan çalışmalara göre birçok tür arasında gen değişiminin yüksek olduğu, bu nedenle genetik varyasyonun yüksek olduğu bildirilmiştir (Zonneveld et al. 2003). Fakat morfolojik olarak yakın benzerlik göstermeleri, taksonomik ve sistematik açısından tartışmalara neden olmaktadır. Bu cins içinde yapılan gerek morfolojik, gerek moleküler olarak yapılan analizlerde, varyasyonun geniş olmasına karşın kısıtlı özellikler kullanılarak, farklılıklar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle, *Galanthus* cinslerinin tüm genomunun analiz yapılması çok daha tutarlıdır (Ekim vd. 2000).

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) yöntemi son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu markör yöntemi yüksek çeşitlilik oranı sağlamaktadır. Kısıtlı sayıda primer kombinasyonu ile bütün genomu görüntülemek mümkündür. (Faccioli et al., 1999). Geliştirilmiş bu yöntem ile canlıların parmak izi analizleri ve genom haritaları elde edilmektedir (Vos et al,

1995). Yapılan çalışmalarda AFLP tekniğinin diğer yöntemlere göre daha etkili ve daha tutarlı olduğu saptanmıştır (Despres et.al., 2002).

AFLP tekniğinden kullanılarak büyük oranda polimorfik bant belirlemek mümkündür. Aynı zamanda populasyon içinde bireylerin tek tek kökenlerinin analizi (Krauss, 1999), gen akışı denemelerinde, bitkilerin varyete kaynaklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. En önemli avantajı ise i) sekans bilgisi gerekmemektedir; ii) hızlı PCR tekniği ile sonuca ulaşılır (Rafalski et. al., 1996).

Bu çalışmanın amacı; Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış *Galanthus* cinsine ait 11 türü temsil eden 47 örneğin genetik benzerliklerini ortaya çıkararak taksonomik sınıflandırmalarını belirlemektir.

2.LİTERATÜR ÖZETLERİ

P. Davis and R.Barnett (1996), anatomik verilere dayalı olarak yaptıkları çalışmada *Galanthus* türlerini hücre şekilleri, mum tabakası ve enine kesitte hava boşlukları, hücrelerin dizilimi, dokuların yapıları değerlendirip gruplama yapmışlardır. Çalışmadaki *Galanthus* türlerini 8 grupta toplamışlar, grupları şu şekilde oluşturmuşlardır: **Grup 1:** *Galanthus niualis* subsp. *nivalis*, *Galanthus reginae-olgae* subsp. *vernalis*. *Galanthus reginae-olgae* subsp. *reenae-olgae*, *Galanthus regnae-olgae* subsp. *corgrensis*, *Galanthus peshmeni*, **Grup2:** *Galanthus plicatus* subsp. *plicatus*, *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus*, **Grup 3:** *Galanthus elwesii*, *Galanthus gracilis* **Grup 4:** *Galanthus caucasicus*, *Galanthus alpinus*, *Galanthus bortkewitschianus*, *Galanthus cilicicus*, *Galanthus koenenianus*, *Galanthus niualis* subsp. *angustifolius*, **Grup 5:** *Galanthus lagodechianus*, *Galanthus rizehensis*. **Grup 6:** *Galanthus woronowii*, *Galanthus fosteri*, *Galanthus transcaucasicus*, *Galanthus allenii*, **Grup 7:** *Galanthus ikariae* subsp. *ikariae*, *Galanthus ikariae* subsp. *snogempii*, **Grup 8:** *Galanthus krasnovii*, *Galanthus platyphyllus*.

Ekim vd, (2000), yaptıkları çalışmada ülkemizde yayılış gösteren 12 adet *Galanthus* türünü morfolojik ve moleküler verilere dayandırarak taksonomik olarak ayırmışlardır. Moleküler verileri hem kloroplast genomu, hem de çekirdek genomuna dayalı tekniklerle uygulamışlardır. Buldukları verilere göre: coğrafik izolasyon nedeniyle *G. cilicicus* ve *G. peshmenii* türleri arasında morfolojik farklılığın, moleküler olarak da kanıtlandığını belirlemişlerdir. Trabzon – Ordu arasından toplanan *G. rizehensis* ve *G. woronowi* türleri arasında dağılım homojen olarak belirlemişler, fakat iki tür arasında geçiş noktası olarak belirlenen Rize Derepazarı'ndan elde edilen bir türün hibrit olabileceğini öngörmüşlerdir. Çanakkale- Balıkesir hattından toplanan *G.trojanus* örneklerinde, ITS ve kloroplast dizileri açısından kendi içinde farklılık belirlenememiş, aynı bölgede bulunan *G.elwesi* ve *G.gracilis* popülasyonlarından ayrı bir gruba toplanmışlardır. Sonuç olarak ayırlama sağlamada Maximum Parsimony (MP), Neighbour Joining (NJ) ve Minimum Evolution (ME) analiz metodlarını kullanarak, taksonları 3 ana gruba toplamışlardır. *G.peshmenii*, *G.cilicicus*, *G.gracilis* ve *G.elwesii*'yi içeren Glaucaefolii dalı, bağımsız bir dal oluşturan *G. fosteri* ile ITS benzerlik tablosuna benzer olarak, bağımsız bir dal oluşturmuş. Ayrıca *G. trojanus* ayrı gruplar olarak tanımlamışlardır.

Balasaravanan et al. (2003), bu çalışmada Hindistan çayı olarak bilinen *Camelia* cinsine ait 4 türü incelemişlerdir. İnceleme için AFLP DNA markör tekniğini kullanarak, 49 kültüre edilmiş çay bitkisinin aralarındaki genetik benzerliği ortaya çıkarmışlardır. Denemede 3 primer kombinasyonu ile çalışmışlar, toplam 1555 adet bant belirlemişlerdir. Primer başına ortalama 518.9 polimorfik bant elde etmişlerdir. Ayrıca 87.43 ile 359.03 baz çifti arasında bant elde etmişlerdir. UPASI-22 ve UPASI-23 kültür örnekleri arasında %92 benzerlik belirlemişlerdir. Yapılan AFLP analizlerine bağlı olarak UPASI-18 ve UPASI-24 örnekleri hariç bütün kültür formlarının aynı grupta toplandıklarını bildirmişlerdir. Toplanan örneklerin, buldukları alanlara göre 4 büyük grup altında toplandıklarını bildirmişlerdir. Oluşan gruplarının bazılarının içinde alt gruplar belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada AFLP markör tekniğinin çay bitkisi için çok kullanışlı bir araç olduğu bildirilmiştir.

Zonneveld et al. (2003), *Galanthus* bitkisinde flow sitokiyometri yöntemiyle bilinen tüm türlerinde genom büyüklükleri incelenmiştir. Bulunan sonuçlar Stern (1956) ve Davis (1999,2001)'in morfolojik karakter analizlerine dayandırılmıştır. Tür içi varyasyonun düşük olduğunu ispatlamışlar; türler arası varyasyonun ise genom büyüklüğü diploid olan *Galanthus* türlerinde DNA ağırlığı 48,6 ve 90,4 pg arasında olduğunu bildirmişlerdir. *G. gracilis* ve *G. elwesii* türlerinin birbirine çok yakın olduğunu belirlemişler, *G. gracilis*, *G. elwesii*, *G. peshmeni*, *G. koenenianus* türlerini *Glaucaefolii* alt grubu altında toplamışlardır. Yapılan çalışmada *G. fosteri*, *G. krasnovii*, *G. rizehensis*, *G. trojanus* ve *G. woronowii* türleri *Viridifolii* alt grubu altında toplamışlardır. *G. rizehensis* türünün en az genom büyüklüğü taşımasıyla *Galanthus* türlerinin atası olarak belirlemişlerdir. Jeocoğrafik olarak diğer türlerden ayrılan *G. trojanus* türü, *G. woronowii* türüyle yakından benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Sudupak vd., (2003), yapılan çalışmada ülkemizde bulunan çok yıllık ve tek yıllık *Cicer* türleri arasındaki genetik benzerlikleri AFLP metodunu kullanarak belirlemişlerdir. Toplam 47 bireyin bulunduğu 10 türden, dördü çok yıllık, altısı tek yıllık olmak üzere bezelye türlerini incelemişler, 3 primer kombinasyonunu kullanarak, toplam 306 adet markır belirlemişler ve polimorfik bant sayısını %99.67 olarak bildirmişlerdir. Çalışmada türlere ait örneklerin bir araya geldiğini saptamışlardır. Belirlenen grupların arasında, üreme ve genetik varyasyonun dağılımına ait korelasyonun, tür içinde düşük olduğunu, türler arasında yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Chen et al., (2004), çalışmada doğu kökenli, *Aglonema* cinsini incelemişlerdir. Kullanılan örneklerden dokuzu kültüre edilmiş birey olmak üzere çalışmada toplam 54 örnek kullanılmıştır. Altı primer kombinasyonu denenmiştir. Toplam 449 markör elde etmişler ve yaklaşık %70'ni (314) polimorfik olarak belirlemişlerdir. En yüksek 86 polimorfik bant veren kombinasyonu EAGG/MCAA olarak belirlemişlerdir. Elde edilen görüntülere göre DNA genom

aralığı 50-565 baz çifti arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Türler aralarındaki benzerliğe göre 7 grup oluştuğunu, oluşan grupların morfolojik özellikleri yakın örnekler içinde toplandığını belirtmişlerdir.

