

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Amsonia orientalis* DECNE.' NİN FARKLI POPULASYONLARI
ARASINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN RAPD VE SDS PAGE
YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS

Tuba ERBULUCU

Anabilim Dalı: Biyoloji

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özlem AKSOY

KOCAELİ, 2012

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Amsonia orientalis* DECNE.' NİN FARKLI POPULASYONLARI
ARASINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN RAPD VE SDS PAGE
YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba ERBULUCU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 05 Ocak 2012

Tezin Savunulduğu Tarih: 08 Şubat 2012

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Özlem AKSOY


(.....)

Üye

Prof. Dr. Fazıl Özen


(.....)

Üye

Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN


(.....)

KOCAELİ, 2012

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Moleküler biyoloji tekniklerindeki son gelişmeler, canlı türleri üzerinde yapılan sistematik ve evrimsel çalışmalara büyük bir hız kazandırmıştır. Bu tekniklerden birisi olan RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA,) bitkilerde genetik çeşitliliğin saptanmasında kullanılan etkin bir metottur. Bu çalışmada, nesli tükenmekte olan ve içerdiği alkaloidlerden dolayı antikanserojen ve antitümör özelliği bulunan *Amsonia orientalis* Decne.'nin farklı populasyonları arasındaki genetik çeşitliliğin RAPD ve SDS-PAGE metotları kullanılarak analiz edilmiştir.

Bu çalışmalar sırasında her zaman yanımda ve bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve donanımı ile beni yetiştiren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem AKSOY'a teşekkür ederim.

Tezimin birçok aşamasında bilgilerinden yararlandığım bölüm başkanımız Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sevgi TÜRKER'e, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan arkadaşım Asuman DEVECİ'ye, hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme hep yanımda oldukları ve bana güvendikleri için sonsuz teşekkürler...

Bu tez çalışması Kocaeli Üniversitesi-BAP 2009/050 No'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER	vii
ÖZET	viii
İNGİLİZCE ÖZET	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Amsonia orientalis</i> Decne'nin Bitki Sistematığındeki Yeri	3
1.2. <i>A. orientalis</i> 'in Tanımlanması ve Genel Görünüşü	3
1.3. <i>A.orientalis</i> 'in Dünyadaki ve Türkiye'deki Yayılışı	4
1.4. <i>A.orientalis</i> 'in Biyokimyasal Özelliği, Habitat ve Ekolojisi	5
1.5. <i>A.orientalis</i> 'in Durumu ve Tehlike Kategorisi	5
1.6. <i>A.orientalis</i> İle İlgili Yapılan Çalışmalar	5
2. BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE ÖNEMİ	9
2.1. Genetik Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması	9
2.2. <i>In situ</i> ve <i>Ex situ</i> Koruma	10
2.3. Moleküler Markırlar	11
2.3.1. Proteine dayalı Markırlar	12
2.3.2. DNA'ya dayalı Markırlar	13
2.4. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler	14
2.4.1. RAPD tekniği ve uygulama alanları	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Tampon Çözeltiler.....	20
3.2. Bitki Örneklerinin Toplanması	20
3.2.1. Genomik DNA (gDNA) izolasyonu	20
3.2.2. Agaroz jel elektroforezi	21
3.2.3. İzole edilen gDNA'nın miktar ve saflık tayini	21
3.2.4. RAPD-PCR	21
3.2.5. RAPD-PCR sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesi	22
3.3. Toplam Protein İzolasyonu	22
3.3.1. Bradford yöntemi ile protein miktar tayini	23
3.3.2. Standart eğrinin hazırlanması	23
3.3.3. Örneklerin toplam protein analizi	24
3.3.4. SDS-PAGE	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. gDNA Miktar ve Saflık Dereceleri.....	27
4.2. PCR Koşulları ve Reaksiyonlar	28
4.3. RAPD Profilleri	30
4.4. RAPD Verilerinin Analizi ve Değerlendirilmesi	34
4.5. Toplam Protein Miktarları	37
4.6. SDS-PAGE Verilerinin Analizi ve Değerlendirilmesi	37
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: <i>Amsonia orientalis</i> 'in genel görünüşü	3
Şekil 1.2: <i>A.orientalis</i> 'in Türkiye'de bulunan lokaliteleri	4
Şekil 2.1: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	16
Şekil 3.1: BSA proteini kullanarak elde edilen standart eğri grafiği	24
Şekil 4.1: %1'lik agaroz jelde yürütülen gDNA'ların bant görüntüleri	27
Şekil 4.2: OP primer serisi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	30
Şekil 4.3: Populasyonlar arasındaki genetik mesafeyi gösteren dendrogram	35
Şekil 4.4: SDS-PAGE sonrası oluşan toplam proteinleri ait bant profilleri	38
Şekil 4.5: Markır proteinin profil yoğunluk grafiği	38
Şekil 4.6: Ömerli populasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği.....	39
Şekil 4.7: Gaziosmanpaşa populasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği	40
Şekil 4.8: Adnan Menderes populasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği	40
Şekil 4.9: Paşa Alanı populasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği ..	41
Şekil 4.10: SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen protein bant profilinden oluşan dendrogram	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1: DeneYlerde kullanılan cihazlar	18
Tablo 3.2: RAPD-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler	22
Tablo 3.3: Optimize edilen RAPD-PCR döngüsü	22
Tablo 3.4: BSA standart çözelti konsantrasyonları.....	24
Tablo 3.5: Proteinlerin konsantrasyon ve absorbans değerleri	24
Tablo 4.1: Farklı populasyonların gDNA absorbans değerleri ve saflık dereceleri	28
Tablo 4.2: Çalışmada kullanılan OP serisi RAPD primerlerinin dizileri ve T_m değerleri.....	29
Tablo 4.3: <i>A. orientalis</i> populasyonları arasındaki benzerlik indeksi	35
Tablo 4.4: <i>A. orientalis</i> bitkisinin populasyonlar arası genetik mesafe değerleri	36
Tablo 4.5: <i>A. orientalis</i> 'in farklı populasyonlarında ki yapraktan izole edilmiş protein miktarları.....	37
Tablo 4.6: SDS-PAGE yöntemi sonrası markırdan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları	39
Tablo 4.7: SDS-PAGE yöntemi sonrası Ömerli populasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları	39
Tablo 4.8: SDS-PAGE yöntemi sonrası Gaziosmanpaşa populasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları ..	40
Tablo 4.9: SDS-PAGE yöntemi sonrası Adnan Menderes populasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları ..	41
Tablo 4.10: SDS-PAGE yöntemi sonrası Paşa Alanı populasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları..	41

SİMGELER

A	: Absorbans
cm	: Santimetre
kb	: Kilo baz
kDa	: Kilodalton
μ	: Mikron
μl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
V	: Volt
°C	: Santigrat

Kısaltmalar

ark	: Arkadaşları
BSA	: Bovine Serum Albumin
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin-tetra-asetik asit
EtBr	: Etidyumbromür
gDNA	: Genomik DNA
PBS	: Phosphate buffer solution (Fosfat Tampon Solüsyonu)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Trisboratetilendiamintetraasetikasit
Tris	: Tris (Hidroksimetilaminometan)
Tm	: Erime sıcaklığı
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	: Ultraviyole
vb	: ve benzeri
vd	: ve diğerleri

***Amsonia orientalis* DECNE.' NİN FARKLI POPULASYONLARI ARASINDAKİ
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN RAPD VE SDS PAGE YÖNTEMLERİ İLE
BELİRLENMESİ**

Tuba ERBULUCU

Anahtar Kelimeler: RAPD, *Amsonia orientalis*, Genetik Çeşitlilik, SDS-PAGE, Koruma, Polimorfizm

Özet: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae) dünya üzerinde sadece Yunanistan'ın doğusu ve Türkiye'nin batısında bulunmakta ve Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabına göre "çok tehlikede" (CR; critically endangered) tehlike kategorisinde gösterilmekte ve Bern Sözleşmesi gereği Avrupa Konseyi tarafından Avrupa ölçeğinde mutlak korunması gereken bitki türleri listesinde yer almaktadır. Çeşitli alkaloidler içermesinden dolayı antikanserojen ve antitümör etkileri vardır. Yaşam alanları insan etkisiyle zarar gördüğü için, tür tehdit altında bulunmaktadır. *A.orientalis*, İstanbul'da (Ömerli) ve Balıkesir'de (Gaziosmanpaşa, Adnan Menderes ve Paşa Alanı) dar bir yayılışa sahiptir. Koruma stratejilerinin geliştirilebilmesi için öncelikle bitkinin genetik çeşitliliğinin saptanması gereklidir. Bu bitkide populasyonlar arası genetik çeşitliliğin ilk değerlendirilmesi RAPD belirteçleri kullanılarak yapılmıştır. İkinci aşamada SDS PAGE ile protein profili saptanmıştır. Çalışmada kullanılan 40 primerden 37 primer 118 polimorfik bant oluşturmuştur. *A.orientalis* populasyonları arasındaki genetik mesafe 0.2881-1.2443 değerleri arasında değişmektedir. En yüksek genetik uzaklık değeri 1.2443 Gaziosmanpaşa ve Ömerli populasyonlarında bulunurken, en düşük genetik uzaklık değeri 0.2881 Ömerli ve Gaziosmanpaşa populasyonları arasında bulunmuştur. SDS-PAGE tekniği ile elde edilen toplam protein profilleri ile dendrogram ve populasyonlar arası uzaklık bulunmuştur. SDS-PAGE analizine göre, Ömerli populasyonu Gaziosmanpaşa populasyonuna yakın iken, Adnan Menderes populasyonu da Paşa Alanı populasyonu ile yakın görülmektedir.

**DETERMINATION of GENETIC DIVERSITY BETWEEN DIFFERENT
POPULATIONS OF *Amsonia orientalis* Decne. WITH RAPD AND SDS PAGE
METHODS**

Tuba ERBULUCU

Keywords: RAPD, *Amsonia orientalis*, Genetic Diversity, SDS PAGE, Conservation, Polymorphism

Abstract: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae) which is only situated in the east of Greece and in the west of Turkey is shown in the category of danger “Most endangered (CR, critically endangered)” according to the Red data book of Turkish plants and is listed in European scale shall be strictly protected plant species list by the European Council according to the Bern Convention. It has an anticarcinogenic and antitumor effect due to the integration of various alkaloids. Species is threatened due to the living areas which is damaged by human impact. *A.orientalis* has a narrow spread in Istanbul (Ömerli) and Balıkesir (Gaziosmanpaşa, Adnan Menderes and Paşa Alanı). In order to develop conservation strategies firstly the detection of plant genetic diversity is required. The first evaluation of genetic diversity between populations in this plant was carried out using RAPD markers. Protein profile detected by SDS PAGE in the second stage. 37 of 40 RAPD primers that were used in this study formed 118 polymorphic bands. The genetic distance among the *A. orientalis* populations varies between 0.2881-1.2443 values. When the lowest genetic distance value 0.2881 was found between populations Ömerli and Gaziosmanpaşa, the highest genetic distance value 1.2443 was found between populations Gaziosmanpaşa and Ömerli. Dendogram and the distance between populations were found with the total protein profiles obtained by SDS-PAGE technique. According to SDS-PAGE analysis, when Ömerli population is close to Gaziosmanpaşa population, Adnan Menderes populations is seen close to Paşa Alanı population.

1.GİRİŞ

Türkiye, flora ve fauna zenginliği bakımından bir kıta özelliği gösteren ender coğrafi alanlardan birisidir. Bu özelliğe sahip alanlara yerkürede çok nadir olarak rastlanmaktadır. Türkiye'nin biyolojik zenginliğinin başlıca nedenleri arasında; üç kıtanın kesiştiği bir bölgede bulunması, göç yolları üzerinde yer alması, buzul devirlerinde buzulların ülkemizin bulunduğu enlem derecesine kadar inmemesi, değişik iklim, anakaya, toprak v.b. özellikleri içeren çok sayıda farklı habitata sahip olması gibi faktörler sayılabilir. Ülkemiz florası 10000 civarında türe sahipken, yüzölçümü Türkiye'nin 13 katından fazla olan Avrupa kıtasının tamamında yaklaşık 12000 bitki türü bulunmaktadır. Türkiye florasını oluşturan taksonların % 31 kadarı endemiktir [1]. Benzer tür zenginliği Türkiye faunası için de geçerlidir. Fauna elemanlarının % 10 kadarı endemik türlerden oluşmaktadır. Bu veriler, Türkiye'nin biyolojik çeşitliliğinin dünya ölçeğinde zengin ve önemli bir yer işgal ettiğinin tipik göstergesidir [2].

Böylesine zengin biyoçeşitliliğe sahip olan Türkiye'de, halkımızın bu zenginliğimizin bilincinde olduğunu ve bunun korunması için gereken bütün tedbirleri aldığını söylemek neredeyse imkânsızdır. Gelişmekte olan bir ülke olmamızın getirdiği sanayileşme ve kentleşme, nüfus artış hızımızın Avrupa ülkelerine göre yüksek olması, halkımızın yeterince eğitilmiş olmaması, merkezi ve yerel yönetimlerin canlıların korunması için gerekli kaynağı ayırmamaları gibi pek çok olumsuz faktör nedeniyle Türkiye'deki canlı türlerinin birçoğu tehlike altında bulunmaktadır.

Amsonia orientalis Decne (syn. *Rhazya orientalis*), Apocynaceae familyasına ait bir tür olup Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'nda çok tehlike altında olan bitkiler kategorisinde yer almaktadır [3]. Bir dikotiledon olan *A. orientalis* dünyada sadece Türkiye'nin kuzeybatısında birkaç lokalitede ve Yunanistan'ın doğusunda tek bir lokalitede çok kısıtlı dağılım gösteren tıbbi değeri olan bir bitkidir [4,5]. Tutin Türkiye'deki 3 lokalitede *A.orientalis*'in varlığını rapor etmiştir. Bunlar; Menekşe Deresi, Uluabat Gölü (İstanbul) ve Hıdırlık Tepesi (Balıkesir)'dir [4]. Nadir bitkilerden biri olarak kategorize edilen *A.orientalis* Turhan Baytop tarafından 1988' de Balıkesir Hıdırlık Tepesi'nden toplanmıştır ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik Bahçesinde *ex-situ* koruma altına alınmıştır.

Ancak Özen ve arkadaşları tarafından 2009'da yapılan arazi çalışmalarında bu lokalitelerde bitkiye rastlanmamıştır. Sadece Balıkesir' deki Gaziosmanpaşa, Paşa Alanı ve Adnan Menderes ilçelerinde, hızlı yapılaşma nedeniyle tükenme tehlikesi altında bulunan küçük populasyonlar rapor edilmiştir. Ayrıca Özhatay ve arkadaşları İstanbul Ömerli Havzası'nda sınırlı bir alanda bulunduğunu tespit etmişlerdir.

“Mavi yıldız” veya “doğu razyası” gibi yaygın isimlerle anılan *A.orientalis*, Apocynaceae familyasının diğer birçok üyesi gibi tıbbi ve ekonomik öneme sahip bir bitki olup bünyesinde çok sayıda glikozitler ve glikoalkaloitler bulundurmaktadır. Literatürde, bitki bünyesinde bulunan bu biyokimyasal maddelerin özellikle kalp ve kanser hastalıkları olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmektedir [6-9]. Bitki aynı zamanda antimikrobiyal aktiviteye de sahiptir [10]. *A.orientalis* yıldız şeklinde gösterişli mavi-mor çiçeklere sahip olması nedeniyle Avrupa'daki bazı bahçelerde süs amaçlı olarak da yetiştirilmektedir [11]. Sadece tıbbi ve ekonomik önemi bakımından değil, ülkemiz ve yerkürenin biyoçeşitliliğinin korunması bakımından da önem taşıyan bir bitki olmasına rağmen *A.orientalis* üzerinde dünya literatüründe yukarıda sayılanlardan başka sadece birkaç bilimsel çalışmanın bulunması [12,13], bu bitki ile ilgili büyük bir veri eksikliği olduğunu ortaya koymaktadır.

A. orientalis, başta insan faktörü olmak üzere çeşitli nedenlerle yeryüzünden giderek tükenmektedir. Bitkinin populasyon yoğunluğunun artırılması ve doğaya yeniden kazandırılması, ekolojik dengenin ve buna bağlı olarak tüm canlı yaşamının garanti altına alınması bakımından son derece önemlidir. Bitkilerin genetik çeşitliliğinin bilinmesi, onların *in situ* korunması ve uygun koruma stratejilerin geliştirilebilmesi için temel veri sağlamasının yanı sıra ulusal bitki gen bankalarının oluşturulmasına da kaynak teşkil etmektedir [20,17]. Bu çalışmada, *A. orientalis*'in Türkiye populasyonları arasındaki genetik çeşitliliğin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) ve SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yöntemleri kullanarak populasyonlar arasındaki genetik farklılıklar ve

benzerlikleri, genetik mesafe ve polimorfizm oranları tesbit edilmiş ayrıca protein profilleri arasındaki benzerlik ve farklılıklar ortaya çıkarılmıştır.