Lledo et al. (2004), Ülkemiz'den toplanmış *Galanthus* türlerinin de bulunduğu çalışmada MatK ve ITS primerleri kullanarak moleküler verileri değerlendirmişler, matk analizine göre yapılan dendrogramda *G.krosnovii*, *G. fosteri*, *G. platyphyllus* türleri bir araya gelmiş *Latifolii* serisinin bir bölümünü oluşturmuş, *G.reginae-olgea*, *G.vernalis*, *G.reginae-olgea sb. vernalis* türleri *Galanthus* serisi altına toplanmış, *G. cilicicus*, *G. elwesii*, *G.alpinus*, *G. woronowii*, *G.gracilis* türleri de diğer *Latifolii* serisini meydana getirmişlerdir.

ITS verilerine göre, *G. fosteri*, *G. woronowii*, yine aynı bölgede belirlenmiş *Latifolii* serisini oluşturmuşlar, *G. nivalis*, *G.plicatus*, *G.reginea-olgea*, türler bir araya gelerek *Galanthus* serisini, *Latifolii*'nin diğer serisini de *G.cilicicus*, *G.elwesii*, *G. gracilis* ve *G. krasnowi*, türleri meydana getirmiştir. Ayrıca *Galanthus* cinsinin tek atadan türevlendiğini, *Leucojum* cinsinin de *Galanthus* cinsinden türevlendiğini belirlemişlerdir.

Lamote et al., (2005), Bu çalışmada Avrupa' da denizsel ortamlarda rastlanan *Typha latifoli* ve *Typha angustifolia* türlerini AFLP DNA markör tekniğini kullanarak aralarındaki genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. Çalışmada dört primer kombinasyonu denemişler, belirlenen 177 skorlanmış AFLP markörünün 144'ünü polimorfik bulmuşlar ve primer kombinasyonu başına ortalama 24 polimorfik bant elde etmişlerdir. En yüksek 41 polimorfik bant veren E_{ACT}/M_{CTG} primer kombinasyonunu belirlemişlerdir. Elde edilen benzerliklere göre en yüksek % 94 benzerlik oranı olduğunu belirlemişlerdir.

Khalighi et al., (2007), Ortadoğu ve çevresinde bulunan toplam 31 *Triticum* ve *Aegilops* türlerinin genetik çeşitliliğini belirlemişlerdir. 14 primer

kombinasyonu kullanarak, 387'si polimorfik olmak üzere toplam 414 bant elde etmişlerdir. Primer kombinasyonları arasında en fazla 47 (P_{AAG}/M_{CGT}), en az (P_{AAG}/M_{CAA}) olmak üzere polimorfik bant elde etmişlerdir. Sonuç olarak 2 ana grup altında örnekleri gruplamışlar, elde edilen gruplar da kendi aralarında yabancı tetraploid, kültüre edilmiş tetraploid ya da hekzaploid bireyler olarak ayrımlanmıştır.

Yong and Williams (2008), bu çalışmada sera ortamında yetiştirilmiş 25 *Avena* türüne ait, toplam 163 örnekte AFLP DNA markör tekniğini kullanarak aralarındaki varyasyonu belirlemişlerdir. Beş primer kombinasyonu kullanmışlar, 413 polimorfik bant skorlamışlardır. Primer kombinasyonlarından en yüksek 122 polimorfik bant elde edilen E_{AAG}/M_{CAC} primeri, en az 57 polimorfik bant ile E_{ACT}/M_{CGC} primelerini elde etmişlerdir. Elde edilen gruplarda türlerin taşıdıkları genom büyüklüğüne göre dağılım gösterdiklerini belirtmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Türkiye'deki farklı coğrafi bölgelerden Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından toplanmış örnekler Tablo 3.1'de verilmiştir. Yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılmaya kadar -86°C derecede bekletilmişlerdir.

Tablo: 3.1 Çalışmada kullanılan *Galanthus* türleri ve lokasyonları.

NO	TÜR ADI	LOKASYON
1	<i>Galanthus trojanus</i>	Bayramiç-Çanakkale
2	<i>Galanthus trojanus</i>	Bayramiç-Çanakkale
3	<i>Galanthus trojanus</i>	Çan-Çanakkale
4	<i>Galanthus woronowii</i>	Çaykara-Trabzon
5	<i>Galanthus woronowii</i>	Derepazarı-Trabzon
6	<i>Galanthus woronowii</i>	Doğankent, Trabzon

7	<i>Galanthus rizehensis</i>	Hamsiköy, Trabzon
8	<i>Galanthus rizehensis</i>	Derepazarı, Trabzon
9	<i>Galanthus rizehensis</i>	Sümela-Maçka, Trabzon
10	<i>Galanthus elwesii</i>	Soğucak-Balıkesir
11	<i>Galanthus cilicicus</i>	Yeniköy, Mersin
12	<i>Galanthus peshmenii</i>	Kemer, Antalya
13	<i>Galanthus woronowii</i>	Arhavi, Artvin
14	<i>Galanthus woronowii</i>	Aralık köyü, Artvin
15	<i>Galanthus woronowii</i>	Borçka-Aralık, Artvin
16	<i>Galanthus woronowii</i>	Sarp-Artvin
17	<i>Galanthus elwesii</i>	Karaburun-İzmir
18	<i>Galanthus gracilis</i>	Nifdağı-Kemalpaşa, İzmir
19	<i>Galanthus elwesii</i>	Spil dağı, Manisa
20	<i>Galanthus elwesii</i>	Karagöl-Yamanlar, İzmir
21	<i>Galanthus elwesii</i>	Kozak, Bergama, İzmir
22	<i>Galanthus gracilis</i>	Bozdağ-Ödemiş, İzmir
23	<i>G. plicatus subsp. byzantinus</i>	Abant Gölü-Bolu
24	<i>Galanthus krasnovii</i>	Artvin
25	<i>Galanthus gracilis</i>	Şarköy, Tekirdağ
26	<i>Galanthus woronowii</i>	Araklı-Çatak, Trabzon
27	<i>Galanthus gracilis</i>	Mermeroluk-Bozdağ, İzmir
28	<i>Galanthus elwesii</i>	Alankıyı-Bayındır, İzmir
29	<i>Galanthus elwesii</i>	Menemen, Turgutlar, İzmir
30	<i>Galanthus elwesii</i>	Osmaniye
31	<i>Galanthus fosterii</i>	Acarobası-Gaziantep
32	<i>Galanthus fosterii</i>	Belen-Hatay
33	<i>Galanthus elwesii</i>	Demirci-Manisa
34	<i>Galanthus gracilis</i>	Yılanlıdağ-Muğla
35	<i>Galanthus elwesii</i>	Akseki, Antalya
36	<i>Galanthus elwesii</i>	Akseki, Antalya
37	<i>Galanthus elwesii</i>	İbradi, Antalya
38	<i>Galanthus elwesii</i>	Manavgat, Antalya

39	<i>Galanthus elwesii</i>	Alanya, Antalya
40	<i>Galanthus elwesii</i>	Glnar, Mersin
41	<i>Galanthus elwesii</i>	Glnar, Mersin
42	<i>Galanthus nivalis</i>	İğneada, Kırklareli
43	<i>Galanthus gracilis</i>	Selimiye, Muğla
44	<i>Galanthus fosterii</i>	Amasya
45	<i>Galanthus koenianus</i>	Yağmurdere, Gmhane
46	<i>Galanthus woronowii</i>	Borçka, Artvin
47	<i>Galanthus woronowii</i>	Hopa, Artvin

3.1.2 Yntem

3.1.2.1 DNA İzolasyonu

Yaprak rnekleri – 86 °C’de bekletildikten sonra, DNA izolasyonu iin Promega firmasından sipariş edilen kit kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir. Uygulanan DNA izolasyon protokolü aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. 40 mg tartılan her bir örnek ependorflara alınarak sıvı azot yardımıyla parçalanmıştır.
2. 600 µl Nclei Lysis buffer ilave edilip 1-3 dk vortekslenmitir.
3. 65 °C’de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.
4. 3 µl RNase solusyonu ilave edilerek yavaşça karıtırılmı ve 37 °C’de 15 dk inkubasyona bırakılmıştır.
5. Örnekler, inkübasyondan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. 200 µl protein çöktürme solusyonu ilave edildikten sonra yüksek hızda 20 sn vortexlenmitir.
6. 13.000-16.000 g’de 3dk santrifuj edilmiştir.
7. Süpernatant kısım temiz bir ependorfa alınmıştır.
8. 600 µl oda sıcaklığındaki isopropanol ilave edilmiştir.
9. Ependorf tüp alt üst edildikten sonra oda sıcaklığında 13.000-16.000 g’de 1 dk santrifüj yapılmıştır.

10. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine % 70'lik etanol ilave edilerek yıkama işlemi yapılmıştır.

11. 13.000-16.000 g'de 1 dk santrifüjlenerek pellet üstündeki sıvı boşaltılmıştır ve ependorfta hiç alkol kalmaması için bir gece kurumaya bırakılmıştır.

12. Alkol uçtuktan sonra 100 µl DNA rehidrasyon solusyonu ilave edilerek 65 °C'de 1 saat DNA'nın çözülmesi beklenmiştir.

3.1.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Analizi

AFLP analizleri için, LI-COR 4300 DNA Analyser cihazı kullanılmıştır. Her bir örneğin DNA'sı reaksiyon ortamında 150 ng olacak şekilde seyreltme işlemi yapılmıştır.

3.1.2.2.1 Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

Tablo 3.2 Bir örnek için kullanılan kokteyl içeriği ve miktarları

5 X Reaksiyon Tamponu	2.5 µl
EcorI/MseI Enzim Karışımı	5 µl
DNA (30 ng/ µl)	5 µl
Toplam Hacim	12.5 µl

Reaksiyon tüpleri içerisine Tablo 3.2'de yer alan karışım ilave edilmiş ve daha sonra Thermal Cycle cihazında 37 °C'de 2 saat, 70 °C'de 15 dk reaksiyona tabi tutulmuştur.

3.1.2.1.2 Adaptörlerin Ligasyonu

Tablo 3.3 Bir örnek için ligasyon amacı ile hazırlanan kokteyl içeriği ve miktarları

Restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA	12.5 µl
Adaptör Karışımı	12 µl
T4 DNA Ligaz	0.5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Reaksiyon ürünleri (Tablo 3.3), 20 °C’de 2 saat inkübasyon yapılmış ve sonrasında 10 µl alınıp, 90 µl TE tamponu ilave edilerek 1:10 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.1.3 Pre-Amplifikasyon

Tablo 3.4 Bir örnek için pre amplifikasyonda hazırlanan kokteyl içeriği ve miktarları

1:10 seyreltilmiş Ligasyon ürünleri	2.5 µl
AFLP 10 X Preamplifikasyon karışımı	20 µl
PCR Reaksiyon tamponu	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 unit/ µl)	0.5 µl
Toplam Hacim	25.5 µl

Tablo 3.4’ te yer alan karışım hazırlandıktan sonra aşağıdaki şekilde programlanmış ve Thermal Cycle’da inkübasyona bırakılmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5 PCR için uygulanan reaksiyon basamakları

1	94 °C	30 sn
2	56 °C	1 k
3	72 °C	1 k
4	1.2. ve 3. aşamalar	20 kez tekrarlanır
5	4 °C	∞

3.1.2.2.4 Selektif AFLP Amplifikasyonu

Selektif amplifikasyon aşamasında preamplifikasyon ürünleri 1:40 oranında seyreltilmiştir. Pre-amplifiye ürünleri farklı kombinasyonlarda primerlerle reaksiyona tabi tutulmuştur. Kullanılan EcoR1 primerleri IRDye 700 ve IRDye 800 floresan boya ile işaretlenmiştir. Reaksiyon işlemi aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6 Selektif amplifikasyon için kullanılan kokteyl içeriği ve miktarları**Taq DNA polimeraz karışımı**

Ultra saf su	158 μ l
10x Amplifikasyon Bufferı	40 μ l
Taq DNA (Roche) (0.5unit/ μ l)	2 μ l
Toplam Hacim	200 μ l

1x Kokteyl için:

Taq DNA polimeraz karışımı	6 μ l
Seyreltme işlemi yapılmış pre amplifiye DNA	2 μ l
MseI	2 μ l
EcorI (IRDye 700)	0.5 μ l
EcorI (IRDye 800)	0.5 μ l
Toplam hacim	11 μ l

Çalışmada 14 adet primer kombinasyonu denenmiş aralarından en uygun 7 primer kombinasyonu seçilerek toplam 14 primer 47 örnek üzerinde denenmiştir. Tablo 3.7’de kullanılan primerler sunulmuştur

Tablo 3.7 AFLP analizlerinde kullanılan primer kombinasyonları

M _{CAA} -E _{AAC} (700)	M _{CTC} -E _{ACT} (800)
M _{CAA} -E _{ACG} (800)	M _{CTC} -E _{ACA} (700)
M _{CAA} -E _{AAG} (700)	M _{CTC} -E _{AGC} (800)
M _{CAA} -E _{ACT} (800)	M _{CTC} -E _{ACC} (700)
M _{CAA} -E _{ACA} (700)	M _{CTC} -E _{AGG} (800)
M _{CAA} -E _{AGC} (800)	M _{CTA} -E _{ACA} (700)
M _{CTC} -E _{AAG} (700)	M _{CTA} -E _{AGC} (800)

(700: 700 nm dalga boyunu absorbe ettiğini belirtmektedir)

(800: 800nm dalga boyunu absorbe ettiğini belirtmektedir)

Selektif amplifikasyon için thermal cycle Tablo 3.8’de gibi programlanmıştır.

Tablo 3.8 Selektif amplifikasyon için uygulanan reaksiyon basamakları

1	94 °C	30 sn
2	65 °C	30 sn
3	72 °C	1 dk
4	94 °C	30 sn
5	65 °C	30 sn
6	72 °C	1 dk
7	94 °C	30 sn

Primerlerin bağlanma sıcaklığı 65 °C'den 56 °C'ye düşene kadar 0.7 °C azaltılarak döngüler devam ettirilmiştir. Bu tekrarlar da döngü sayısı 42'ye ulaştırılmıştır ve sonra 40 numaralı döngüye dönülerek işlem 23 defa tekrar edilmiştir. Kısa süreli muhafazası içinde thermal cycle 4 °C'de sonsuz şekilde beklemek üzere programlanmıştır.

3.1.2.2.5 Poliakrilamid Jel Elektforezi

Poliakrilamid Jel Elektforezi için, LICOR/Biosciences, NEN Model 4300, DNA Anayzer kullanılmıştır. %8'lik poliakrilamid jel hazırlanmıştır (Ekler bölümünde, Poliakrilamid Jel Analizinde Kullanılan Çözeltiler başlığında kullanılan çözeltilerin içerikleri yer almaktadır).

3.1.2.2.6 AFLP Bilgisayar Programlarının Çalıştırılması

Cihazın bağlı olduğu bilgisayarda öncelikle Saga Software programı ve internet bağlantıları ayarlanmıştır. Çalışmada kullanılan her yeni primer, örnekler ve kullanılan markörle ilgili bilgiler yeni açılan dosya ile belirtilmiştir.

3.1.2.2.7 Cam Aparatların Cihaza Yerleştirilmesi

Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra cam aparat cihaz içine konulmuş, 1X TBE ile doldurulmuş tank içine yerleştirilerek, elektrik akımının sağlanması için gerekli bağlantılar yapılmıştır. Daha sonra cihaz, 1200V, 35 mA, 25 W 45 °C'de ön ısıtma (pre-run) işlemi için 25 dk'ya programlanmıştır.

3.1.2.2.8 Örneklerin Yüklenmesi

Ön yürütme işleminden sonra, PCR ürünlerine 5 µl Blue Stop Çözeltisi ilave edilmiş ve sonra 94 °C'de 3 dk denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Denatüre edilmiş örnekler floresan boya ile işaretli olmaları nedeniyle ışıktan zarar görmemeleri için poliakrilamid jele yüklenene kadar karanlıkta ve buz içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra elektroforeze 1µl sırasıyla 700 ve 800 IRDye ile işaretli markör (50-350 bp) ve örnekler yüklenmiştir. 1200V, 35 mA, 25 W 45 °C elektroforez koşullarında 210 dk yürütme işlemi, programa komut verilerek gerçekleştirilmiştir.

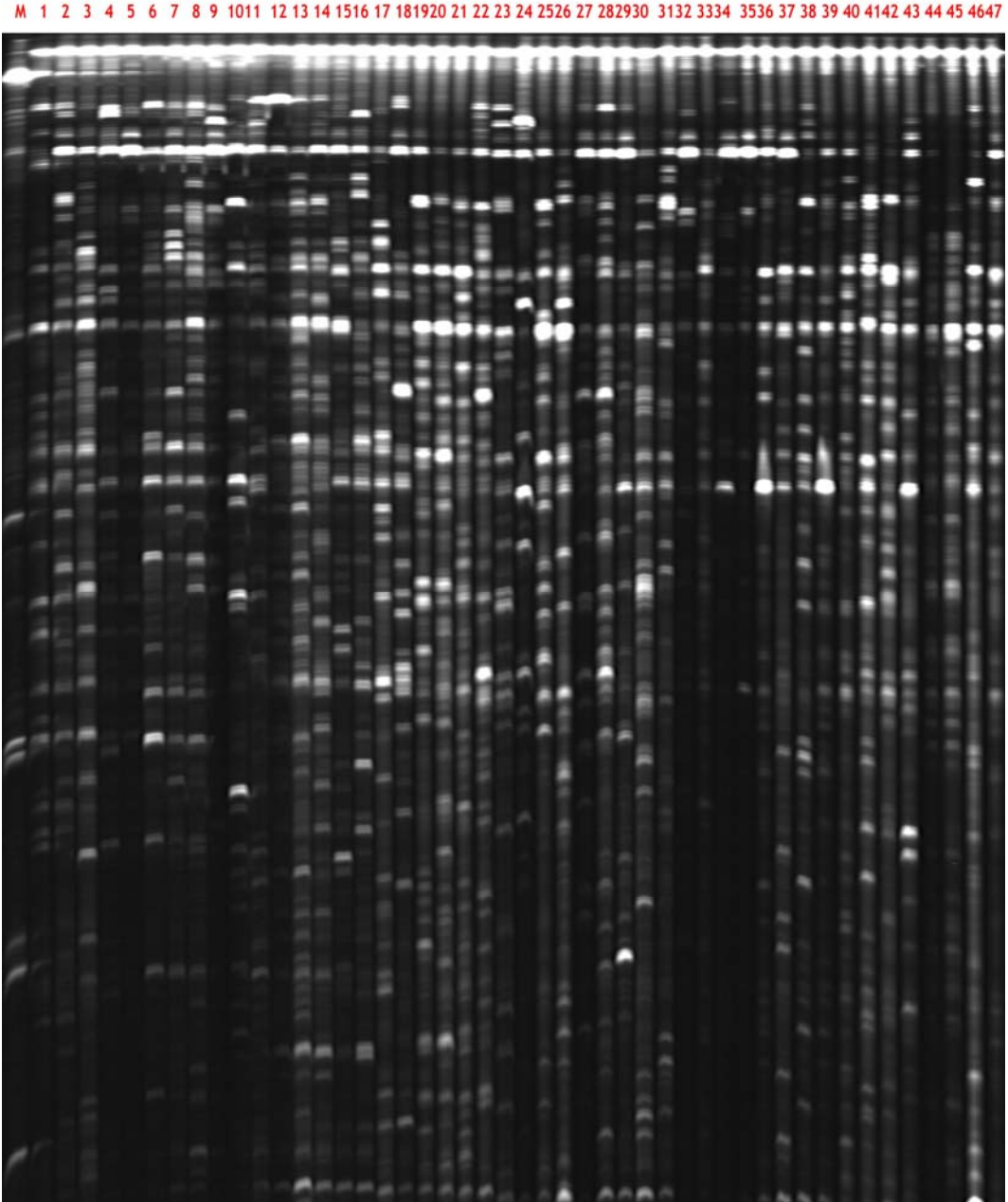
3.1.2.2.9 Markör Analizlerinin Sonuçlarının Skorlanması