1.1. *Amsonia orientalis* Decne.'nin Bitki Sistematikindeki Yeri

A. orientalis Decne., Apocynaceae (Zakkumgiller) familyasından çok yıllık odunsu ve lateksli bir bitkidir. Bitkiler alemindeki yeri aşağıdaki şekildedir:

Regnum	Plantae
Divisio	Magnoliophyta
Classis	Magnoliopsida
Ordo	Gentianales
Familya	Apocynaceae
Genus	<i>Amsonia</i>
Species	<i>Amsonia orientalis</i>

1.2. *A. orientalis*'in Tanımlanması ve Genel Görünüşü

A.orientalis, tıbbi potansiyeli ve ekonomik değeri olan, 30-60 cm boyda, latekse sahip, dallı, çok yıllık bir bitkidir. Yaprakları neredeyse sapsız, dar yumurtamsı veya mızrağımsı, 3-7 × 0,5-3,5 cm, tabanı kama şeklinde veya yuvarlak, uç kısmı dar veya sivri uçlu, kenarı ve yaprak orta damarı haricinde tüylüdür. Genç yapraklar genelde tüylüdür ve birçok yan damara sahiptirler.

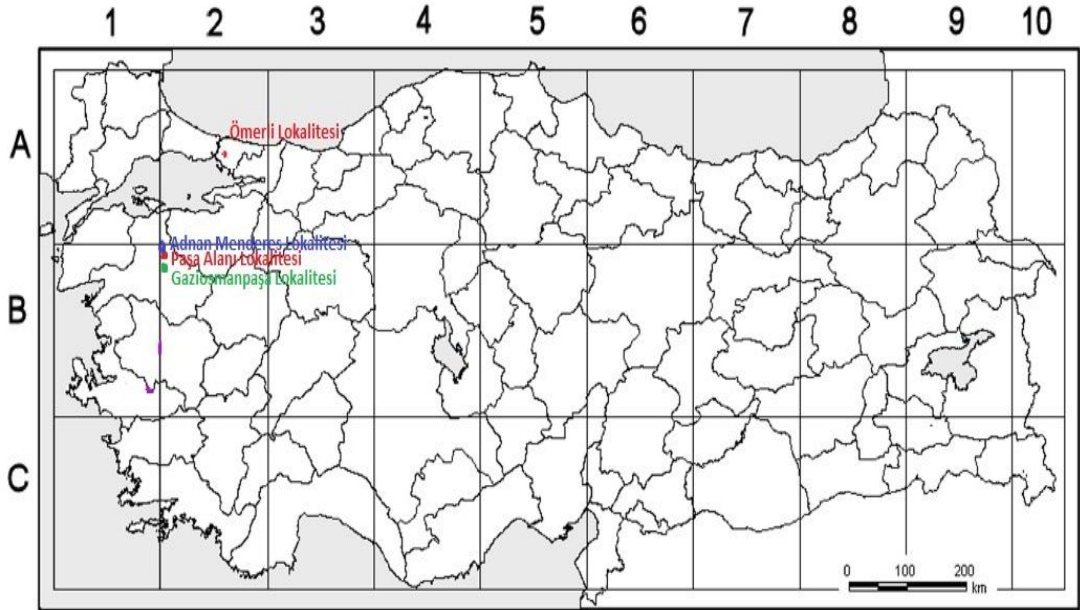


Şekil 1.1: *Amsonia orientalis*'in genel görünüşü

Çiçek örtüsü yoğun veya seyrek olabilir fakat bol çiçeklidir. Kaliks 2-3 mm dir. Korolla yıldız şeklinde, soluk veya parlak mavidir. Çiçek rengi mavi-lavanta olabilir. Korolla tübü yaklaşık 10-12 mm ve lobları 4-5,5 mm uzunluğundadır. Tohumları 3-5 cm uzunluğundaki meyvelerin içinde oluşurlar ve 6-8 mm boyundadırlar [5,20]. Bitkinin yaprakları bifasiyaldir. Epidermis bir katmanlı hipodermis ise yoktur. Palizat parankiması sünger parankiması ve epidermis arasında iki katman halinde uzanır. Anatomik yönden yapraklar hipostomatiktir ve stomaları amarilis tiptir [10].

1.3. *A.orientalis*'in Dünyadaki ve Türkiye'deki Yayılışı

A.orientalis Türkiye'de ve Yunanistan'ın Kuzeydoğusu'nda doğal olarak yayılış göstermektedir [4]. Davis (1978), türün Türkiye ve Yunanistan'da yayılış gösterdiğini fakat Yunanistan'daki popülasyonun tükenmeye yakın olduğunu rapor etmiştir [5]. Yunanistan popülasyonunun halen yayılış gösterdiğine dair yakın tarihli bir floristik kayıda rastlanmadığından, *A. orientalis*'in Yunanistan'da tükenmiş olma ihtimali oldukça yüksektir.



Şekil 1.2: *A.orientalis* bitkisinin Türkiye'de bulunan popülasyonlarının lokaliteleri

A. orientalis için ülkemizde ise Apolyont (Uluabat) Gölü, İstanbul Menekşe Deresi (Halkalı) ve Balıkesir Hıdırlık Tepesi olmak üzere toplam üç lokalitede bulunduğu bildirilmektedir. Yapılan arazi çalışmalarına göre *A. orientalis* Türkiye'de sadece Balıkesir ilinde bulunmuş fakat daha sonra Ömerli Havzası'nda küçük bir

populasyonun yayılış gösterdiği rapor edilmiştir. Bitki Balıkesir ilinde yaklaşık 10km² alanda yayılış göstermektedir [10].

1.4. *A.orientalis*'in Biyokimyasal Özelliği, Habitat ve Ekolojisi

İçerdiği alkaloidler yönünden önemli türlere sahiptir [6,19,20]. Günümüze değin *Amsonia* türleri ve özellikle *A.orientalis* üzerinde alkaloid içeriği yönünden önemli çalışmalar yapılmış ve bu taksonun 13 çeşit alkaloid bulundurduğu rapor edilmiştir. Bu alkaloidlerin bir kısmı antikanser özellikleriyle tıbbi öneme sahiptirler [6,7].

Balıkesirde kış boyunca nemli yerlerde büyür. *Hordeum bulbosum* L., *H. Nurinum* L., subsp *glaucum* (Stuedel) Tzvelev, *Salix alba* L. ve *Hypocoum procumbens* L. gibi diğer türlerle birlikte akarsu ve göl kenarları boyunca bulunabilir [12].

1.5. *A.orientalis*'in Durumu ve Tehlike Kategorisi

Araştırma materyali olan *A.orientalis*, dünyada sadece Yunanistan ve Türkiye'de yayılış gösteren, tıbbi ve ekonomik öneme sahip bir bitki türüdür. Bu bitki, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabına göre CR (çok tehlikede) tehlike kategorisinde bulunmakta ve Türkiye'nin de imzaladığı Bern Sözleşmesi gereği Avrupa Konseyi tarafından Avrupa ölçeğinde mutlak korunması gereken bitki türleri arasında yer almaktadır [21,3]. *A.orientalis*'in Türkiye'deki her bir populasyonunun yayılış alanı 10 km²'den daha azdır [12].

1.6. *A.orientalis* İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Dünya ölçeğinde yapılan literatür taraması sonucunda, *A.orientalis* üzerinde yapılan çok sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bunlardan Dabiné Lengyel ve ark. (1986), HPLC analizi ile *A.orientalis*'in (syn. *Rhazya orientalis*) secologanin içeriğini ortaya koymuşlardır [6]. Secologanin, indole alkaloidlerin oluşmasında rol oynayan önemli bir iridoiddir. Bu çalışmada secologanin içeriğinin ortalama değeri % 3.27 olarak bulunmuş ve bu nedenle *A.orientalis*' in farmasotik endüstrisi için uygun bir hammadde kaynağı olduğuna işaret edilmiştir.

Rahman ve ark. (1989) tarafından yapılan derlemede, *Rhazya stricta* ve *Rhazya orientalis*'in alkaloidleri listelenmiştir. Bu çalışmada, bu iki bitkiden 75 alkaloidin rapor edildiği ve bunlardan 12 tanesinin *A.orientalis*'de bulunduğu görülmektedir. *A.orientalis*'in içerdiği alkaloidler, tabersonine; 15,20,15', 20'-tetrahydropresecamine;

15,20,15', 20'-tetrahydrosecamine; secamine; vallesiachotamine; picralinal, picrinine; tetrahydrosecodin-17-ol; dihydrosecodin-17-ol; tetrahydrosecodin; carboxystrictosidine ve strictosidine'dir [7].

Akın ve ark. (2001) tarafından sonuçlandırılan TÜBİTAK destekli projede *Rhazya orientalis* bitkisinden kardiyolojik glikozitler, glikoalkaloitler ve yeni glikozitler izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır. Bu çalışmada, bileşiklerden ikisinin glikozit, birinin aglikon ve bir tanesinin de glikoalkaloit olduğu, bu glikoalkaloitin daha önce literatürde *Rhazya stricta*'dan tanımlanan strictosamide olduğu belirtilmiştir [8]. Özen (2002), *A.orientalis*'in Balıkesir'de yayılış gösterdiği habitatın özelliklerini, ekonomik önemini, ekolojik isteklerini ve tehlike durumunu ana hatlarıyla belirterek renkli resimlerle tanıtımını yapmıştır [12].

Itoh ve ark. (2002), *Rhazya orientalis* üzerinde yaptıkları çalışmada bu bitkinin kuru toprak üstü kısımlarından altı yeni flavonoid glikozit izole ederek bunların yapılarını aydınlatmışlardır [9].

Özen (2006)'in *A.orientalis*'in birey ekolojisi üzerine yaptığı çalışmada, bu bitkinin yetiştiği topraklardaki besin elementleri ile bitki bünyesindeki besin elementleri karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. İkisi arasındaki farklılıkların nedenlerinin tartışıldığı bu çalışmanın sonucunda *A.orientalis*'in sağlıklı gelişme için ihtiyaç duyduğu iklim faktörleri ile yetiştiği toprakların fiziksel ve kimyasal özellikleri ayrıntılı olarak verilmiştir [13].

Akyalçın ve ark. (2006), *A.orientalis*'in kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinin iç ve dış morfolojilerini, alınan kesitlerden çekilen ışık mikroskobu ve polenlerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleriyle destekleyerek sunmuşlardır. Bu çalışmada *A.orientalis*'in, dördü maya, on tanesi de bakteri olmak üzere toplam 14 mikroorganizma üzerindeki aktivitesi araştırılmıştır. *A.orientalis* özütünün, çalışılan mayalardan ikisi üzerinde standart antibiyotiklerden daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiği, bir maya üzerinde nystatin antibiyotiği ile eşit etki gösterdiği, bir mayanın ise bu bitkinin özütüne karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Yine bu çalışmada, bitki özütünün, kullanılan on bakteriden altısına karşı standart antibiyotiklere göre daha fazla bir inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir [10].

Öz vd. (2008) *A. orientalis*'in bitkinin tohumlarının çimlendirilmesinden elde edilen bitkiciklerin eksplant kaynağı olarak kullanılarak doku kültürü ile çoğaltımı üzerine yapılmış olan bir çalışmadır. Literatürde bu türün doku kültürü ile çoğaltımı üzerine farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının etkileri üzerine yapılmış ve eksplant kaynağı olarak arazide yetişen olgun bitkilerin kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır [14].

A.orientalis bitkisinin *in vitro* çoğaltımında farklı konsantrasyonlarda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma ile ilk defa olgun *A. orientalis* bitkisinden alınan nodal eksplantlar kullanılarak bu bitki için etkin ve hızlı bir rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir [15].

Literatürde *Amsonia* (syn. *Rhazya*) genusunun *A.orientalis* dışındaki diğer türleri üzerinde yapılan bazı araştırmalara rastlanmıştır. Bunlardan Molnar ve ark. (1986), *Amsonia tabernaemontana*'da büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu sıvı besiyerinde bitki üretimini araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonuçlarına göre gövde eksplantından bir hafta içinde yeni tomurcuklar ve iki hafta içinde ise kök oluşumu gerçekleşmiştir [22].

Wahyuono ve ark. (1987), Arizona'da yayılış gösteren *Amsonia grandiflora*'nın triterpenoitlerini çalışmışlar, bu türün koruma altına alınması gerektiğini bildirmişlerdir [23].

Engelmann (1989), *Rhazya orientalis* ve *Rhazya stricta*'nın hücre süspansiyonlarının sıvı azotta (-196°C) uzun süre muhafaza edilebildiğini ifade etmiştir [24].

Sauerwein ve ark. (1991), *Amsonia elliptica*'nın kökü ile yaptıkları doku kültürü çalışmalarında besiyeri olarak B5 ve büyüme düzenleyicisi olarak naftalen asetik asit kullanıldığında, bitki rejenerasyonu ve alkaloid üretiminde artış olduğunu rapor etmişlerdir [25]. Yine *Amsonia elliptica*'nın hücre kültüründe yapılan sterol analizinde, bitkide bulunan temel sterolün campesterol olduğu tespit edilmiştir [26].

Weber ve ark. (1995), Apocynaceae familyasında VA (vesicular-arbuscular) mikorizanın anatomik yapısını araştırdıkları çalışmada, konak *Amsonia tabernaemontana*'da arbuscular mikorizanın (AM) varlığını göstermişlerdir [26].

Al-Rajhi ve ark. (1997), Suudi Arabistan'da yetişen *Rhazya stricta*'nın nematisit (Nematod'lara karşı) etkisini araştırmışlar ve *Meloidogyne javanica*'ya karşı etkili olduğunu tespit etmişlerdir [28].

Assaeed ve Al-Doss (1997), Suudi Arabistan'daki bazı mera bitkileri üzerinde *Rhazya stricta*'nın allelopatik etki gösterdiğini belirlemişlerdir [29].

Amsonia tabernaemontana'da tohum çimlendirme denemelerinde ortama Gibberellik asit (GA3) ilave edildiğinde çimlenme yüzdesinde artış olduğu saptanmıştır [30].

Assaeed ve Al-Doss (2001)'un gerçekleştirdiği çalışmada, *Rhazya stricta* ve *Lasiurus scindicus*'un su stresine karşı fide oluşturma rekabetini çalışmışlardır. Bu çalışmada, *Rhazya stricta*'nın su stresinde fide verme oranının *Lasiurus scindicus*'a göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir [31].

Amsonia stricta ile ilgili Suudi Arabistan'da yapılan bir diğer çalışmada, Kamel & Al-Mutlaq (2004), bu bitkinin *Triticum aestivum*, *Medicago sativa*, *Lolium multiflorum* ve *Raphanus sativus* üzerinde herbisidal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir [32].

Stano ve ark. (2005), *Amsonia tabernaemontana* tarafından salgılanan aminopeptidaz aktivitesini göstermişlerdir. Bu çalışmada, *Amsonia tabernaemontana*'nın hücre süspansiyon kültüründe aminopeptidaz aktivitesinin hücre dışı dağılımının % 9.0, hücre içi dağılımının ise % 91.0 olduğu tespit edilmiştir [33].

Stano ve ark. (2007) yaptıkları farklı bir çalışmada ise, *Amsonia tabernaemontana*'nın hücre süspansiyon kültüründe hücre dışı sukraz enziminin varlığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada hücre dışı sukraz üretiminin, bitkilerden salınan diğer hidrolitik enzimlerde olduğu gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir [34].

2. BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE ÖNEMİ

Biyolojik çeşitlilik, biyoloji ve çevre bilimi için yaratıcı düşünce işlevi görecek olan bir kavramdır. Biyolojik çeşitlilik içerisinde genetik konusu, yararlı hayvanlar ve şifalı bitkilerle birlikte ele alınabilir. Bu da türlerin ve tabiatın korunmasının göz önünde tutulmasının göstergesidir.

Biyolojik çeşitlilik; habitatların bozulması, parçalanması ve kaybolması, aşırı tüketim, çevre kirliliği, yabancı türlerin ve genetik olarak değiştirilmiş organizmaların geliştirilmesi, küresel iklim değişiklikleri, yoğun tarım ve ormancılık faaliyetleri sonucunda giderek azalmakta veya yok olmaktadır. Günümüzde dünyadaki türlerin kaybolma tehlikesi ciddi boyutlara ulaşmıştır.