Çalışmada kullanılan tüm markör tekniklerindeki primerlerin göstermiş olduğu polimorfik bantlar her bir örnek için bant bulunduranlar (1) ve bulundurmayanlar (0) olarak skorlanarak, elde edilen veriler Microsoft Excel dosyasında kayıt edilmiştir. Elde edilen veriler, Jaccard katsayılarına dayalı benzerlik değerleri yazılım (Jaccard Coefficient) programında analizleri incelemek için text dosyasına dönüştürülmüştür. Jump (SAS) istatistik programında analiz edilmiştir.

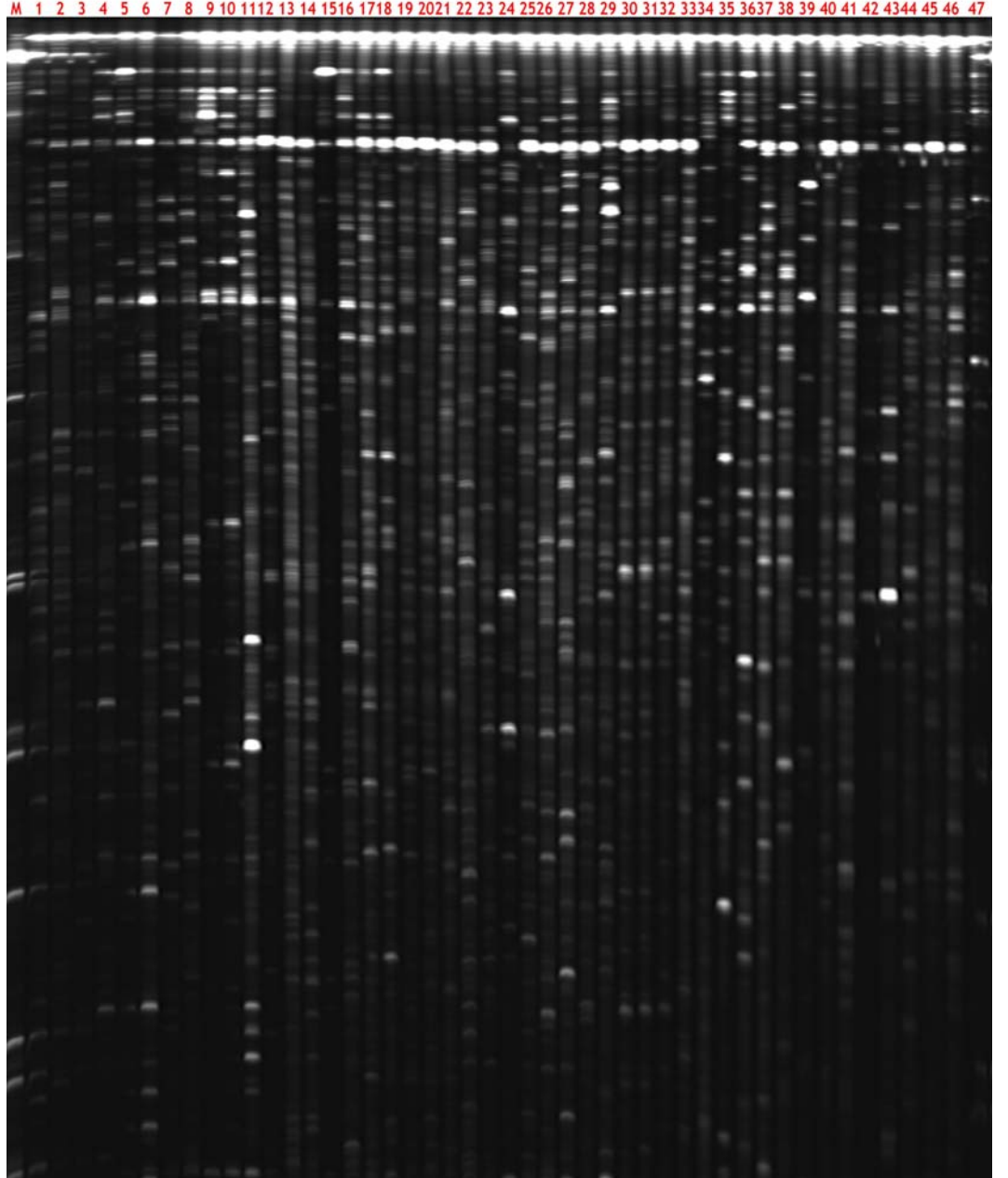
4. BULGULAR

Yapılan analizler sonucunda *Galanthus* türlerinde denenmiş olan 14 primere bağlı olarak elde edilen jel görüntülerinin bazıları aşağıda görölmektedir. Görüntülerin üst kısmında (M) harfi ile markör (50-700 bp) gösterilmektedir. 1-47 arası olarak gösterilen numaralar bireylere ait numaralardır

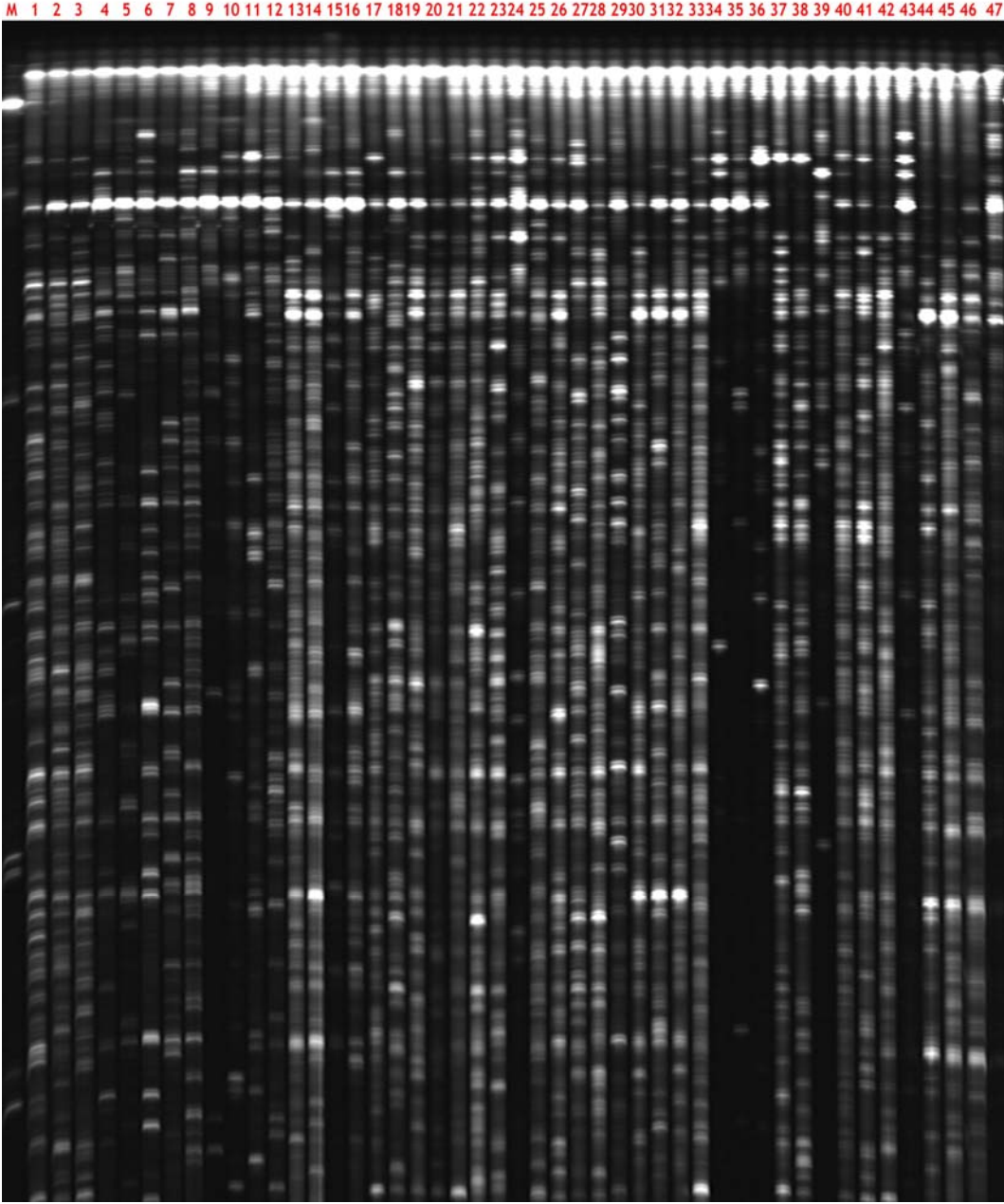
Şekil 4.1: M_{CTC} - E_{AGG} (800) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü



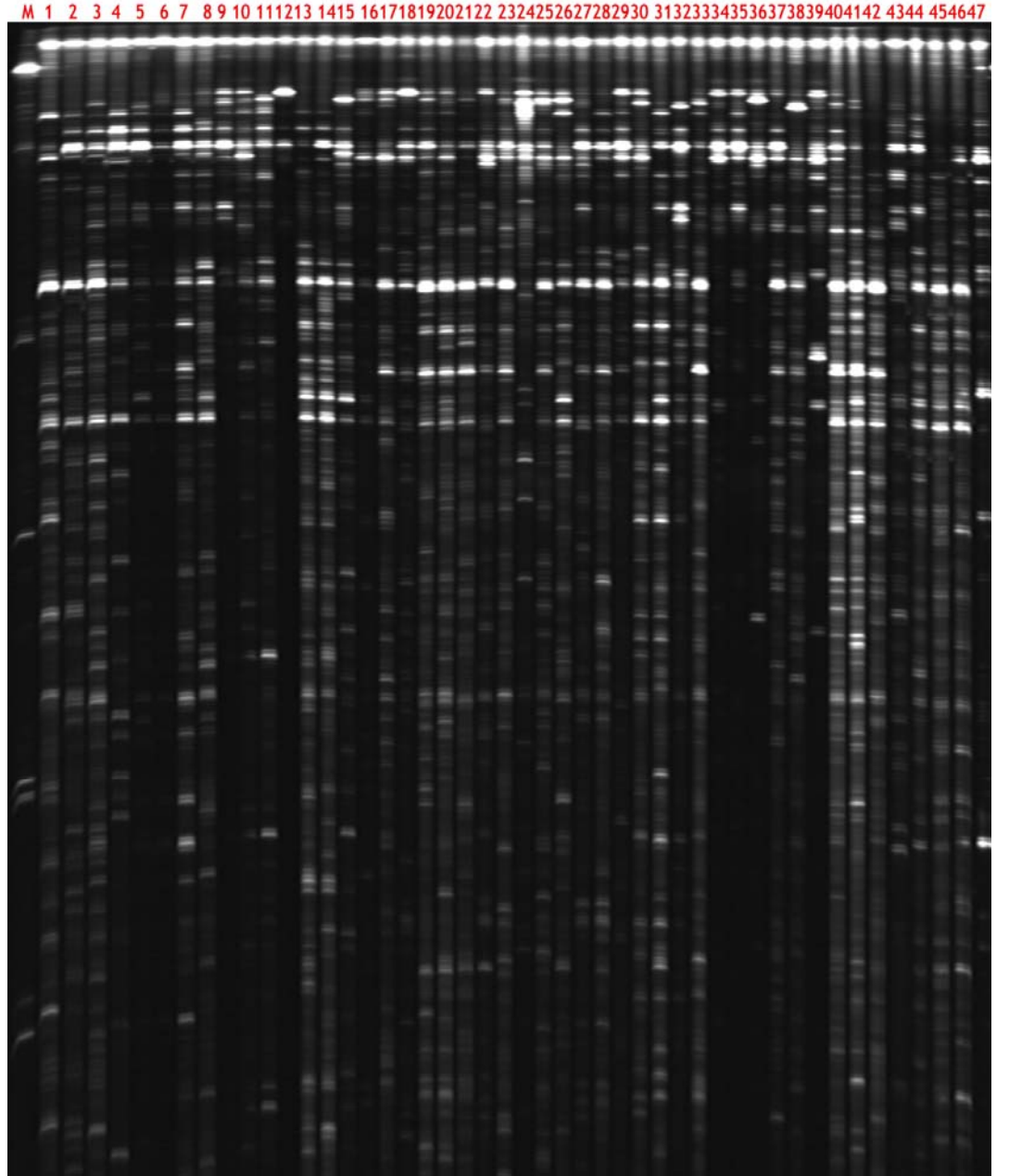
Şekil 4.2: M_{CTA} - E_{ACA} (700) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü



Şekil 4.3: M_{CAA} - E_{AAC} (700) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü



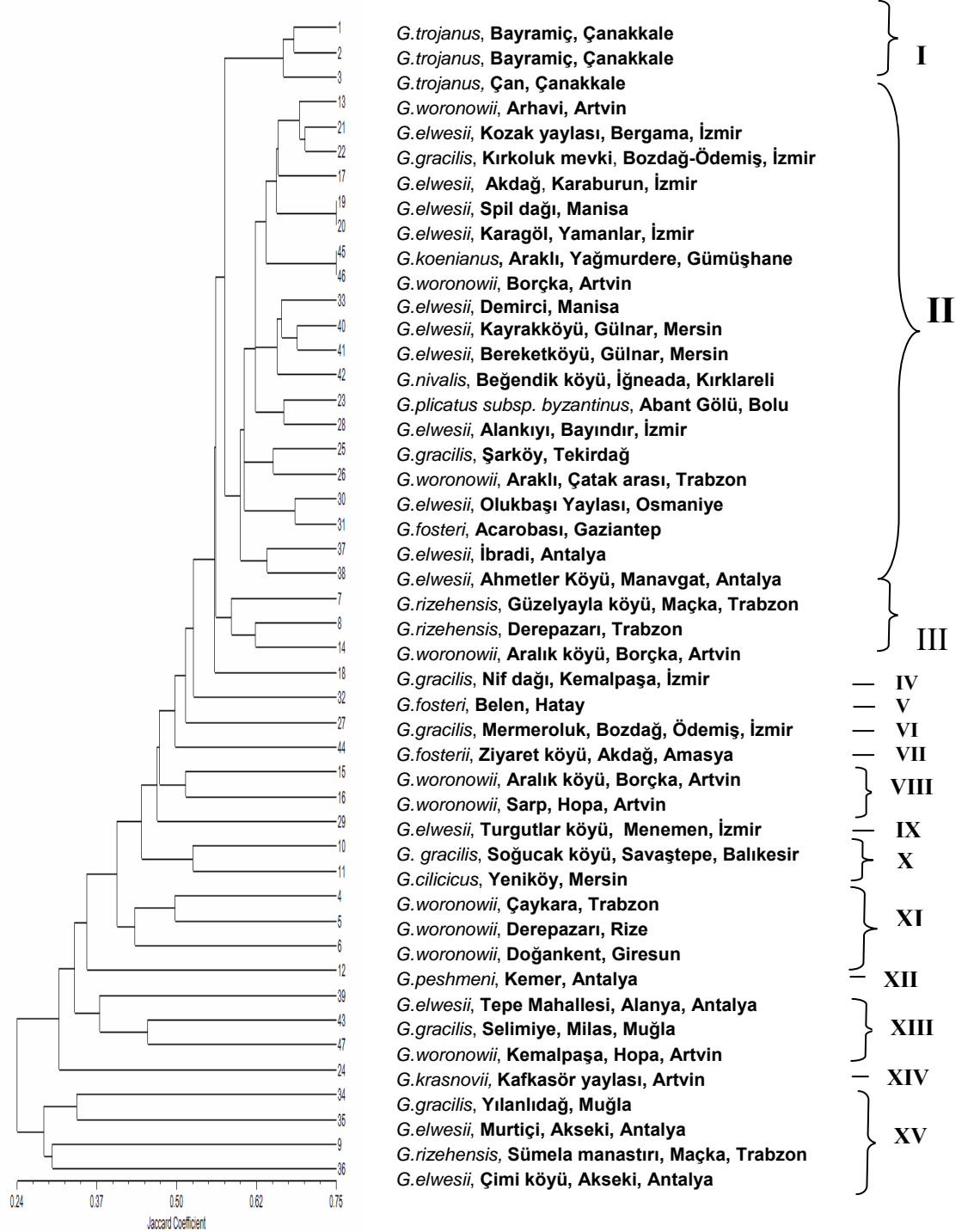
Şekil 4.4 : M_{CAA}- E_{AAG} (700) primerinden elde edilmiş jel görüntüsü



Tablo 4.1: Denenmiş primer kombinasyonları ve elde edilen polimorfik bant sayıları

Primerler	Polimorfik bant sayıları
$M_{CAA}-E_{AAC}$ (700)	29
$M_{CAA}-E_{ACG}$ (800)	25
$M_{CAA}-E_{AAG}$ (700)	25
$M_{CAA}-E_{ACT}$ (800)	26
$M_{CAA}-E_{ACA}$ (700)	30
$M_{CAA}-E_{AGC}$ (800)	28
$M_{CTC}-E_{AAG}$ (700)	33
$M_{CTC}-E_{ACT}$ (800)	34
$M_{CTC}-E_{ACA}$ (700)	22
$M_{CTC}-E_{AGC}$ (800)	21
$M_{CTC}-E_{ACC}$ (700)	41
$M_{CTC}-E_{AGG}$ (800)	32
$M_{CTA}-E_{ACA}$ (700)	36
$M_{CTA}-E_{AGC}$ (800)	36

Tablo 4.1'e göre, 418 polimorfik bant elde edilmiş, primer başına genel ortalama 30 polimorfik bant olarak bulunmuştur. M_{CAA} kombinasyonlu primerlerin ortalaması 27, M_{CTC} kombinasyonlu primerlerin ortalaması 32, M_{CTA} kombinasyonlu primerlerin ortalaması da 36 olarak belirlenmiştir. En yüksek 41 bant ile $M_{CTC}-E_{ACC}$ primeri, en düşük 21 polimorfik bant ile $M_{CTC}-E_{AGC}$ primeri belirlenmiştir. Ortalamanın üzerinde 7 primer bulunmaktadır. Ayrıca 50-450 baz çifti arasında skorlanabilir bantlar elde edilmiştir.