2.1. Genetik Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması

Genetik çeşitlilik, hem coğrafik olarak birbirlerinden izole edilmiş ya da izole olmuş popülasyonlardaki hem de bir popülasyonun bireyleri arasındaki farklılaşmaların ifadesidir. Yani bir tür içerisindeki farklılığı gösterir. Bu da mutasyonlarla oluşan DNA'ların çeşitliliğinden kaynaklanır. Tür çeşitliliği, onun genetik farklılığı ve ekosistemin çeşitliliği, ekosistem içerisinde görülen işlevlerin çokluğunun temelini oluşturur [35, 36].

Normal olarak bir türe ait çeşitli popülasyonlar ve bu popülasyonların içinde de birbirinden farklı binlerce birey bulunur. Bir türe ait her birey, türün başka bireyleri ile ortak genleri paylaşmasına rağmen taşıdığı pek çok gen bakımından farklı bir genetik yapıya (genotip) sahiptir. Bir türün popülasyonları arasında da morfolojik, anatomik, fizyolojik, biyokimyasal ve davranış özellikleri bakımından çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Popülasyonlar arasındaki farklılıklar bir genin farklı allellerinden ve bu allellerin popülasyonlar arasında farklı frekans dağılımlarından ileri gelmektedir. Bir tür içindeki genetik farklılıkların tümü "genetik çeşitlilik" olarak adlandırılmaktadır [37].

Kaynakların korunmasında bu güne kadar olan çabaların en etkin olanı, 1992 yılında Rio de Janeiro'da 170 ülkenin katıldığı bir toplantının sonucunda biyolojik çeşitliliğin

korunması sözleşmesidir. Bu sözleşmenin amacı; biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir yararlanmanın eşit ve adaletli bir şekilde kullanılmasıdır [38].

Temelde her biri dağınık tekniklerin bir araya gelmesiyle oluşan iki temel koruma sistemi vardır. Bu iki uygulama, *ex situ* ve *in situ* koruma olarak açıklanır. Bunlar arasındaki farklılık; Biyolojik Çeşitlilik Komisyonu (UNCED,1992) tarafından şu şekilde tanımlanmıştır:

Ex situ koruma; genetik çeşitlilik unsurlarının doğal habitatları dışında korunmasıdır. Konuya ilişkin bilimsel teknikler 1960'lı ve 1970'li yıllarda [37,38] geliştirilmiş ve 1974 yılında IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute)'nin kurulması sağlanmıştır [41].

In situ koruma; ekosistemlerin ve doğal habitatların korunması ve o türe ait popülasyonların kendi çevresi içinde canlı olarak saklanıp, devam ettirilmesi ya da kültür çeşitlerinin kendi özelliklerini geliştirdikleri çevre koşullarında yetiştirilmesidir.

2.2. *In situ* ve *Ex situ* Koruma

Bir türün ve onun taşıdığı genlerin korunması işlemi, en iyi şekilde o türün doğal yaşama ortamlarında gerçekleşebilir. Bu doğal ortam, aynı zamanda başka türlerin de yaşadığı bir ekosistemdir ve bu ekosistemde bir hedef tür korunurken bu arada birçok başka tür de korunmuş olur. *In situ* koruma, biyolojik çeşitliliğin ve onun bir parçası olan gen kaynaklarının korunması için etkin bir biyolojik yöntemdir. Bu koruma yöntemi ile bitkisel gen kaynağının bulunduğu sınırlı bir alan, insan ve evcil hayvanlar tarafından kullanılmadan olduğu gibi koruma altına alınmış olur. *In situ* koruma yönteminde doğal kaynaklar ya da bitki genetik kaynakları doğal yaşam alanlarında çeşitliliğini devam ettirerek sistemdeki bitkiler evrimlerini sürdürebilmekte ve yeni özellikler taşıyan bitkilerin ortaya çıkmasına olanak sağlanmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli çevre olaylarının etkisiyle de evrim süreci sırasında çok kullanışlı olan bazı karakterlerin yitirme riski karşısında *in situ* koruma yöntemi, bitkisel gen kaynaklarını korumada tek yöntem olmayıp, *ex situ* yönteminin tamamlayıcı bir unsur olarak ve birlikte ele alınmalıdır. Türkiye'de *in situ* koruma çalışmalarına oldukça geç başlanmış olup, ilk projeli *in situ* çalışması "Genetik Çeşitliliğin Yerinde (*in situ*) Muhafazası" isimli proje 1993 yılında başlamıştır [42].

Ex situ koruma, bitki genetik kaynaklarının ya da genetik çeşitliliğin doğal habitatları dışında (tohum depolama, in vitro depolama, DNA depolama, çiçektozu depolama,

tarla gen bankası, botanik bahçeleri şeklinde) korunması yöntemidir. Bugün için dünyada bitkisel gen kaynaklarının korunmasında en yaygın olan yöntem *ex situ*'dur. Bunun nedeni ise, yeri dışında korumanın daha kolay ve daha ucuz olmasıdır. Ancak bu yöntemin bazı sakıncalı yönleri de bulunmaktadır. Evrimleşmenin bitki ile çevre arasındaki etkileşimin sonucu olarak ortaya çıktığı ve nesiller boyunca ortaya çıkan genetik farklılaşmalar şeklinde kendini gösterdiği düşünüldüğünde, *ex situ* koruma yönteminin mevcut çeşitliliğin ancak küçük bir bölümü kontrol altına alınabilecektir. Ülkemiz, bitki genetik kaynaklarının *ex situ* korunması çalışmaları yönünden öncü konumunda olup, yerel bitki çeşitlerinde *ex situ* koruma çalışmaları Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesinde 1964 yılında başlamıştır.

2.3. Moleküler Markırlar

Son 20 yıl içerisinde hızla gelişen moleküler markır teknolojisi, çeşitlerin birbirleri arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi, kromozom haritalamaları, gen kaynaklarının karakterize edilmesi, evrimsel gelişim analizi ve transformasyonda başarı düzeyinin belirlenmesinde yeni yöntemler ortaya koymuştur. Bu yöntemler klasik yöntemlere göre büyük avantajlar sağlamaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal markırların uygulamadaki yetersizlikleri moleküler markırların uygulanmasıyla ortadan kalkmıştır. Moleküler teknikler, diğer tekniklere göre daha fazla avantajlara sahip olup, çevre faktörlerinden etkilenmezler ve polimorfizm oranları yüksektir. Aynı zamanda pleotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermeyip son derece stabildirler [43-46].

Fenotipik özelliklere göre yapılan morfolojik-agronomik gruplamalar çevreden etkilenen az sayıda karaktere dayandığından gerçekte uzak ilişkili iki grup oldukça yakın akraba olarak görülebilir. Ayrıca bu karakterler birbirine oldukça yakın genotipler arasında sınırlı sayıda polimorfizm gösterirler [47].

Bireyler veya populasyonlar arasındaki varyasyon morfolojik özelliklere ve biyokimyasal parametrelere (izoenzim analizi ve tohum depo proteinleri) dayandırılarak da belirlenebilmektedir [48]. Bitki genetik haritalarının oluşturulmasında kullanılan markır sistemlerinden biri olan fenotipik markırlar, yaprak veya çiçek morfolojisini etkileyen özellikler ile bitki boyu ve pigment biosentezi gibi birçok özelliklerdir. Fenotipik markırlara dayalı genetik haritalar "klasik haritalar" olarak isimlendirilmektedir [49].

2.3.1. Proteine dayalı markırlar

Proteinler, insan ve hayvanlar için besin kaynağı oldukları gibi aynı zamanda, bir organizmanın tanımlanmasını sağlayıcı yapısal bilgileri gösteren, bazen organizmanın evrimsel tarihinin anlaşılmasını mümkün kılacak bilgileri sunan moleküllerdir [50]. Bu bilgilere ulaşmak ise elektriksel alanda bulunan jelatinli bir ortamda, değişik protein moleküllerinin, farklı şekilde hareket etmeleri prensibine dayanan protein elektroforezi ile mümkün olabilmektedir [51].

Elektroforetik analizler, gen ürünleri olan enzimlerin ya da diğer proteinlerin yapısal değişikliklerinin ortaya çıkarılmasını sağlayan önemli analitik yöntemlerdir ve bu elektroforetik belirteçler (markır) DNA'nın üçüncü kuşak kopyası olduklarından genetik bilgilere çok yakındır [52]. Proteinlerin sunduğu bu bilgilerin güvenilirliği, mRNA ve DNA moleküllerinden düşük de olsa, enzim ürünleri veya bunun gibi moleküllerden üstündür [50]. Proteinlerin bu özellikleri, kolay ekstrakte edilmeleri ve jel elektroforezinin proteinler arasındaki farklılıkları ayırt edebilme gücü fenotipik karakterleri karşılaştırmak için kullanılabilir iyi bir kombinasyon oluşturur. Bu yüzden elektroforetik analizler genetik kaynaklara ulaşılmasında, genotipler arası farkların gösterilmesinde oldukça güçlü ve ucuza malolan tekniklerdir ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde direkt DNA veya RNA seviyelerindeki çalışmalardan ziyade bu yöntemin tercih edilmesi daha avantajlıdır. Ayrıca bu yöntemler bize; sayısı gittikçe artan çeşitlerin sağlığını göstermek, çeşitler arası tanımlama yapmak, biyosistemik analizlere yardımcı olmak, türlerin filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarmak, genetik çeşitlilik hakkındaki bilgileri arttırarak evrime destek sağlamak konularında da yardımcı olur [53-57]. Uzun süreden beri yapılan çalışmalarda, değişik şekillerdeki jel elektroforezi metodlarıyla, pekçok bitki türünün tohum veya yaprak proteinlerinin ya da enzimlerinin elektroforetik analiziyle, yukarıda bahsedilen, çeşitlerin saflığını göstermek, çeşitler arası tanımlama yapmak, biyosistemik analizlere yardımcı olmak, türlerin filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarmak, genetik çeşitlilik hakkındaki bilgileri arttırarak evrime destek sağlamak konularında değerli bilgiler elde edilmiştir [58].

Biyokimyasal teknikler arasında yer alan SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) bitki koleksiyonlarının genetik yapısını tanımlamadaki kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir [59]. SDS-PAGE; proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemede en yaygın olarak kullanılan poliakrilamid jel elektroforez tipidir. SDS (sodyum dodesil sülfat) bir anyonik deterjan

olup proteinlere sıkıca bağlanarak proteinlerin denatürasyonunu sağlar. Yaklaşık 1 g protein başına 1.4 g SDS varlığında proteinler birim kütle başına sabit negatif bir yük kazanırlar. Yani protein molekülünde her üç aminoasitlik birime bağlanarak proteinlere homojen negatif bir yük kazandırır. Böylece proteinler yük bakımından eşitlendiği için moleküler ağırlıklarına göre separasyonları gerçekleşecektir.

Oluşan SDS-protein kompleksi elektroforez sırasında anoda doğru hareket kazanırlar. Jelin moleküler elek özelliğinden dolayı belirli bir sürede katettikleri mesafe moleküler ağırlığa göre proteinden proteine farklılık gösterecektir. Eğer moleküler ağırlığı bilinen standart bir protein de aynı ortamda yürütüldüklerinde örnek proteinlerin moleküler ağırlıkları belirlenebilir. Standart SDS-PAGE' ler anodun aşağıda olduğu bir şekilde dikey olarak yürütülürler. Protein örnekleri genellikle pH' sı 6-8 olan tris tamponları içinde çözülür. Bu tamponlar denatüran olarak SDS, disülfid bağlarını indirgeyen β -merkaptolanol, yoğunluk verici olarak sükröz veya gliserol, iz boyası veya markır olarak da bromfenol mavisi içerir. Separasyonun gerçekleştirileceği jel genellikle Stacking (Dengeleme) ve Separating (ayırma) jeli olarak iki kısımdan oluşur. Bunlar akrilamid konsantrasyonları bakımından birbirlerinden farklıdır. Bu iki jeldeki pH ve konsantrasyon farklılığı sayesinde, proteinlerin rezolüsyonu artırılır, elektriksel akımdan dolayı yönlendirme ve hareket kazandırılarak ayırma jelinde bantlaşma artırılır.

2.3.2. DNA'ya dayalı markırlar

Biyoloji alanındaki gelişmeler moleküler biyolojide dev adım kabul edilen DNA'nın yapısının açıklanmasından sonra büyük bir hız kazanmıştır. Saiki vd (1985) mevcut yöntemleri geliştirerek ve duyarlılıklarını artırarak, DNA'nın aslına sadık kalarak *in vitro* çoğaltma esasına dayalı bir teknik olan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)' ı geliştirmeleri bir çığır açmış, moleküler ve biyokimyasal alanda bitkisel ve hayvansal organizmaların gerçek orijinleri olan filogenetik (akrabalık ilişkisi) sınıflandırmaları yapılmaya başlanmıştır [60]. Ayrıca Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerazın çalışmalara katılması ile de hızlı çoğaltma tekniği geliştirilmiştir. Bu gelişmeler sayesinde canlıların DNA dizin haritalarının çıkarılması, diğer canlılarla benzerlik ve farklılıklarının tespit edilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Gelişen bu teknikler sayesinde genom üzerinde bulunan ve karakterleri kodlayan genler belirlenmeye başlanmıştır. Belirlenen bu genlerden önemli olanlar ıslah çalışmaları ile geliştirilmesi arzu edilen bireylere aktarılmaya çalışılmaktadır. Günümüzde bitki

türlerinin tanımlanmasında ve genetik varyasyonun araştırılmasında moleküler markırlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.4. Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Moleküler belirleyiciler, bitkilerin DNA parmak izlerinin çıkarılması ve çeşit tanımlamasında da yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Parmak izi analizleri kullanılarak tescile sunulan çeşit adaylarının genetik özellikleri belirlenebildiği gibi çeşit adayının elde edilmesinde kullanılan anaçlar da saptanabilmektedir. Bu durum, ekonomik açıdan önemli genetik kaynakların belirlenmesi ve Türkiye gibi birçok bitkinin gen merkezi durumunda olan ülkelerde, yabancı gen kaynaklarının korunması açısından son derece önemlidir [61].

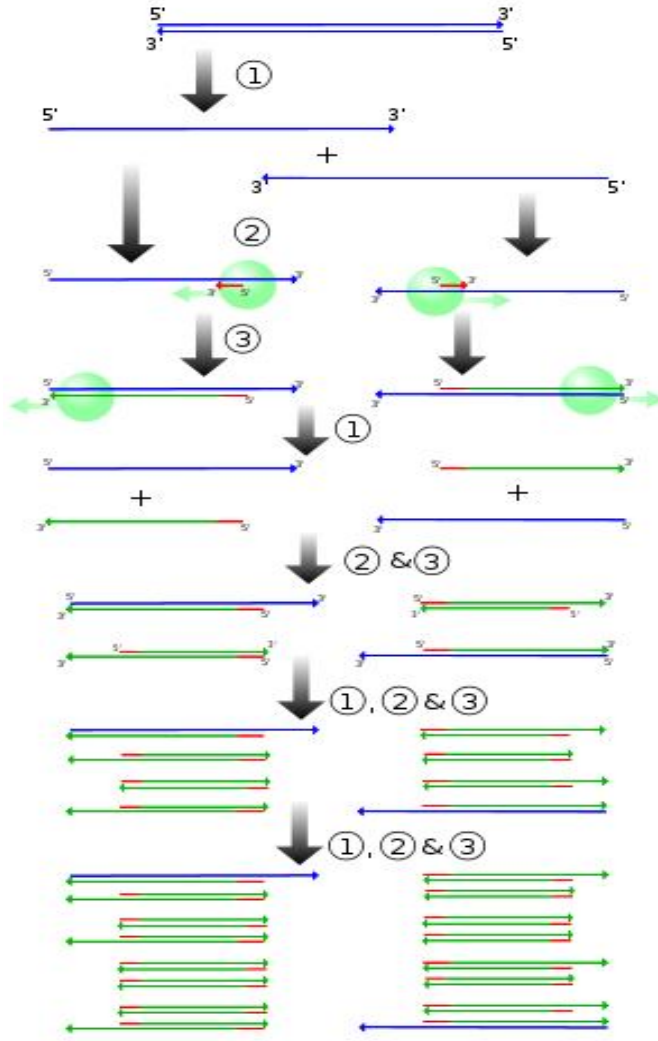
Polimorfizm, DNA'daki yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve parça yerleşmeleri ile meydana gelir ve genleri, onların düzenlenmelerini, biyokimyayı, gelişmeyi, morfolojiyi, davranışı etkileyeceğinden evrim sürecinde fenotipik varyasyonun da kaynağıdır [62]. PCR ile spesifik DNA parçacıklarının çoğaltılması sağlanarak DNA polimorfizmi belirlenebilmektedir. Protein veya DNA markırlarına dayanan haritalar "moleküler haritalar" olarak adlandırılmaktadır. Birçok tarla bitkisinde genetik uzaklık, moleküler, kimyasal ve morfolojik özellikler kullanılarak belirlenebilmektedir. Organizmalar arasındaki genetik varyasyonun daha iyi anlaşılabilmesi için, bu araçların tamamına ihtiyaç duyulmaktadır. DNA dizindeki polimorfizmin belirlenebilmesi için son yıllarda RFLP (kesilmiş parça uzunlukları polimorfizmi), AFLP (çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi), SSR (basit dizin tekrarları) ve RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) gibi moleküler markır teknikleri geliştirilmiştir. Tesadüfi olarak bazı primerlerin kullanılması ile elde edilen markırlar, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA'lar (RAPDs) olarak isimlendirilmektedir. Bu markırlarda herhangi bir spesifik DNA dizine ya da spesifik primerlerin sentezine ihtiyaç yoktur. Fragmentler PCR'da primer olarak kullanılan rastgele ve çok kısa DNA parçacıklarından çoğaltılmaktadırlar. Böylece farklı bir lokusu temsil eden her bir PCR ürünü ile DNA düzeyindeki farklılık tahmin edilebilmektedir [63].