Tablo 4.2: Çalışmada kullanılmış *Galanthus* türlerinin aralarındaki benzerliklere göre dağılımı

1 1
2 0.68 1
3 0.64 0.69 1
4 0.46 0.45 0.45 1
5 0.44 0.42 0.46 0.48 1
6 0.48 0.41 0.36 0.45 0.45 1
7 0.56 0.51 0.51 0.46 0.45 0.43 1
8 0.56 0.59 0.67 0.47 0.44 0.43 0.69 1
9 0.22 0.22 0.21 0.22 0.29 0.26 0.23 0.28 1
10 0.37 0.36 0.41 0.36 0.31 0.29 0.35 0.41 0.32 1
11 0.45 0.48 0.49 0.38 0.36 0.35 0.43 0.52 0.28 0.52 1
12 0.35 0.34 0.33 0.29 0.48 0.29 0.34 0.34 0.25 0.26 0.39 1
13 0.55 0.61 0.62 0.45 0.43 0.42 0.52 0.64 0.29 0.38 0.54 0.37 1
14 0.53 0.54 0.56 0.49 0.46 0.41 0.54 0.62 0.21 0.38 0.47 0.47 0.68 1
15 0.46 0.45 0.47 0.38 0.36 0.34 0.46 0.48 0.21 0.33 0.41 0.38 0.48 0.54 1
16 0.43 0.47 0.49 0.41 0.41 0.42 0.46 0.54 0.29 0.34 0.46 0.42 0.56 0.54 0.54 1
17 0.52 0.57 0.62 0.44 0.38 0.39 0.56 0.61 0.28 0.44 0.54 0.35 0.68 0.56 0.47 0.53 1
18 0.53 0.53 0.55 0.41 0.39 0.45 0.51 0.57 0.24 0.42 0.51 0.36 0.59 0.56 0.42 0.5 0.61 1
19 0.53 0.58 0.61 0.44 0.41 0.38 0.58 0.57 0.23 0.42 0.58 0.35 0.65 0.6 0.45 0.56 0.61 0.59 1
20 0.56 0.58 0.61 0.43 0.37 0.39 0.53 0.64 0.23 0.45 0.51 0.35 0.69 0.61 0.47 0.53 0.63 0.56 0.75 1
21 0.54 0.58 0.61 0.47 0.38 0.37 0.51 0.58 0.22 0.41 0.54 0.32 0.72 0.56 0.46 0.52 0.65 0.56 0.66 0.76 1
22 0.52 0.56 0.58 0.41 0.38 0.39 0.56 0.58 0.24 0.39 0.56 0.34 0.68 0.57 0.45 0.52 0.64 0.58 0.64 0.64 0.72 1
23 0.52 0.56 0.56 0.41 0.36 0.34 0.48 0.55 0.19 0.39 0.51 0.33 0.62 0.55 0.44 0.45 0.63 0.56 0.56 0.59 0.62 0.63 1
24 0.35 0.31 0.31 0.39 0.28 0.26 0.27 0.34 0.22 0.29 0.34 0.23 0.31 0.37 0.26 0.28 0.32 0.34 0.31 0.32 0.33 0.34 0.37 1
25 0.55 0.67 0.61 0.41 0.39 0.38 0.49 0.58 0.24 0.39 0.5 0.36 0.64 0.57 0.43 0.51 0.62 0.59 0.59 0.59 0.63 0.63 0.62 0.32 1
26 0.51 0.53 0.55 0.44 0.38 0.38 0.49 0.59 0.19 0.37 0.46 0.36 0.64 0.62 0.47 0.48 0.61 0.55 0.65 0.69 0.57 0.58 0.58 0.29 0.65 1
27 0.47 0.5 0.48 0.38 0.42 0.47 0.41 0.55 0.23 0.37 0.48 0.37 0.52 0.47 0.36 0.45 0.54 0.54 0.52 0.49 0.56 0.56 0.53 0.32 0.51 0.51 1
28 0.54 0.64 0.61 0.41 0.37 0.38 0.58 0.58 0.22 0.41 0.52 0.36 0.66 0.56 0.48 0.51 0.62 0.61 0.63 0.61 0.64 0.72 0.66 0.28 0.64 0.61 0.66 1
29 0.43 0.46 0.48 0.38 0.33 0.35 0.49 0.45 0.24 0.39 0.48 0.39 0.47 0.45 0.38 0.42 0.46 0.49 0.48 0.47 0.47 0.49 0.47 0.32 0.49 0.45 0.56 0.53 1
30 0.53 0.55 0.67 0.43 0.36 0.37 0.48 0.58 0.21 0.36 0.49 0.33 0.67 0.55 0.46 0.48 0.65 0.52 0.61 0.59 0.62 0.61 0.61 0.31 0.61 0.61 0.51 0.66 0.48 1
31 0.52 0.56 0.59 0.43 0.36 0.35 0.49 0.56 0.19 0.35 0.47 0.31 0.61 0.54 0.43 0.46 0.58 0.51 0.55 0.56 0.63 0.55 0.62 0.31 0.56 0.59 0.49 0.57 0.43 0.68 1
32 0.46 0.48 0.52 0.43 0.41 0.34 0.45 0.55 0.21 0.37 0.44 0.36 0.57 0.47 0.41 0.43 0.54 0.51 0.54 0.55 0.53 0.51 0.56 0.31 0.53 0.53 0.52 0.54 0.43 0.58 0.59 1
33 0.52 0.63 0.64 0.42 0.38 0.38 0.56 0.61 0.22 0.43 0.55 0.34 0.66 0.56 0.44 0.48 0.64 0.58 0.6 0.64 0.66 0.62 0.64 0.35 0.64 0.61 0.54 0.66 0.49 0.64 0.63 0.57 1
34 0.21 0.21 0.24 0.23 0.27 0.25 0.21 0.24 0.26 0.24 0.24 0.21 0.21 0.21 0.24 0.21 0.22 0.24 0.19 0.19 0.28 0.22 0.29 0.22 0.19 0.19 0.25 0.21 0.21 0.21 0.22 0.24 0.26 1
35 0.22 0.23 0.26 0.27 0.31 0.31 0.24 0.25 0.26 0.22 0.24 0.26 0.23 0.23 0.22 0.23 0.23 0.27 0.22 0.22 0.23 0.22 0.23 0.28 0.23 0.24 0.25 0.24 0.23 0.23 0.21 0.26 0.22 0.33 1
36 0.25 0.25 0.26 0.27 0.24 0.34 0.25 0.31 0.29 0.25 0.26 0.19 0.25 0.26 0.22 0.28 0.25 0.27 0.24 0.26 0.25 0.25 0.24 0.26 0.25 0.25 0.21 0.24 0.25 0.27 0.25 0.21 0.25 0.28 0.3
37 0.51 0.54 0.59 0.48 0.35 0.35 0.55 0.59 0.26 0.36 0.48 0.34 0.62 0.56 0.45 0.48 0.66 0.53 0.57 0.59 0.57 0.59 0.59 0.31 0.57 0.59 0.53 0.68 0.51 0.61 0.58 0.55 0.63 0.19 0.2
38 0.47 0.54 0.57 0.42 0.38 0.38 0.51 0.56 0.26 0.37 0.48 0.33 0.62 0.53 0.5 0.51 0.58 0.51 0.58 0.57 0.58 0.59 0.57 0.26 0.58 0.55 0.47 0.61 0.45 0.56 0.53 0.48 0.59 0.21 0.2
39 0.28 0.35 0.37 0.26 0.23 0.26 0.26 0.39 0.26 0.27 0.28 0.21 0.27 0.28 0.35 0.31 0.26 0.28 0.32 0.27 0.28 0.27 0.26 0.27 0.31 0.26 0.24 0.27 0.26 0.29 0.29 0.28 0.26 0.22 0.2
40 0.53 0.58 0.65 0.42 0.38 0.34 0.58 0.57 0.18 0.37 0.47 0.35 0.65 0.58 0.45 0.45 0.59 0.55 0.59 0.62 0.59 0.58 0.59 0.28 0.67 0.59 0.49 0.62 0.46 0.61 0.62 0.56 0.67 0.19 0.2
41 0.51 0.58 0.61 0.43 0.36 0.37 0.54 0.61 0.21 0.38 0.52 0.38 0.66 0.56 0.46 0.48 0.61 0.55 0.59 0.63 0.64 0.64 0.61 0.34 0.67 0.65 0.47 0.65 0.46 0.63 0.62 0.5 0.65 0.19 0.2
42 0.52 0.57 0.68 0.44 0.36 0.31 0.53 0.56 0.19 0.36 0.49 0.34 0.63 0.55 0.46 0.48 0.58 0.49 0.58 0.59 0.62 0.65 0.56 0.28 0.58 0.58 0.47 0.62 0.44 0.61 0.65 0.52 0.66 0.15 0.1
43 0.37 0.42 0.41 0.36 0.32 0.36 0.38 0.43 0.22 0.31 0.39 0.27 0.41 0.44 0.42 0.37 0.41 0.36 0.42 0.42 0.41 0.49 0.36 0.32 0.48 0.47 0.33 0.39 0.34 0.43 0.41 0.37 0.39 0.22 0.2
44 0.48 0.47 0.57 0.41 0.39 0.36 0.43 0.48 0.23 0.32 0.42 0.31 0.48 0.47 0.42 0.39 0.48 0.44 0.51 0.47 0.47 0.46 0.47 0.27 0.47 0.48 0.42 0.54 0.38 0.54 0.51 0.53 0.52 0.21 0.2
45 0.54 0.58 0.63 0.44 0.39 0.36 0.49 0.62 0.24 0.39 0.53 0.35 0.67 0.55 0.48 0.51 0.61 0.53 0.65 0.61 0.65 0.61 0.58 0.31 0.59 0.58 0.49 0.65 0.46 0.62 0.58 0.55 0.65 0.21 0.2
46 0.55 0.59 0.63 0.42 0.38 0.39 0.54 0.62 0.25 0.41 0.51 0.33 0.68 0.56 0.48 0.52 0.63 0.54 0.62 0.61 0.64 0.66 0.63 0.32 0.62 0.63 0.48 0.66 0.45 0.62 0.69 0.52 0.63 0.25 0.2
47 0.31 0.33 0.31 0.33 0.32 0.25 0.29 0.36 0.25 0.27 0.26 0.19 0.32 0.35 0.38 0.28 0.29 0.29 0.34 0.31 0.32 0.31 0.28 0.28 0.31 0.32 0.26 0.37 0.24 0.34 0.31 0.28 0.28 0.22 0.2