2.4.1. RAPD tekniği ve uygulama alanları

RAPD ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR'ı temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır [64]. RAPD yöntemi, tek, kısa ve rastgele oligonükleotid primerler kullanarak DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanır. Bu

yöntem duyarlı, hızlı ve çok sayıdaki örneğe uygulanabilen bir tekniktir. Bu primerler genetik işaretleyici olarak ve özgün nükleotid dizi bilgilerine gerek duymadan polimorfizmi belirlemede kullanılabilir [65]. RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü standart agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir [66]. Polimorfizmin tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan RAPD yöntemi bitki genetik haritalarının oluşturulmasına da imkân sağlamaktadır.

RAPD yönteminde izole edilen DNA'nın çok az miktarları (25 ng) rastgele seçilmiş bir primer yardımı ile çoğaltılır. Bu çoğaltım sırasında toplam genomik DNA'nın belirli bölgelerine homolog olan primer dizisi (tek iplikli dizi) DNA sentezini başlatmada rol oynarlar. Sıcaklığın 95°C'ye yükselmesi ile çift iplikli DNA önce denatüre edilir. Daha sonra sıcaklık düşürülerek (45-55°C) reaksiyon ortamında bulunan primerin DNA'ya yapışması sağlanır. Sıcaklığın 72°C'ye çıkarılması ile DNA sentezi başlatılır. Bu işlemler 35-45 kez tekrarlanır. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler jel üzerinde yürütülerek PCR ürünleri gözlenir [64,66].



Şekil 2.1: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 1) Denatürasyon, 2) Primer Bağlanması, 3) Uzama

Moleküler sistematik ve bitki genom haritalarının çıkartılmasında RAPD-PCR başarıyla kullanılmaktadır [64,66,67]. DNA belirleyicileri son yıllarda kuramsal ve uygulamalı genetik çalışmalarda, bitki ve hayvan türlerinde çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu alanların en önemlileri genetik ve fiziksel kromozom haritaları ve markır destekli seleksiyondur [68]. Bunlara ek olarak moleküler markırlar bitkiler aleminde genetik materyalin karakterizasyonu, genetik teşhis, transformantların karakterize edilmesi ve filogenetik analizlerde de yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [69]. Bu belirleyiciler kullanılarak genetik varyasyon araştırılmakta ve türlerin taksonomik tanımlaması yapılarak, filogenetik akrabalıkları saptanabilmektedir [70-72].

RAPD markırları kullanılarak genetik haritalamanın pek çok avantajı vardır. Bu yöntemde büyük varyeteli türlerde genomik analiz için genel bir primer seti kullanılır. Bazı moleküler tekniklerde olduğu gibi klonlanmış DNA problemlerinin izolasyonu ve hibridizasyon gibi ön hazırlıklara bu teknikte ihtiyaç yoktur [64]. RAPD tekniği, basit olmasının yanında çok sayıda bitki türünde uygulanabilmesi nedeni ile yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, belirteçlerinin dominant olması sebebiyle heterozigotları teşhis etmenin zor olmasıdır. Reaksiyon birçok hassas değişkenle birbirine bağlı olduğu için, elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği düşüktür.

Bu çalışmada *A. orientalis*' in RAPD yöntemi ile Ömerli, Gaziosmanpaşa, Paşa Alanı ve Adnan Menderes olmak üzere Türkiye'de bulunan 4 farklı popülasyonu arasındaki genetik çeşitlilik tespit edilmiş; ayrıca SDS-PAGE yöntemi ile yaprak dokularındaki toplam protein miktarlarındaki farklılıklar saptanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar ve Tampon Çözeltiler

DeneYlerde kullanılan cihazların marka ve modelleri Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1: DeneYlerde kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Marka ve Modeli
-86°C Ultra Derin Dondurucu	Hettich Freezer
Buzdolabı	Arçelik,5243 NEB No-Frost
Saf Su Cihazı	GFL 2001/4
Hassas Terazı	AND GR-200
Vorteks	IKA, GENIUS3
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Elektroforez	Thermo Electron corporation, EC330, Midicell PRIMO
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo electron corporation, EC250-90
Isıtıcı Blok	Variomag powertherm
Thermal Cycller	Techne, TC-3000
UV Transilüminatör	UVP-GelDoc-it, imaging system PIN 97-0266-02
UV Visible Spektrofotometre	Shimadzu UV mini-1240
Ultra Santrifüj	22R centrifuge BECKMAN COULTER
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Mikropipet Takımı	Eppendorf (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)
Çalkalayıcı	Heidolph, Titramax
pH-metre	Inolab WTW series
Sıvı azot tankı	MVE

DNA izolasyonu için kullanılan DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) içerisinde bulunan tampon çözeltiler şunlardır: Tampon AP1, Tampon AP2, Tampon AP3/E, Tampon AW, Tampon AE.

PCR-RAPD deneyinde kullanılan Taq PCR Core Kit (QIAGEN) içerisinde bulunan tampon çözeltiler şunlardır: PCR Tamponu, dNTP Karışımı, MgCl₂, Taq DNA Polimeraz.

SDS-PAGE deneyinde kullanılan stok çözeltilerinin içerikleri ve hazırlanması şu şekildedir:

1.5 M Tris pH 8.8 Tamponu; 18,16 g Tris base ve 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti Whatman No:1 filtre kağıdı ile filtre edilerek, otoklav edilip, oda sıcaklığında saklandı.

1 M Tris pH 6.8 Tamponu; 12,11 g Tris base ve 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlandı. Tris, deiyonize su içinde çözündürülerek 3 N HCL ile pH'ı 6.8'e ayarlandı. Hazırlanan çözelti Whatman No:1 filtre kağıdından filtre edilerek, otoklav edilip, oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat; 5 g Sodyum dodesil sülfat deiyonize su ile 50 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

%10 Amonyumpersülfat; 0.1 g Amonyumpersülfat deiyonize su ile 1 ml'ye tamamlandı. Kullanımdan hemen önce hazırlandı ve +4°C'de bekletildi.

5 X Koşturma tamponu pH 8.3; 3,75 g Tris base, 18 g Glisin, 5 g Sodyum dodesil sülfat deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 1 N NaOH veya 1 N HCL kullanılarak 8.3'e ayarlandı. Tampon 5 X olarak hazırlandığı için kullanımdan önce 5 kez sulandırılarak 1 X'e ayarlandı.

Boyama çözeltisi; 1 g Coomassie Brilliant Blue, 500 ml Metanol, 100 ml Glasial asetik asit deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından filtre edilerek karanlıkta oda sıcaklığında saklandı.

Yıkama çözeltisi; 125 ml Metanol, 175 ml Glasial asetik asit deiyonize su ile 2200 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında, karanlıkta saklandı.

Fosfat tuzlu tampon (g/L) pH 7.4 (PBS Tamponu); 8 g Sodyum klorür, 0,2 g Potasyum klorür, 1,44 g Disodyum fosfat, 0.24 g Potasyum fosfat, deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 7.4'e ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

3.2. Bitki Örneklerinin Toplanması

A.orientalis'in yayılış gösterdiği doğal habitatlara Nisan-Haziran ayları arasında yapılan arazi çalışmalarında farklı populasyonlardan zarar vermeyecek miktarda yaprak örnekleri alındı. Tüm örneklerin populasyonu en iyi temsil eden, böcek yeniği vb. zarar görmemiş sağlıklı örnekler olmasına dikkat edildi. Toprakla birlikte laboratuvara getirilen taze bitki örnekleri DNA ve protein izolasyonu için yıkanıp temizlendikten ve yüzey suları kurutulduktan sonra, analiz edilinceye kadar kilitli naylon poşetler içinde -86 °C'de korundu.

3.2.1. Genomik DNA (gDNA) izolasyonu

Bu çalışmada, 4 farklı lokaliteden toplanan örneklerden 20 mg tartıldı. İzolasyonda QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) kullanıldı ve izolasyon işlemi sırasında kitte verilen protokol takip edildi. Bu protokole göre gDNA ekstraksiyonu aşağıdaki şekilde yapıldı:

- 1) Bitki dokusu porselen havan içinde sıvı azotla toz haline getirildi. Toz hale gelen doku 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Örneğin erimesine izin verilmeksizin ikinci adıma geçildi.
- 2) Toz haline getirilmiş metaryalin üzerine 400 µl Tampon AP1 ve 4 µl RNaz A ekleyip kuvvetlice vortekslendi.
- 3) Daha sonra karışım 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında karışım 2 veya 3 kez kısa süreli vortekslendi.
- 4) 130 µl Tampon AP2 ekleyip buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
- 5) 14.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 6) Lizat spin kolona (mor filtreli tüp) aktarıldıktan sonra 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 7) Temizlenmiş lizata 1.5 katı kadar Tampon AP3/E eklendi ve pipetleme yapıldı.
- 8) Bir önceki adımda elde edilen karışımdan 650 µl mini spin kolona (beyaz filtreli tüp) aktarılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- 9) 8.basamak tekrarlandı.
- 10) Mini spin kolon (beyaz filtreli tüp) içindeki filtre 2 ml'lik temiz bir eppendorf tüpüne geçirildikten sonra üzerine 500 µl Tampon AW eklendi ve 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
- 11) 10.basamak tekrarlandı.

12) Mini spin kolona (beyaz filtrelili tüp) 100 µl Tampon AE eklenerek pipetleme yapıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 6000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edilerek kolondan DNA ayrılması sağlandı.

İzole edilen gDNA'lar, kullanılacağı zamana kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Agaroz jel elektroforezi

İzole edilen gDNA'ların gözlemlenmesi için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken; 0,5 gram agaroz tartıldı ve 50 ml 0,5 x TBE tamponu içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Karışım 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine 3 µl EtBr ilave edildi. Önceden tarakları yerleştirilen kasete jel döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar dikkatlice çıkarıldı. Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve üzeri kapanıncaya kadar 0,5 x TBE tamponu ile dolduruldu. 4 µl dH₂O, 1 µl örnek gDNA ve 1 µl yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyulara otomatik pipet yardımı ile yüklendi. İlk kuyucuğa büyüklüğü belli olan bir DNA standardı yüklendi. Örnekler 80 voltta yaklaşık 1 saat yürütüldü. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV jel görüntüleme cihazı (UVP-GelDoc-it, imaging system) yardımıyla gözlendi ve fotoğrafları çekildi.

3.2.3. İzole edilen gDNA'nın miktar ve saflık tayini

İzole edilen gDNA'ların UV spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm işlemi kuvars küvetlerle yapıldı. Spektrometrik sonuçlara göre çift zincirli DNA molekülünün miktar ve saflık tayini <http://www.pubquizhelp.com/other/dnacalculator.html> web adresindeki program ile hesaplanmıştır.

3.2.4. RAPD-PCR

Bu çalışmada Williams ve ark. tarafından geliştirilen RAPD-PCR yöntemi kullanıldı [64]. Bitkiden izole edilen saf gDNA kullanılarak yapılan RAPD-PCR koşulları toplam hacim 25 µl olacak şekilde Tablo 3.2'deki gibi düzenlendi:

Tablo 3.2: RAPD-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler

RAPD-PCR Bileşenleri	Miktar	Konsantrasyon
Distile su	15,25 µl	-
PCR Tamponu	5 µl	5X
MgCl ₂	1,5 µl	25 mM
dNTP	1 µl	2,5 mM (Herbiri)
Primer	1 µl	20 pmol/ µl
Taq Polimeraz	0,25	0,75 unit
gDNA	1 µl	50 ng
Toplam	25 µl	-

RAPD-PCR reaksiyon döngü koşulları Tablo 3.3'deki gibi düzenlendi.

Tablo 3.3: Optimize edilen RAPD-PCR döngüsü

PCR Aşaması	Sıcaklık	Süre	
Ön Denatürasyon	94°C	5 dakika	
Denatürasyon	94°C	1 dakika	} 40Döngü
Bağlanma	30°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	5 dakika	

RAPD-PCR koşullarının tekrarlanabilirliğini kontrol etmek amacıyla, örneklere ait amplifikasyonlar birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrar edildi. Uygulamada olası bir DNA kontaminasyonunu belirlemek amacıyla, her uygulama ile birlikte gDNA içermeyen negatif kontroller kullanıldı. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla, her gruba ait elektroforez işlemlerinde 1 kb büyüklüğünde DNA standardı kullanıldı.

3.2.5. RAPD-PCR sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesi

Jel fotoğraflarından yararlanılarak markır sonuç çizelgeleri oluşturuldu. Fotoğraflar üzerinde görüntülenen PCR ürünlerine ait bantların okunmasında sadece net görünen bantlar değerlendirmeye alındı. Jellerdeki monomorfik (tüm çeşitlerde bulunan bant) ve polimorfik (bazı çeşitlerde bulunup bazı çeşitlerde bulunmayan) bantlar tespit edildi. RAPD-PCR uygulaması sonucunda elde edilen tüm verilerin analizi POPGENE 32 programı kullanılarak değerlendirildi.

3.3. Toplam Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonu tamponu için 56 mM Na₂CO₃, 56 mM 2-merkaptoetanol, % 2 SDS, % 12 Sucrose, 2 mM EDTA 6 ml distile suda çözüldükten sonra son

hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında saklandı. Protein izolasyonu içinde şu adımlar izlendi:

- 0.8 gram bitki dokusu sıvı azot yardımıyla toz haline getirildi ve 500 µl toplam protein izolasyon tamponu eklenerek homojenize edildi.
- Homojenize edilen örnek 1.5 ml mikrofüj tüpüne aktarıldı.
- Örnekler 15 dakika 70°C'de bekletildikten sonra 14.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı 1.5 ml'lik steril bir mikrofüj tüpüne aktarıldı ve protein örnekleri SDS-PAGE tekniği yapılanaya kadar -20°C'de saklandı.

3.3.1. Bradford yöntemi ile protein miktar tayini

Yapraktan izole edilen toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Bradford (Boya-Bağlama ve ya Coomassie brillant blue) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde Coomassie brillant blue G-250 boyasının, farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde 595 nm'de mavi renk ortaya koyması esassından yararlanıldı. Standart protein stoğu hazırlandıktan sonra konsantrasyonları bilinen protein çözeltileri hazırlanması için spektrofotometre yardımıyla standart eğri oluşturuldu.

3.3.2. Standart eğrinin hazırlanması

Kör çözelti tek kullanımlık protein küvetinde, küvete 3 ml PBS konularak hazırlandı. Hazırlanan kör 595 nm'de spektrofotometrede okutuldu ve elde edilen absorbans değeri tüm örneklerin absorbans değerinden çıkarıldı.

Standart eğri grafiğinin çıkarılabilmesi ve kaydedilmesi için 8 adet tek kullanımlık protein küvetine tabloda verilen ölçülerde standart protein çözeltileri hazırlandı. Toplam 1 ml PBS içerisinde 2 mg BSA çözüldü ve final konsantrasyonu Tablo 3.4'deki gibi olacak şekilde BSA standart çözeltileri hazırlandı.

Tablo 3.4: BSA standart çözelti konsantrasyonları

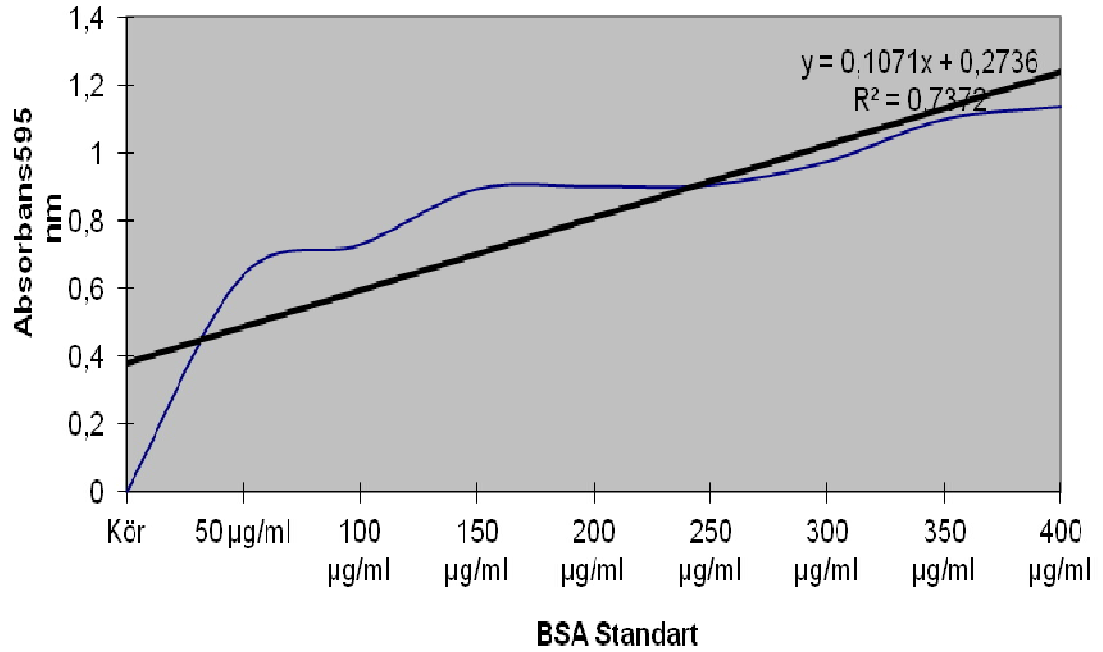
Küvet No	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA final konsantrasyonu (µg/ml)	50	100	150	200	250	300	350	400

Her küvete 3 ml Bradford çözeltisi ve 50 µl BSA örneği koyulduktan ve karıştırıldıktan sonra 5 dakika süreyle beklendi. Beş dakikanın sonunda birinci

küvetten başlanarak tüm küvetler köre karşı 595 nm'de okutuldu. Deney sonucunda tüm küvetlerdeki proteinin miktarlarının okuma değerleri (Absorbans değerleri) ve konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) değerleri Tablo 3.5'de ve standart eğri grafiği Şekil 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.5: Proteinlerin konsantrasyon ve absorbans değerleri

Standart Protein Konsantrasyonları	Kör	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	300 $\mu\text{g/ml}$	350 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$
Absorbans Değerleri	0,088	0,64	0,73	0,894	0,902	0,906	0,975	1,099	1,137



Şekil 3.1: BSA proteini kullanarak elde edilen standart eğri grafiği

3.3.3. Örneklerin toplam protein analizi

Analizler için yapraktan izole edilen protein örnekleri -20°C 'den çıkarıldıktan sonra buza alındı ve 4 farklı tek kullanımlık küvet *A.orientalis* bitkisinin farklı lokalitelerine göre etiketlendi. Etiketlenen her bir küvete 1:10 oranında sulandırılmış protein örneklerinden 10 μl alınarak, 3 ml Bradford Reagent eklendi. Hazırlanan örnekler 5 dakika bekletildikten sonra köre karşı 595 nm'de okutuldu. Deney sonunda elde

edilen absorbans değerleri standart eğriye bağlı olarak *A.orientalis* örneklerindeki toplam protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.3.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE analizi için iki farklı jel kullanıldı. Bunlar: ayırma ve yükleme jelleridir. Bu jellerin hazırlanışı şu şekilde yapıldı:

%15 Ayırma jeli 10 ml'lik için; 2,3 ml distile su, 5 ml Akrilamid/ Bis akrilamid (%30), 2,5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 Amonyum Persülfat (APS), 4 µl TEMED eklenerek hazırlandı.

% 5 Yükleme jeli 5 ml'lik için; 3.4 ml distile su, 830 µl Akrilamid/Bis akrilamid (%30), 630 µl 1 M Tris (pH 6.8), 50 µl %10 SDS, 50 µl %10 Amonyum Persülfat (APS), 5 µl TEMED eklenerek hazırlandı.

SDS-PAGE analizinde şu basamaklar takip edildi;

- Ayırma jeli hazırlandı ve kasete döküldü.
- Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için yaklaşık 0.3 ml su ile doyurulmuş n-butanol çözeltisi bir enjektör yardımıyla jel kasetinin iki kenarından döküldü.
- Polimerizasyon tamamlandıktan sonra üst düzeydeki butanol döküldü ve jel yüzeyi saf su ile birkaç kez yıkandı.
- Yükleme jeli hazırlandı ve kasete döküldükten sonra tarak yerleştirildi.
- Jelin donması için biraz beklendi. Donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı.

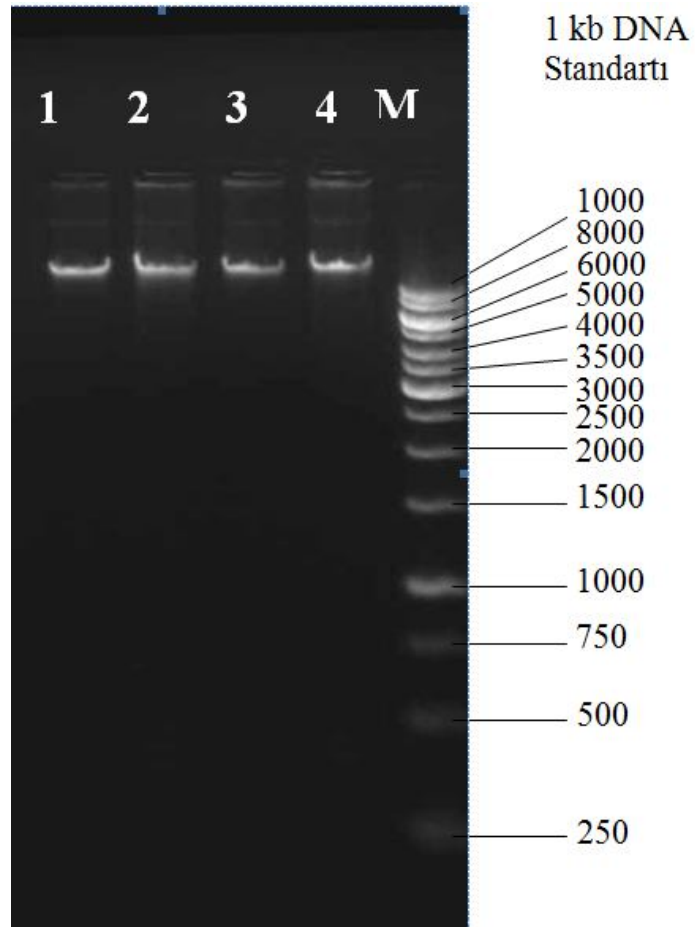
Analiz için yapraktan izole edilen protein örnekleri -20°C'den çıkarıldıktan sonra buza alınarak steril deiyonize su ile 1:10 oranında sulandırıldı. Spektrofotometrik sonuçlar kullanılarak sulandırılmış örneklerden her bir kuyucukta 10 µg protein olacak şekilde hesaplama yapıldı. Bu sonuçlara göre örnek alınarak, üzerlerine proteinin üç katı oranında örnek yükleme tamponu eklenerek ependorf içindeki son hacim steril distile su ile 30 µl'ye tamamlandı. Ependorflar içerdikleri proteine göre etiketlenerek, 100°C'de kaynatılmış su içinde beş dakika süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda protein örnekleri yükleme jelindeki kuyucuklara yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı kapatılarak sistem güç kaynağına bağlandı. Jelin yürümesi için güç kaynağı 90 V 120 dakika olarak ayarlandı. Yürüme işlemi sonlandırıldıktan sonra jel, cam plaklar arasından çıkartılarak kapaklı plastik bir kaba alındı ve boyama işlemine geçildi. Jelin üzerini tamamen kaplayacak şekilde boyama çözeltisi dökülerek jel, bu şekilde bir gece boyunca 20 devir/dakika

hızında çalkalanarak boyandı. Gece boyunca boyanan jeldeki boyama çözeltisi dökülerek jel 1 saat boyunca yıkama çözeltisinde çalkalandı. 1 saat sonra yıkama çözeltisi dökülerek tekrar yıkama çözeltisi ilave edildi ve jel 1 saat daha yıkandı. Bu işlem jelin zeminindeki boya tamamen çıkana kadar bu şekilde devam ettirildi. Yıkama işlemi sona erdikten sonra jel üzerindeki bantların moleküler ağırlıklarının hesaplanması için jelin X-ray fotoğrafı çekildi. Daha sonra bu jel %7 asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. gDNA Miktar ve Saflık Dereceleri

DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak izole edilen gDNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1: %1' lik agaroz jelde yürütülen gDNA'ların bant görüntüleri

M: 1 kb DNA Markır (Sigma), 1: Adnan Menderes populasyonu, 2: Ömerli populasyonu, 3: Paşa Alanı populasyonu, 4: Gaziosmanpaşa populasyonu

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda azami absorpsiyon özelliği göstermelerinden dolayı 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A260) oldukça saf elde edilen nükleik asitlerin miktar tayininde kullanılmıştır. A260'daki değerler DNA ve RNA'yı birbirinden ayırt etmeye yetmez. Ancak izolasyon

aşamasında RNaz uygulanarak toplam nükleik asitler içinde yer alan RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. A280 değeri ortamda bulunan protein moleküllerinin yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir. Saflaştırılmış DNA'da A260/A280 oranı ideal olarak 1.8-2.0 civarında olmalıdır. Bununla birlikte saflaştırılan DNA'nın A260/A280 oranı 1.2 seviyesine düşene kadar çeşitli uygulamalarda sorunsuzca kullanılabilir.

Çalışmada UV Visible spektrofotometre ile elde edilen A260, A280 ve A260/A280 ve DNA konsantrasyon değerleri Tablo 4.1'de verilmektedir. Buna göre, Gaziosmanpaşa popülasyonu 1.80'lik değerle en yüksek A260/A280 oranına sahip oldu. Örneklerden Paşa Alanı popülasyonu 1.53'lük değerle en düşük orana sahip oldu. Tüm örneklerin kullanıldığı PCR uygulamalarında DNA saflığı veya konsantrasyonu ile ilgili herhangi bir sorunla karşılaşılmadı.

Tablo 4.1: Farklı popülasyonların gDNA absorbans değerleri ve saflık dereceleri

No	Popülasyon Adı	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA/RNA toplam miktarı (µg)	DNA/RNA (µg/ µl)
1	Ömerli	0,021	0,013	1,6	5,88	0,029
2	Adnan Menderes	0,044	0,025	1,76	17,82	0,059
3	Paşa Alanı	0,023	0,015	1,53	4,91	0,032
4	Gaziosmanpaşa	0,018	0,010	1,8	2,60	0,026

4.2. PCR Koşulları ve Reaksiyonlar

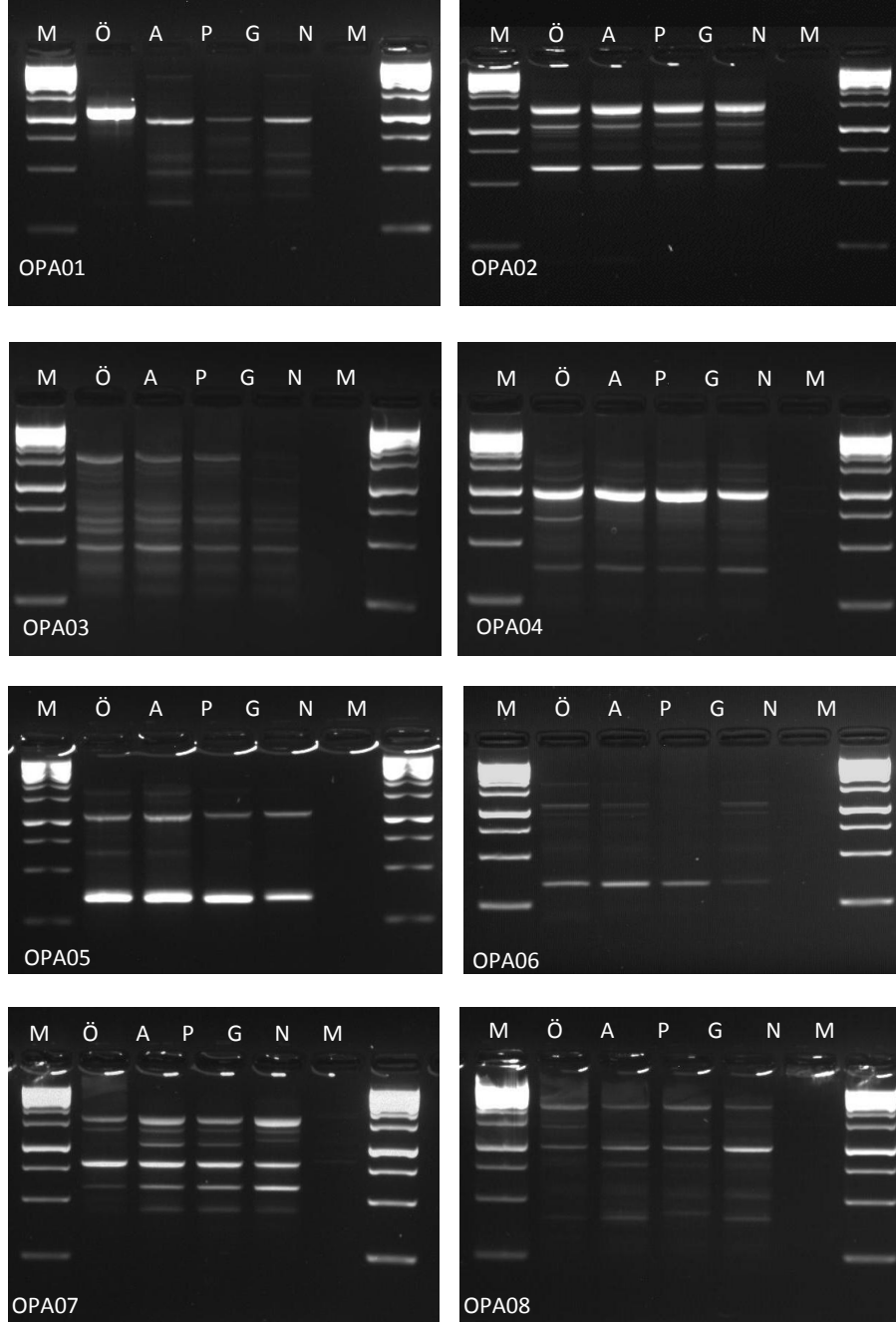
Uygulanan teknik Williams ve ark. tarafından geliştirilen PCR-RAPD koşullara göre değiştirilerek optimize edildi. Uygulamalarda her zaman aynı PCR cihazı kullanıldı. Sadece amplifikasyon sıcaklık ve süreleri kullanılan primerlerin T_m derecelerine bağlı olarak her PCR için ayrı ayrı optimize edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Çalışmada kullanılan OP serisi RAPD primerlerinin dizileri ve T_m değerleri