Tablo 4.4: *G. trojanus* türlerinin tür içi benzerlik tablosu

No	1	2	3
1	-		
2	0,68	-	
3	0,64	0,69	-

Tablo 4.5: *G.rizehensis* türlerinin tür içi benzerlik tablosu

No	7	8	9
7	-		
8	0,69	-	
9	0,23	0,69	-

Tablo 4.6: *G. fosterii* türlerinin tür içi benzerlik tablosu

No	31	32	44
31	-		
32	0,59	-	
44	0,51	0,53	-

Tablo 4.7: *G.gracilis* türlerinin tür içi benzerlik tablosu

No	18	22	25	27	34	43
18	-					
22	0,58	-				
25	0,59	0,63	-			
27	0,54	0,56	0,51	-		
34	0,51	0,22	0,19	0,25	-	
43	0,55	0,49	0,48	0,33	0,22	-

Tablo 4.8: *G.woronowii* türlerine ait tür içi benzerlik tablosu

No	4	5	6	13	14	15	16	26	46	47
4	-									
5	0,48	-								
6	0,45	0,45	-							
13	0,45	0,43	0,42	-						
14	0,49	0,46	0,41	0,68	-					
15	0,38	0,46	0,34	0,48	0,68	-				
16	0,41	0,41	0,42	0,56	0,32	0,54	-			
26	0,44	0,38	0,38	0,64	0,68	0,47	0,48	-		
46	0,42	0,38	0,39	0,68	0,68	0,48	0,52	0,63	-	
47	0,33	0,32	0,25	0,32	0,32	0,38	0,28	0,32	0,37	-

Tablo 4.9: *G.elwesii* türlerine ait tür içi benzerlik tablosu

No	10	17	19	20	21	28	29	30	33	35	36	37	38	39	40	41
10	-															
17	0,44	-														
19	0,42	0,61	-													
20	0,51	0,63	0,75	-												
21	0,54	0,65	0,66	0,76	-											
28	0,41	0,51	0,63	0,61	0,64	-										
29	0,39	0,42	0,48	0,47	0,47	0,53	-									
30	0,36	0,48	0,61	0,59	0,62	0,66	0,48	-								
33	0,43	0,48	0,6	0,64	0,66	0,66	0,49	0,64	-							
35	0,22	0,23	0,22	0,22	0,23	0,24	0,23	0,23	0,22	-						
36	0,23	0,28	0,24	0,26	0,25	0,24	0,25	0,27	0,25	0,28	-					
37	0,36	0,48	0,57	0,59	0,57	0,68	0,51	0,61	0,63	0,19	0,25	-				
38	0,37	0,51	0,58	0,57	0,58	0,61	0,45	0,56	0,59	0,21	0,21	0,25	-			
39	0,27	0,31	0,32	0,27	0,28	0,27	0,26	0,29	0,26	0,22	0,25	0,38	0,29	-		
40	0,37	0,45	0,59	0,62	0,59	0,62	0,46	0,61	0,67	0,19	0,21	0,26	0,64	0,61	-	
41	0,38	0,48	0,59	0,63	0,64	0,65	0,46	0,63	0,65	0,19	0,22	0,27	0,65	0,65	0,31	-

Tablo 4.3' te, 47 *Galanthus* örneğine ait benzerlik tablosu verilmiştir. Bu tabloya göre en yakın benzerliği 19 (*G.elwesii*-Spil Dağı, Manisa) ve 20 no'lu (*G.elwesii*- Karagöl, İzmir) örnekler arasında 0,75 olarak belirlenmiştir. En uzak benzerlik ise 1 (*G.trojanus*- Bayramiç, Çanakkale) ve 36 no'lu (*G.elwesii*- Çimi Köyü, Akseki, Antalya) örnekler arasında 0,25 olarak belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen, benzerlik tablosuna göre dendrogram elde edilmiştir (Tablo 4.2). Dendrogramda 15 grup oluşmuştur. Elde edilen dendrograma göre, oluşan I., VIII. ve XI. gruplar hariç diğer gruplardaki tüm bireyler birbirlerinden tür ve buldukları alan bakımından aynı grup içinde toplanmamıştır. Oluşan en büyük grup II. gruptur. Bu grup içindeki örnekler anlamlı şekilde benzerlik göstermemektedir. Beşinci ve yedinci grupları meydana getirmiş olan 32. (*G.fosteri*, Belen, Hatay) ve 44. (*G.fosterii*, Ziyaret köyü, Akdağ, Amasya) örnekler bağımsız grup oluşturmuşlardır. Ayrıca IV. (*G.gracilis*, Nif dağı, Kemalpaşa, İzmir), VII. (*G.gracilis*, Mermeroluk, Bozdağ, Ödemiş, İzmir) grupları oluşturan türler aynı olmasına bağımsız gruplar meydana getirmiştir.

Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9' da sırasıyla *G.trojanus*, *G. rizehensis*, *G.fosterii*, *G.gracilis*, *G. woronowii*, *G. elwesii* türlerine ait tür içi benzerlik tabloları verilmiştir. Her tabloda belirtilen

örneklerin, benzerlik oranları toplanmış, ardından ortalamaları alınmıştır. Yine sırasıyla ortalamalar şu şekildedir: 0,65, 0,53, 0,54, 0,44, 0,45, 0,39.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada 47 *Galanthus* türüne 14 primer uygulanmış, toplam 418 polimorfik bant elde edilmiştir. Kullanılan primerlerden en düşük $M_{CTC-E_{AGC}}$ 21, en yüksek $M_{CTC-E_{ACC}}$ primeri yoluyla 41 polimorfik bant elde edilmiştir. Benzer olarak Balasavaranan et. al. (2003) tarafından yapılmış çalışmada en yüksek 519 polimorfik bant elde etmişlerdir. Yong and Williams (2008) yaptıkları çalışmada E_{AGG}/M_{CAC} primerinden en yüksek 122 polimorfik bant, Chen et al.(2003) ise E_{AGG}/M_{CAA} primerinden en yüksek 86 polimorfik bant elde etmişlerdir. Bu üç çalışma göz önünde bulundurulduğunda, yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bant sayıları literatür ile uyum göstermektedir.

Elde edilen dendrograma göre, birinci grup içinde *G.trojanus* türleri bir araya toplanmış, kendi aralarındaki ve diğer türlerle aralarındaki uzaklık belirlenmiştir. 1. (*G.trojanus*, Bayramiç- Çanakkale) ve 2. (*G.trojanus*, Bayramiç- Çanakkale) örnekler aynı bölgeden toplanmış ve aralarındaki benzerlik 0,68 olarak belirlenmiştir. Aynı türden olan 3. örnek (*G. trojanus*, Çan-Çanakkale) farklı bölgeden toplanmış ve diğer iki örneklerin aralarındaki benzerlik 0,69 olarak belirlenmiştir. Ekim vd. (2000) tarafından yapılmış çalışmada da *G.trojanus* türleri jeocoğrafik olarak diğer türlerden ayrıldığı bildirmişlerdir. Aynı şekilde VIII. ve XI. grupları meydana getiren *G.woronowii* türleri buldukları ortamlara göre ya da aynı türden olmalarına göre grupları meydana getirmişlerdir.

İkinci grup içinde, 45.(*G. koenianus*, Araklı, Yağmurdere, Gümüşhane) ve 46.(*G. woronowii*, Borçka, Artvin) örnekler arasındaki benzerlik %75 olarak

belirlenmiştir. Zonneveld et al.(2003) yaptığı çalışmada bu iki türün DNA içeriği bakımından birbirinden tamamen ayrı olduğunu bildirmiştir. Bu iki tür için

yapılan morfolojik analizlerin, moleküler verilerle birlikte değerlendirilip türlerin taksonomik olarak değerlendirmelerinin tekrarlanması gerekebilir.