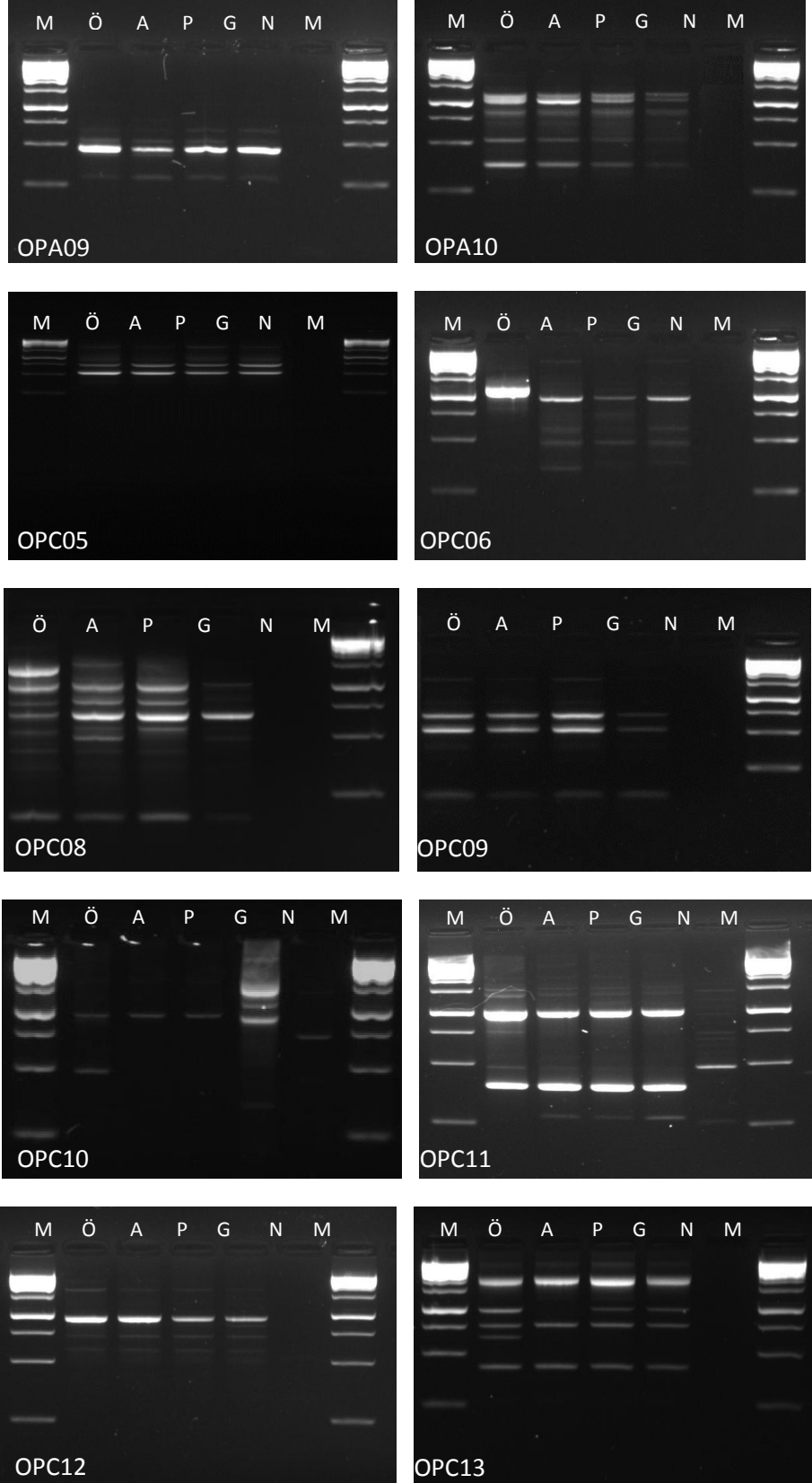
Primer Sayısı	Primer	Sekans 5'-- 3'	T _m (°C)	GC Oranı %
1	OPA 01	CAGGCCCTTC	34	70
2	OPA 02	TGCCGAGCTG	34	70
3	OPA 03	AGTCAGCCAC	32	60
4	OPA 04	AATCGGGCTG	32	60
5	OPA 05	AGGGGTCTTG	32	60
6	OPA 06	AGGGGTCTTG	32	60
7	OPA 07	GAAACGGGTG	32	60
8	OPA 08	GTGACGTAGG	32	60
9	OPA 09	GGGTAACGCC	34	70
10	OPA 10	GTGATCGCAG	32	60
11	OPC 05	GATGACCGCC	34	70
12	OPC 06	GAACGGACTC	32	60
13	OPC 08	TGGACCGGTG	34	70
14	OPC 09	CTCACCGTCC	34	70
15	OPC 10	TGTCTGGGTG	32	60
16	OPC 11	AAAGCTGCGG	32	60
17	OPC 12	TGTCATCCCC	32	60
18	OPC 13	AAGCCTCGTC	32	60
19	OPC 14	TGCGTGCTTG	32	60
20	OPC15	GACGGATCAG	32	60
21	OPC 16	CACACTCCAG	32	60
22	OPC 18	TGAGTGGGTG	32	60
23	OPC 19	GTTGCCAGCC	34	70
24	OPC 20	ACTTCGCCAC	32	60
25	OPN 01	CTCACGTTGG	32	60
26	OPN 02	ACCAGGGGCA	34	70
27	OPN 03	GGTACTCCCC	34	70
28	OPN 04	GACCGACCCA	34	70
29	OPN 05	ACTGAACGCC	32	60
30	OPAF 05	CCCGATCAGA	32	60
31	OPAF 06	CCGCAGTCTG	34	70
32	OPAF 10	GGTTGGAGAC	32	60
33	OPAF 11	ACTGGGCATC	32	60
34	OPAF 14	GGTGCGCACT	34	70
35	OPU 01	ACGGACGTCA	32	60
36	OPU 02	CTGAGGTCTC	32	60
37	OPU 03	CTATGCCGAC	32	60
38	OPU 05	TTGGCGGCCT	34	70
39	OPU 06	ACCTTTGCGG	32	60
40	OPU 07	CCTGCTCATC	32	60

4.3. RAPD Profilleri

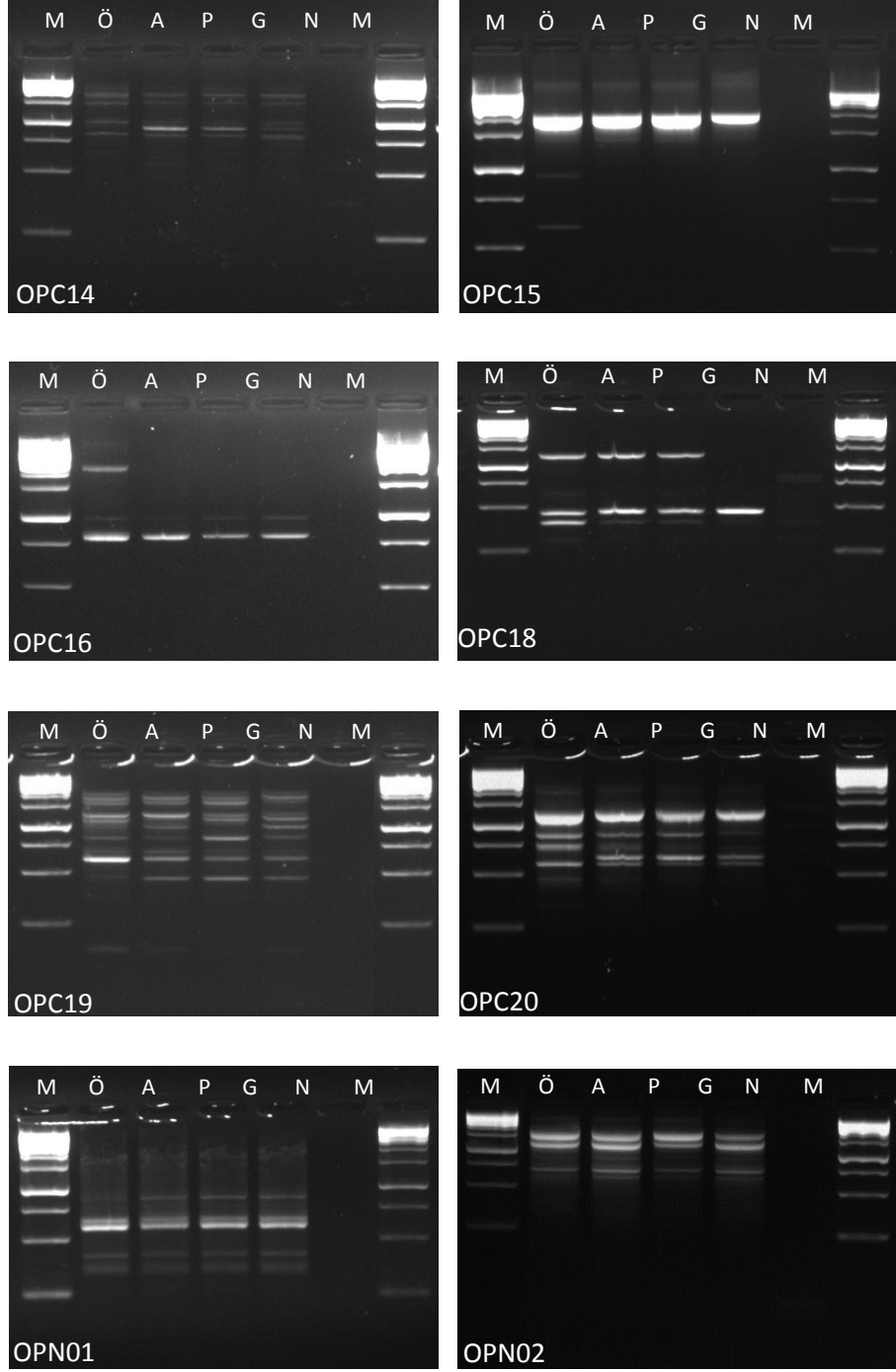
RAPD analizi için 40 adet 10 bazlık primer rastgele seçildi. Bu primerlerden elde edilen amplifikasyon ürünleri değerlendirmeye tabi tutuldu ve 40 tanesinin tekrarlanabilir ve güvenilir PCR ürünleri verdiği tespit edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünleri % 1,5 oranındaki agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UVP-GelDoc-it jel görüntüleme cihazında incelenerek fotoğrafları çekildi (Şekil 4.2).



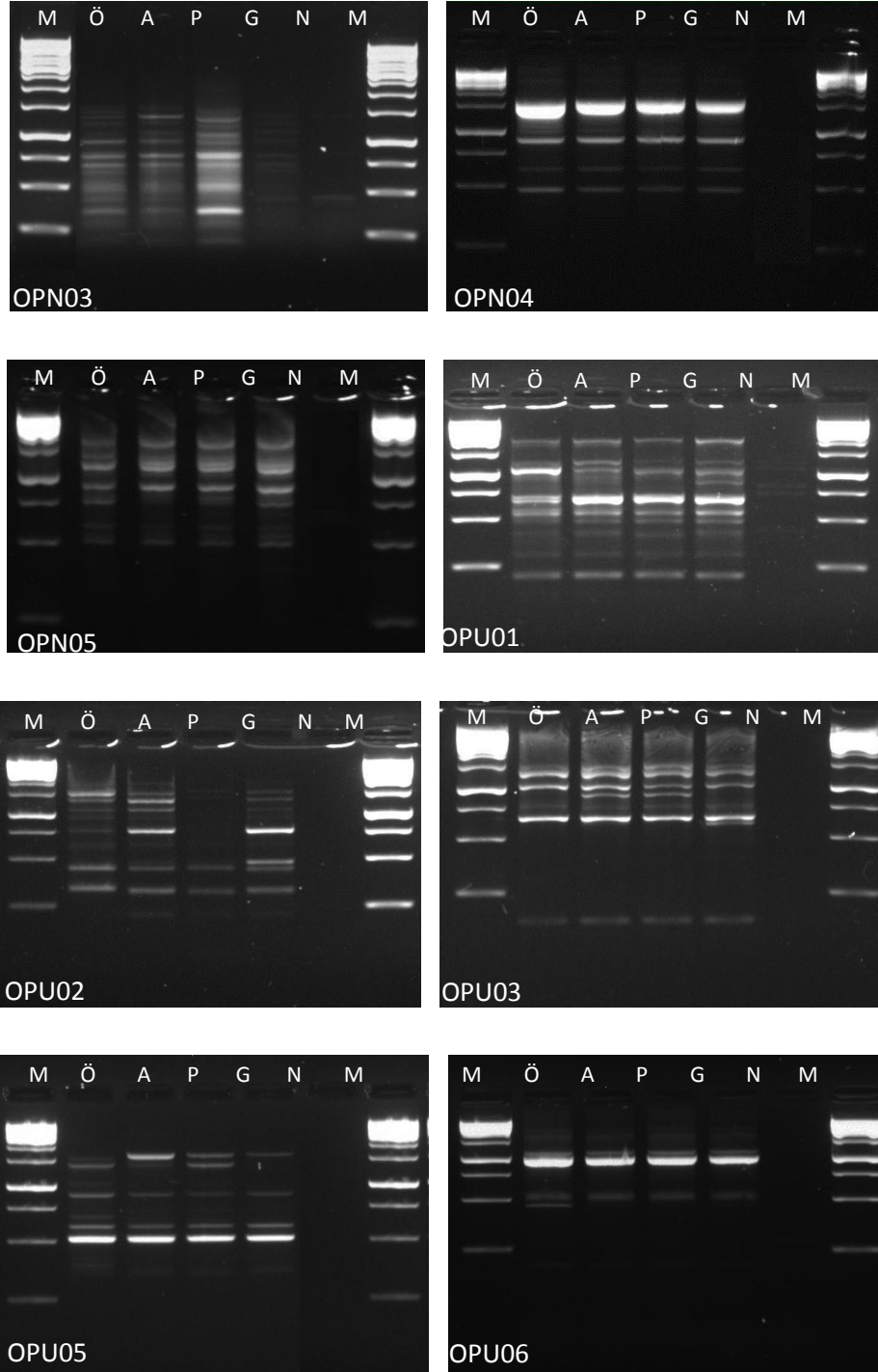
Şekil 4.2: OP primer serisi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



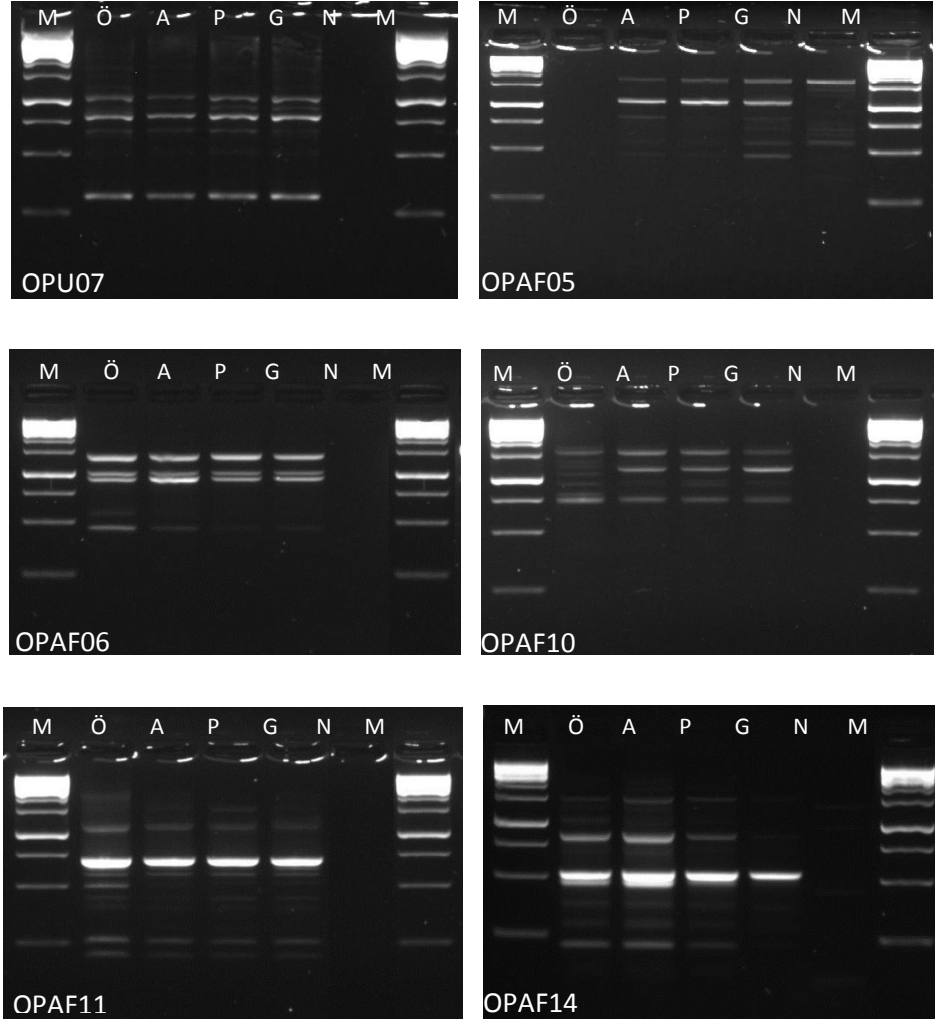
Şekil 4.2: (Devamı) OP primer serisi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.2: (Devamı) OP primer serisi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.2: (Devamı) OP primer serisi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.2: (Devamı) OP primer serisi kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

4.4. RAPD Verilerinin Analizi ve Değerlendirilmesi

RAPD-PCR sonuçlarının analizinde, sonuçların değerlendirilmesi çekilen fotoğraflar üzerinden yapıldı. Amplifikasyon sonucunda oluşan bantların okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirmeye alındı. Veriler toplanırken bantların varlığı (1), yokluğu ise (0) ile belirtildi. Veriler bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra POPGENE Version 3.2 programı kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Analiz için toplam 40 primerden 37 primer değerlendirildi ve 237 karakter elde edildi. Bunlardan 118 tanesinin yani % 49.79'unun polimorfik olduğu belirlendi.

A. orientalis'in dört farklı popülasyonuna 40 primer ile PCR-RAPD tekniği uygulandı. 3 defa tekrarlanan PCR-RAPD tekniği sonucunda 3 primerden (OPA01, OPA10,

OPC05) hiç polimorfik bant elde edilemedi. Diğer 37 primerden her biri en az 1 tane polimorfik bant vermiştir. Primerler arasında 11 bant sayısı ile OPU01 primeri en fazla bant sayısına sahip iken, 3 bant sayısı ile OPC16 primeri en az bant sayısına sahiptir. Birden fazla primerin polimorfik bant sayısı diğer primerlere göre daha fazladır. *A.orientalis*'in 4 farklı popülasyonu arasındaki polimorfizm oranının hesaplanmasında kullanılan 40 primer değerlendirmeler için yeterli veriler sağlamaktadır.

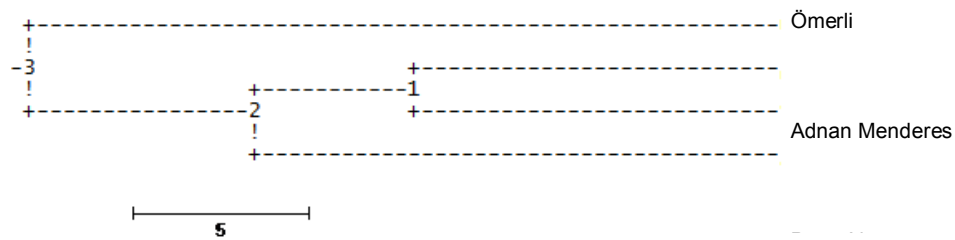
Analiz sonucunda Nei (1972)'ye göre hesaplanan popülasyonlar arasındaki benzerlik indeksi Tablo 4.3'de görülmektedir [73]. Bu tabloda diagonalin üst tarafı genetik benzerliği, alt tarafı ise genetik benzemezliği ifade etmektedir.

Tablo 4.3: *A.orientalis* popülasyonları arasındaki genetik benzerlik indeksi

Populasyon	Ömerli	Adnan Menderes	Paşa Alanı	Gaziosmanpaşa
Ömerli	****	0.6878	0.7300	0.6456
Adnan Menderes	0.3743	****	0.8312	0.7553
Paşa Alanı	0.3148	0.1849	****	0.7806
Gaziosmanpaşa	0.4376	0.2807	0.2477	****

RAPD analiz sonucunda hesaplanan popülasyonlar arasındaki genetik benzerlik indeksi elde edildi. Elde edilen değerlere göre, benzerlik indeksi en düşük Adnan Menderes ve Paşa Alanı popülasyonları arasındadır.

Nei (1972)'ye göre hesaplanan, *A.orientalis*'in yayılış gösterdiği dört farklı lokalitedeki popülasyonlar arasındaki genetik mesafe, Şekil 4.3'te UPGMA metoduna göre çizilen dendrogram şeklinde, Tablo 4.4'te ise tablo halinde verilmektedir.



Şekil 4.3: Popülasyonlar arasındaki genetik mesafeyi gösteren dendrogram

Tablo 4.4: *A.orientalis* bitkisinin populasyonlar arası genetik mesafe değerleri

1.Nokta	2.Nokta	Uzaklık
3	Ömerli	18.77835
3	2	5.56888
2	1	3.96665
1	Adnan Menderes	9.24282
1	Paşa Alanı	9.24282
2	Gaziosmanpaşa	13.20947

Nei (1972)'ye göre hesaplanan populasyonlar arasındaki genetik mesafeye dayalı olarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) metodu ile populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi gösteren bir dendrogram elde edilmiştir . Bu dendrogram incelendiğinde, başlıca 2 dala ayrıldığı görülmektedir. Ömerli populasyonu diğer 3 populasyondan ayrılarak tek başına bulunmaktadır. Diğer dallar ise iki gruba ayrılmıştır. Populasyonlar arasındaki genetik mesafenin en fazla olduğu populasyonlar Ömerli ile diğer 3 populasyon arasındaki mesafedir.

Shaw ve ark. (2009)'nın *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) bitkisinin farklı populasyonları arasındaki genetik benzerlik çalışması RAPD ve ISSR yöntemleriyle çalışılmıştır. RAPD yönteminde primerler (OPA03, OPC11, OPC12, OPC13, OPAF05, OPAF06, OPAF10, OPAF11, OPAF14) kullanılmıştır. OPC11 primeri hiç polimorfik bant vermemişken, OPAF05 primeri 7 polimorfik bant sayısı vermiştir.

Mahesh ve ark. (2008) *Rauvolfia tetraphylla* (Apocynaceae) bitkisini RAPD markırları kullanarak moleküler analizi yapılmıştır. RAPD yönteminde OPA02, OPA06 ve OPA08 primerleri kullanılmış ve OPA08 primeri 7 polimorfik bant sayısı vermiştir.

Ransom ve ark. (1998) *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae) bitkisinin populasyonları içinde ve arasındaki çeşitliği RAPD kullanılarak araştırılmıştır. OPA serisinden 5 primer kullanılmıştır. Bu primerlerden OPA01 ve OPA10 primeri polimorfik bant vermemiştir. OPA09 primerinin polimorfik olarak 2 bant vermiştir.

Poerba ve ark. (2009) *Dyera costulata* (Apocynaceae) RAPD yöntemiyle DNA analizi yapılmıştır. 71 tane RAPD yönteminde primer kullanılmıştır. OPC06 primeri 17 tane polimorfik bant sayısı vermiştir.

4.5. Toplam Protein Miktarları

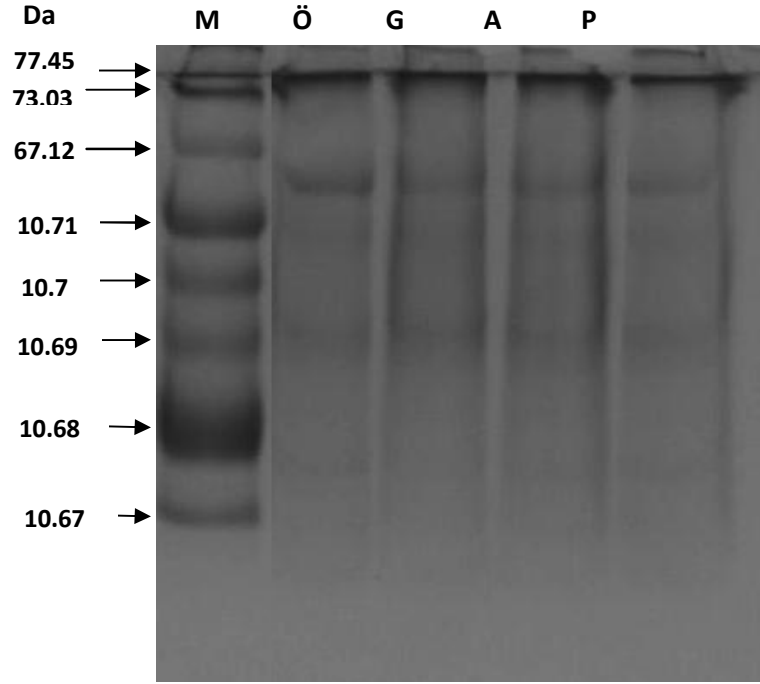
SDS-PAGE analizi için izole edilen protein örneklerinin miktar tayini için Bradford yöntemi kullanıldı. Bradford yöntemiyle hazırlanan 1:10 oranında sulandırılan protein örnekleri spektrofotometrede 595 nm'de absorbanları ölçüldü. Ölçüm sonunda elde edilen absorban değerleri ve hazırlanan standart protein grafiği yardımı ile protein miktarları hesaplandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.5: *A. orientalis*'in farklı populasyonlarında ki yapraklardan izole edilmiş protein miktarları

Populasyon	Absorbans Değeri (OD)	Protein Miktarı (µg/ml)
Ömerli	0,816	5,06
Adnan Menderes	0,813	5,03
Paşa Alanı	0,771	4,64
Gaziosmanpaşa	0,772	4,65

4.6. SDS-PAGE Verilerinin Analizi ve Değerlendirilmesi

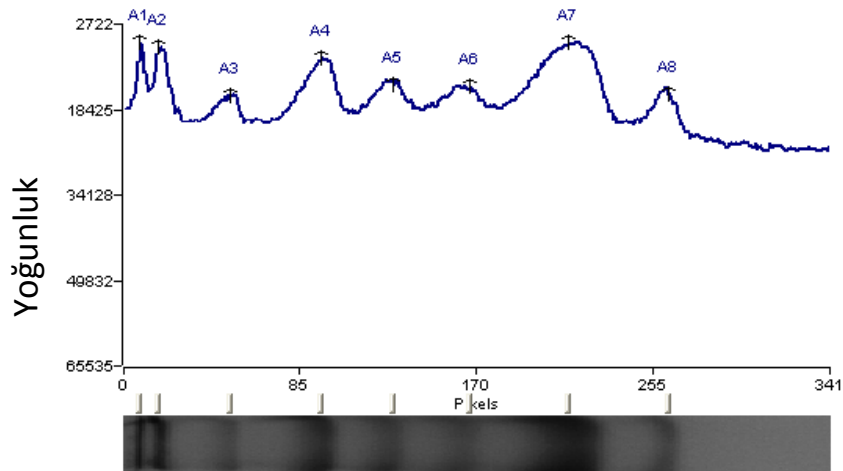
SDS-PAGE analizinden sonra elde edilen jeller UVP-GelDoc-it jel görüntüleme cihazı yardımıyla jellerin fotoğrafları çekildi (Şekil 4.4). Elde edilen protein bant profilleri Vision WorksLS Version 6.8 programı aracılığı ile analiz edildi. Analiz sonucunda elde edilen bant yüzdesi, bant ağırlığı (ng) ve moleküler ağırlıkları (kDa) markır ve populasyonlara göre tablolarda verilmektedir.



Şekil 4.4: SDS-PAGE sonrası oluşan toplam proteinlere ait bant profilleri

M: Markır, Ö: Ömerli popülasyonu, G: Gaziosmanpaşa popülasyonu, A: Adnan Menderes Popülasyonu, P: Paşa Alanı Popülasyonu

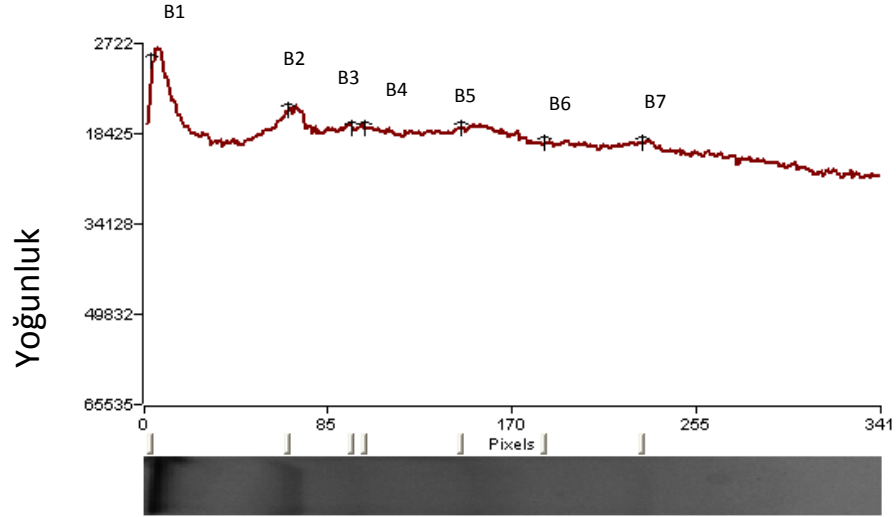
A.orientalis'in farklı popülasyonlarından izole edilen toplam proteinlerin yoğunlukları da ölçüldü. Toplam proteinin yoğunluk grafikleri sırasıyla verilmektedir.



Şekil 4.5: Markır proteinin profil yoğunluk grafiği

Tablo 4.6: SDS-PAGE yöntemi sonrası markırdan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

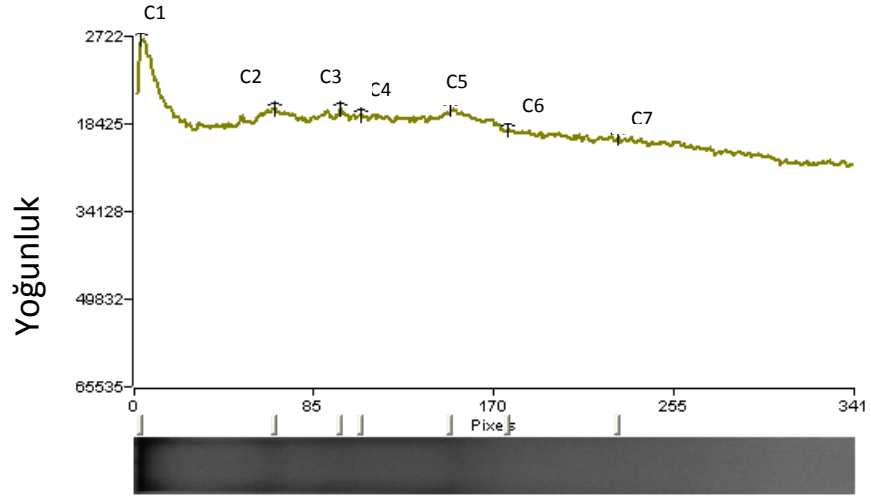
Populasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi %	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
Markır	A1	4,91	4,91	77,45
	A2	10,19	10,19	73,03
	A3	9,76	9,76	67,12
	A4	20,17	20,17	10,71
	A5	14,44	14,44	10,70
	A6	15,78	15,78	10,69
	A7	21,97	21,97	10,68
	A8	2,76	2,76	10,67



Şekil 4.6: Ömerli populasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği

Tablo 4.7: SDS-PAGE yöntemi sonrası Ömerli populasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

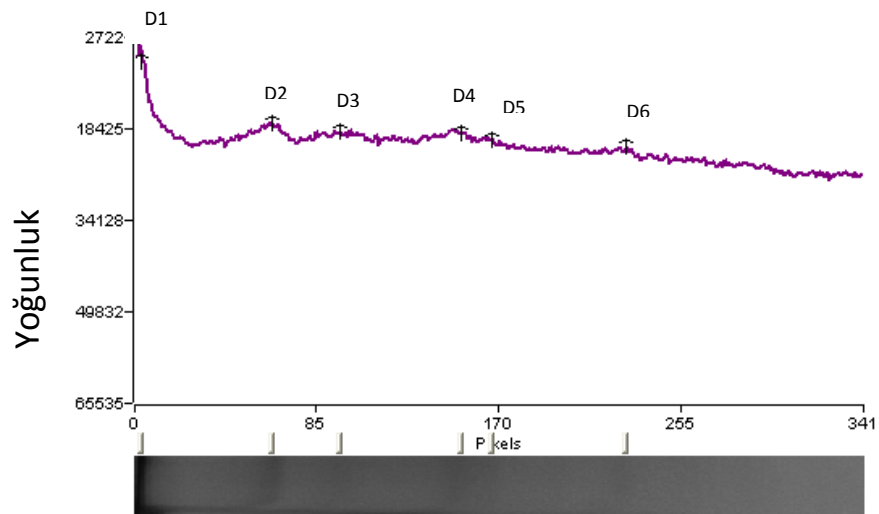
Populasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi %	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
Ömerli	B1	22,99	22,99	78,38
	B2	18,72	18,72	26,66
	B3	10,39	10,39	16,54
	B4	5,46	5,46	15,40
	B5	26,44	26,44	11,46
	B6	12,90	12,90	10,71
	B7	3,10	3,10	10,69



Şekil 4.7: Gaziosmanpaşa popülasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği

Tablo 4.8: SDS-PAGE yöntemi sonrası Gaziosmanpaşa popülasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