Zonneveld et al., (2003) tarafından yapılmış olan çalışmada *G. gracilis* ve *G.elwesii* türlerinin birbirlerine çok yakın olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da II. grup içinde 21. (*G.elwesii*, Kozak Yaylası, Bergama, İzmir) ve 22. (*G. gracilis*, Kırkoluk mevki, Bozdağ-Ödemiş, İzmir) örnekler arasındaki benzerlik 0.64 olarak belirlenmiştir.

Ekim vd., (2000) yaptıkları çalışmada Gaziantep ve çevresinden topladıkları *G. fosterii* türlerinin popülasyonlar içinde farklılıklar belirlendiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada *G.fosterii* örneklerinin bağımsız grup oluşturmuştur.

Örnekler arasında en yakın benzerliği 0.75 ile 19. (*G.elwesii*, Spil dağı, Manisa) ve 20. (*G.elwesii*, Karagöl, Yamanlar, İzmir) örnekler arasında görülmüştür. En uzak benzerlik ise 1. (*G.trojanus*, Bayramiç, Çanakkale) ve 36. (*G.elwesii*, Çimi köyü, Akseki, Antalya) örnekler arasında 0.25 olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre, yaptığımız çalışmanın tutarlı sonuçlar verdiğini söyleyebiliriz.

Zonneveld et al., (2003), yaptığı çalışmaya göre *Galanthus* türlerinde tür içi varyasyonun dar olduğunu, türler arası varyasyonun da geniş olduğunu bildirmiştir. Ancak yaptığımız çalışmada tür içi varyasyon geniş olarak saptanmıştır. Bu durumun da ülkemizde *Galanthus* türlerinin yüksek derecede varyasyon gösterdiğini, ülkemizin bu cinsin gen merkezlerinden birisi olabileceğini ifade edebiliriz. Buna benzer olarak bu çalışmada da *G.trojanus*, *G.*

rizehensis, *G.fosterii*, *G.gracilis*, *G. woronowii*, *G. elwesii* türlerinde yapılan hesaplamalar göz önünde bulundurulduğunda tür içi varyasyonun geniş olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, AFLP yönteminin kullanılmasıyla elde edilen jel görüntülerinin ve PCR reaksiyonlarının çok sayıda bant vermesi, laboratuvar analizlerinde kolaylık sağlamaktadır. Böylelikle kısa zamanda çok sayıda bant elde edilmesine yardımcı olmaktadır. *Galanthus* cinsi için kullanışlı bir araç olduğu söylenebilir.

Bunun yanında, aynı türlerin diğer türlerle birlikte cluster oluşturması ve bu durumun önceki çalışmalarla benzerlik göstermemesi, *Galanthus* cinsinde, morfolojik karakterlere göre yapılan sınıflandırmanın yeterli olmayacağını ifade etmektedir. Bu nedenle DNA markörleri ile morfolojik markörlerin kombine edilerek sınıflandırma yapılmasının daha uygun olacağı kanatindeyiz.

6. SONUÇ

Sonuç olarak; morfolojik oluşturulan dendrograma göre, ülkemizde yayılış gösteren *Galanthus* türlerinin morfolojik olarak sınıflandırılması, tek başına yetersiz olduğu belirlenmiştir. *Galanthus* cinsi içinde bulunan türlerin, moleküler çalışmalar ile birlikte tekrar sınıflandırılması gerekmektedir. AFLP markörü ilk kez bu cinsten denenmiştir ve olumlu sonuçlar alınmıştır. AFLP markörlerine göre genetik varyasyon diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur. Bu nedenle bu cinsin ülkemizdeki yayılışı da göz önüne alındığında ülkemiz bu cinsin gen merkezlerinden birisi olduğu ileri sürülebilir.

EKLER

AFLP Markör Analizi için Gerekli Olan Cözeltiler

Ecor1/Mse1 Enzim Karışımı (1.25 U/μl)

10 mM Tris-HCl (ph 7.4)

50 mM NaCl

0.1 M EDTA

1mM DTT

200 μg/ml BSA

%50 gliserol

% 0.15 Triton X- 100

5X Reaksiyon Tamponu

50 mM Tris-HCl

50 mM Mg-asetat

250 mM K-asetat

T4 DNA Lİgaz (5 U/μl)

0.1mM EDTA

1mM DDT

50 mM KCl

200 μg/ml BSA

% 50 gliserol

Adaptör Krişımı (Ecor1 / Mse1 adaptörleri)

0.4mM ATP

10 mM Tris-HCl (ph 7.5)

10 mM Mg- asetat

50 mM K- asetat

Poliakrilamid Jel Analizinde Kullanılan Cözeltiler**Stok Bind Silane**

Bind Silane	3 µl
Acetic Acid	10 µl
% 96 Ethanol	2 ml

TBE Hazırlanması**5 X TBE (1 l için)**

Tris	54 g
Boric Asit	27.5 g
0.5 M ETDA	20 ml

1x Yürütme Tamponu

5 X TBE tamponu, ultra saf su ile 5 kat seyreltilir.

% 10 APS (Amonyum Persülfat)

0.1 g APS 1ml ultra saf su ile çözülmesiyle hazırlanır. – 20 °C de saklanır.

% 8 Akrlamid Jel İçeriği

Üre	12.6 g
5XTBE	6 ml
% 40 Akrlamid	6 ml

Ultra saf su ile 30 ml'ye tamamlanır.

KAYNAKALAR DİZİNİ

- Artjushenko**,1966, A critical review of the genus *Galanthus*. L. Bot. Zhurn. (Moscow and Leningrad) 51(10): 1437–1451p.
- Balasavaranan**, T.,2003, Genetic Diversity Among South Indian Tea Germplasm (*Camellia sinensis*, *C. assamica* and *C. assamica* spp. *lasiocalyx*) Using AFLP Markers, Plant Science 165,:365-372p.
- Brickell C. D.**, 1984, *Galanthus*. In: Davis P.H. et al. (eds.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 8. Univerity Press, Edinburgh,: 365–372p.
- Bishop M.**, , **Davis A. and Grimshaw J.**, 2001, Snowdrops, A Monograph of Cultivated *Galanthus*, The Griffin Press, UK.
- Chen J.**,2004, Genetic Relationships of *Aglaonema* Species and Cultivars Inferred from AFLP Markers, 155-166p.
- Davis A. P.**,1999, The genus *Galanthus*. A Botanical magazine Monograph. Timber Press, Portland, published in association with the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Davis P and Barnet R.**,1997, The leaf anatomy of the genus *Galanthus* L., Botanical Journal of the Linman Society, 123: 333-352p.
- Despres**, 2002, Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability, molecular phylogenetics and evolution, 185-196p.
- Ekim**,1999, Türkiye’de *Galanthus* L. Cinsinin Revizyonu, TÜBİTAK projesi Proje No: 105T341
- Faccoli P., Pechionii N., Stanca, A.M. and Terzi V.** 1999, Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for barley malt fingerprinting. *J. Cereal Sci.*, 29: 257,260p.
- Heywood** ,1978, Flowering Plants Of The World, Oxfort University Press, Oxford London, Melbourne.
- Khalighi M.**, 2008, Assessment of genetic diversity in *Triticum* spp. And *Aegilops* spp. using AFLP markers, African Journal of Biotechnology Vol. 7 (5), pp. 546-552.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lamote V.**, 2005, Evaluation of AFLP markers to reveal genetic diversity in Typha, *Aquatic Botany*, 83, 296–309p.
- Lledo, M. D.**, 2004, Phylogenetic Analysis of *Leucojum* and *Galanthus* (*Amaryllidaceae*) Based on Plastid MatK and Nuclear Ribosomal Spacer (ITS) DNA Sequences and Morphology, *Plant Syst. Evol.*, 246:223-243p.
- Rafalski, J.A.**, 1996, Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B, Lai E (eds.), *Non-Mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide*, Academic Press, London, pp. 75-134p.
- Stern F. C.**, 1956 *Snowdrops and snowflakes* London: The Royal Horticultural Society, Vincent Square, London.
- Sudupak M.A.**, 2004, Genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey assessed by AFLP fingerprinting, *Theor. Appl. Genet.* 108:937–944p.
- Vos, P.**, 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407, 4414p.
- Yong B. and Williams J.**, 2008, AFLP variation in 25 Avena species, *Theor Appl Genet.*, 117:333–342p.
- Yang X., Liu C., Lin S.**, 2009, Genetic relationships in Eriobotrya species as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, *Scientia Horticulture*, 122:264-268p.
- Zonneveld.**, 2003 The systematic value of nuclear DNA content in Galanthus, *Plant systematic and evolution* 241: 89–102p.

ÖZGEÇMİŞ

İbrahim Uzan, 1984 Zonguldak Karadeniz Ereğli doğumludur. İlköğretim eğitimini Alaplı Atatürk İlkokulu'nda, Ortaöğretim ve Lise hayatını Zonguldak Alaplı Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2003 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalına girmiştir. 2008 yılında bu bölümden mezun olan İbrahim Uzan, aynı yıl Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programına girmiştir. İbrahim Uzan' ın bu tezi Amerika Birleşik Devletleri'nde, 8. Hayvan ve Bitki Genom kongresi' nde yayımlanmıştır.