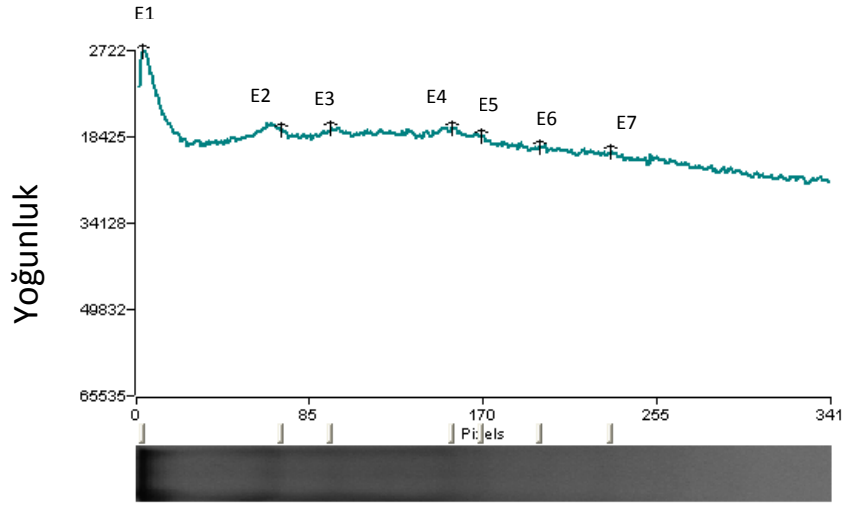
Popülasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi %	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
Gaziosmanpaşa	C1	15,71	15,71	75,67
	C2	15,28	15,28	22,69
	C3	12,98	12,98	16,80
	C4	15,01	15,01	15,52
	C5	15,20	15,20	11,86
	C6	14,16	14,16	11,45
	C7	11,66	11,66	10,71



Şekil 4.8: Adnan Menderes popülasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği

Tablo 4.9: SDS-PAGE yöntemi sonrası Adnan Menderes popülasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Populasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi %	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
Adnan Menderes	D1	18,71	18,71	69,71
	D2	15,36	15,36	23,11
	D3	17,56	17,56	20,90
	D4	17,54	17,54	18,70
	D5	14,55	14,55	18,29
	D6	16,28	16,28	16,58

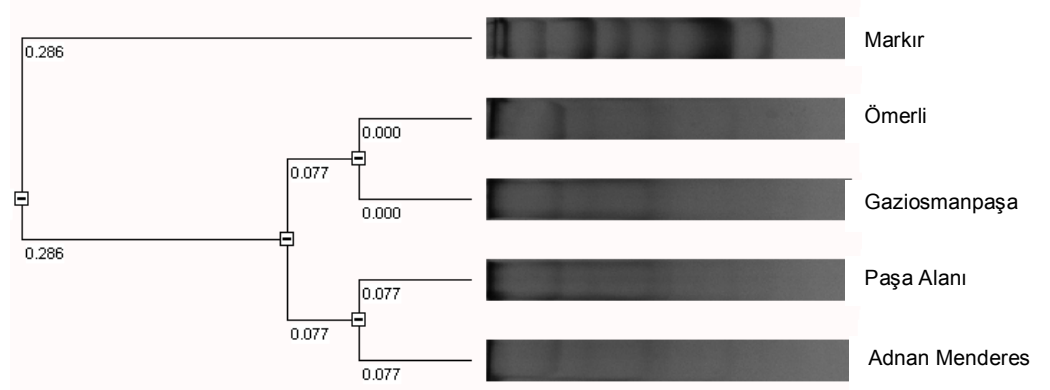


Şekil 4.9: Paşa Alanı popülasyonuna ait toplam protein profili yoğunluk grafiği

Tablo 4.10: SDS-PAGE yöntemi sonrası Paşa Alanı popülasyonundan elde edilen proteinlerin bant yüzdesi, bant ağırlığı ve moleküler ağırlıkları

Populasyon	Bant Numarası	Bant Yüzdesi %	Bant Ağırlığı (ng)	Moleküler Ağırlık (kDa)
Paşa Alanı	E1	18,20	18,20	69,71
	E2	12,82	12,82	22,31
	E3	14,83	14,83	19,85
	E4	14,81	14,81	17,05
	E5	12,27	12,27	16,46
	E6	13,69	13,69	15,30
	E7	13,38	13,38	14,00

SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen protein bant profillerinden oluşan dendrogram ve populasyonlar arası uzaklık değerleri Şekil 4.5 üzerinde gösterildi.



Şekil 4.10: SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen protein bant profilinden oluşan dendrogram

A.orientalis'in yaprakları kullanılarak izole edilen toplam protein miktarları populasyonlar arasında farklılık göstermektedir. İzole edilen toplam proteinin moleküler ağırlığı en fazla 78.38 kDa ile Ömerli populasyonuna aittir. En düşük moleküler ağırlığa sahip olan bant profili yine Ömerli populasyonuna aittir. Ömerli, Paşa Alanı ve Gaziosmanpaşa populasyonları 7 tane protein bandı verirken, Adnan Menderes populasyonu 6 tane protein bandı vermiştir. Elde edilen bant yüzdesi en fazla olan yine Ömerli populasyonudur.

SDS-PAGE tekniği ile elde edilen toplam protein profilleri ile dendrogram ve populasyonlar arası uzaklık bulunmuştur. Oluşturulan protein dendrogramına göre populasyonlar iki dala ayrılmaktadır. Ömerli populasyonu Gaziosmanpaşa populasyonuna yakın iken, Adnan Menderes populasyonu da Paşa Alanı populasyonu ile yakın görülmektedir (Şekil 4.5).

Populasyonlar arasındaki protein yoğunlukları da hesaplanmıştır. Populasyonlar arasında önemli derecede yoğunluk farkı olmadığı grafiklerden de anlaşılmaktadır.

Genel olarak, coğrafik açıdan sınırlı türler yaygın olarak dağılmış türlerden daha düşük seviyede genetik varyasyon gösterir [74]. Türkiye'de yetişen endemik bir tür olan *Centaurea wiedemanniana*'da RAPD markırları ile yapılan bir çalışmada populasyonlar arasında yüksek derecede genetik farklılaşma tespit edilmiştir [75].

Ge ve ark. (1999) *Oryza rufipogon* örnekleri üzerinde tekrarlanabilir sonuç veren 20 adet RAPD primeri ile toplam 95 bant elde etmiş ve bunların 78 tanesinin (%82.1) polimorfik olduğunu bulmuşlardır [76]. Aromatik çeltikler üzerinde yapılan bir çalışmada ise 58 primer ile 465 bant elde edilmiş bunların 314 tanesinin (%67.5) polimorfik olduğu bulunmuştur [77]. Raghunathachari ve ark. (2000), 18 adet Hint çeltik çeşidinde 10 RAPD primeri kullanarak 144 bant elde etmişler ve bunların %95'inin polimorfik olduğunu bulmuşlardır [78]. Bu çalışmada 40 primerden toplam 237 bant elde edilmiştir. Bu bantların % 49.79'u polimorfik özellik göstermiştir.

Genetik uzaklık çalışmalarında buğday bitkisinin çeşitleri araştırılmıştır. Fahima (1999), yabani buğday populasyonları arasındaki genetik uzaklığın 0.017-0.164 arasında değiştiğini [79], Freitas (2000), Brezilya'da ekmeçlik buğday çeşitleri arasındaki genetik benzerliğin 0.27 olduğunu [80], Szucs vd (2000), yazlık buğday çeşitleri arasındaki genetik benzerliğin 0.03-0.18 arasında olduğunu [81], Amiour (2002), tritikale hatları arasındaki genetik uzaklığın 0.50-1.00 arasında değiştiğini [82], Sun vd (2003), yazlık buğday çeşitlerinde RAPD verilerine göre hesaplanan genetik benzerliğin 0.64-0.98 arasında değiştiğini [83], Tams vd (2004), Avrupa tritikale genotipleri arasındaki genetik uzaklığın ortalama olarak 0.33 olduğunu bildirmektedir [84]. Bu çalışmada *A.orientalis*'in farklı populasyonları arasındaki genetik benzerlik 0.24-0.83 arasında değiştiği RAPD analizi sonucunda elde edilmiştir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyolojik koruma çalışmalarında yapılması gereken ilk şey, genetik çeşitliliğin belirlenmesidir. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde genetik (moleküler) markırlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bir popülasyonda polimorfik olan özellik ya da karakterler generik markırlar olarak bilinmektedir. Populasyonlar arasındaki genetik varyasyonların belirlenmesinde kullanılan dört tip markır sistemi vardır. Bunlar; morfolojik markırlar, sitogenetik markırlar, protein markırları ve DNA'ya dayalı markırlardır.

Proteinlerin yük ve büyüklüklerindeki farklılıklar, yani protein varyasyonları genetik markır olarak kullanılmaktadır. Bu varyasyonlar jel elektroforezi ile yapılmaktadır. Protein varyasyonlarının çoğu, proteini kodlayan yapısal gendeki ya da regülatör dizideki allellik dizi varyasyonudur. Bazı protein varyasyonları ise, translasyon sonrası modifikasyonlar sonucunda ortaya çıkar ve genetik markır olarak kullanımları kullanışlı değildir. Protein markırları, DNA markırları keşfedilmeden önce birçok bitki türünde kullanılmıştır. Halen, DNA markırları ile birlikte karşılaştırmalı analizlerde kullanılmaktadır.

DNA markırı, bir tür içinde dizi polimorfizmi gösteren küçük bir DNA bölgesidir. Bir DNA segmentinin yaklaşık her 100 baz çiftinde bulunan nükleotid dizisi, bireyler arasında değişiklik gösterir. Buna DNA polimorfizmi denilmektedir. DNA'ya dayalı markırlar, DNA seviyesinde bireylerin karşılaştırılmasını mümkün kılmaktadır. Fenotipe dayalı yöntemlerin karmaşıklığı ve zorluğu, DNA'ya dayalı yöntemlerle genotipin direkt olarak belirlenmesi yoluyla aşılabilmektedir. DNA'nın küçük bir bölgesindeki varyasyonu belirlemek için hibridizasyona dayalı ya da PCR temelli bazı yöntemler kullanılır.

RAPD yönteminin, dominant belirteçler ortaya çıkarmakla birlikte diğer bazı yöntemlere göre kısmen daha ucuz olması, çabuk sonuç vermesi ve radyoaktif madde kullanılmaması gibi olumlu yönlerinin bulunduğu bir kez daha gözlenmiştir. Şüphelenilen durumun aksine sonuçların tekrar edilebilirliği değişik zamanlarda yapılan PCR testlerinde ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, *A.orientalis*'in Balıkesir ilinde farklı populasyonlarının ve İstanbul, Ömerli populasyonunun genetik yapısı araştırılmış ve *in situ* koruma yapılması gereken öncelikli lokalitenin Ömerli olduğu kararına varılmıştır. Bilindiği gibi, genetik çeşitliliği en fazla olan populasyonların korunma önceliği bulunmaktadır. Çünkü bu tip populasyonlar o türe ait tüm varyasyonları bünyelerinde barındırmaktadırlar. Genetik çeşitliliği az olan bir populasyon kaybolursa bile, genetik çeşitliliğin fazla olduğu populasyon o türün devamlılığına ve evrimsel sürecini devam ettirmesine en büyük desteği sağlayacaktır. Farklı populasyonlardan elde edilen toplam proteinlerinin SDS-PAGE analizleri populasyonlar arasında benzer bant görünümü ortaya koymuştur. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, SDS-PAGE analizi yerine daha hassas ayırım sağlayabilecek Gradient SDS-PAGE, IEF ve 2D analizlerinin tercih edilmesi ile çeşitler arasındaki farklılığın daha belirgin bir şekilde ortaya konulabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen bulgular sonucunda Ömerli populasyonunun diğer populasyonlara göre daha yüksek polimorfizm oranı gösterdiği dikkati çekmektedir. Bu nedenle *A.orientalis*'in öncelikle bu populasyonunun korunması yerinde olacaktır. Gaziosmanpaşa ve diğer populasyonlar için planlanacak olan *ex situ* veya *in situ* koruma programlarında mümkün olduğunca tüm populasyonların dikkate alınması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Özhatay, N., Byfield, A., Atay, S., "Türkiye'nin Önemli Bitki Alanları", **DHKD yayını**, Mas Matbaacılık A.Ş., İstanbul, (2003).
- [2] Işık, K., "Biyolojik Çeşitlilik", **Anadolu Üniv. Açık Öğr. Fak. Yayını Çevre ve İnsan**, 1-2, 13-39, (1998).
- [3] Ekim ve ark, *Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats*, <http://conventions.coe.int/Treaty/FR/Treaties/Html/104-1.htm>, (**Ziyaret tarihi : 15 Ocak 2010**).
- [4] Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA "Flora Europaea" **Cambridge Univ. Press.**, 3,378, (1968).
- [5] Davis PH, "Flora of Turkey and East Aegean Islands", **Univ. Press of Edinburg**, 6,161, (1978).
- [6] Dabiné Lengyel, E., Turiak, Gy., Nyaradiné-Szabady, J., Zambo, I., Tétényi, P., Hermeicz, I., "Determination of Secologanin Content from Shoots of *Rhazya orientalis* (Dcne) A. DC. Using the Hplc Method", **Herba Hungarica, Tom. 25, 2**, 141-150, (1986).
- [7] Rahman, A. U., Qureshi, M. M., Zaman, K., Malik, S., Ali, S. S., "The Alkaloids of *Rhazya stricta* and *R. orientalis*- A Review", **Fitoterapia**, 60, 4, 291-322, (1989).
- [8] Akın, S., Özen, F., Akın, M., Yıldırım, O., "*Rhazya orientalis* (Dcne) Bitkisinden Kardiyoaktif Glikosidlerin, Glikoalkoloidlerin ve Yeni Glikosidlerin İzole Edilmesi ve Yapılarının Aydınlatılması", **TÜBİTAK TBAG-1516 (196T038) Nolu Proje**, (2001).
- [9] Itoh, A., Kumashiro, T., Tanahashi, T., Nagakura, N. and Nishi, T., "Flavonoid Glycosides from *Rhazya orientalis*", **J. Nat. Prod.**, 65, 3, 352 -357, (2002).
- [10] Akyalçın, H., Özen, F, Dülger, B., "Anatomy, Morphology, Palynology and Antimicrobial Activity of *Amsonia orientalis* Decn (Apocynaceae) Growing in Turkey", **International Journal of Botany**, 2, 1, 93-99, (2006).
- [11] Cathey, H. M., Brickell, C., "A to Z Encyclopedia of Garden Plants (revised edition)", **Dorling Kindersly Limited**, London, (2004).
- [12] Özen, F., "*Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae)", **The Karaca Arboretum Magazine**, 6, 4, 169-172, (2002).
- [13] Özen, F., "Türkiye'de Tükenme Tehlikesinde Olan Bir Türün Otekojisi: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)", **Balıkesir Üniversitesi Fen Bil. Enst. Dergisi**, 8, 1, 4-9, (2006).
- [14] Öz. G., Yüzbaşıoğlu E., Erol O. and Üzen E., "*In vitro* propagation of *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae)", **African Journal of Biotechnology**, 7, 20, 3638-3641, (2008).
- [15] Acemi A., "Farklı Konsantrasyonlardaki Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae)'in Doku Kültürü İle Çoğaltılmasına Olan

Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Kocaeli**, 2011.

[16] Ramanatha Rao, V., Hodgkin, T., “Genetic Diversity and Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources”, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 68, 1–19, (2002).

[17] Andayani, N., Morales, J.C., Forstner, M.R.J., Supriatna, J., Melnick, D.J., “Genetic Variability in mtDNA of The Silvery Gibbon: Implications for The Conservation of A Critically Endangered Species”, **Conservation Biology**, 15, 3, 1545-1548, (2001).

[18] Darke, R., “*Amsonia* in cultivation”, **The Plantsman**, New Series, 4:2, (2005)

[19] Rahman, A. U., Zaman, K., “Studies on the Alkaloids of *Rhazya stricta*”, **Phytochemistry**, 27, 6, 1926-1928, (1988).

[20] Sauerwein, M., Ishimaru, K., Shimomura, K., “Indole Alkaloids of *Amsonia elliptica*”, **Phytochemistry**, 30, 4, 1153-1155, (1991).

[21] Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., “Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı”, Türkiye **Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayını**, Barışcan Ofset, Ankara, (2000).

[22] Molnar, G., Tetenyi, P., Dobos, E., Bernath J., “Submersed Propagation of *Amsonia tabernaemontana* In The Presence of Growth Regulator”, **Process for the sterile micropropagation of plant material**, Budapest, Hungary, 3,4, (1986).

[23] Wahyuono, S., Hoffmann, J. J., Jolad, S. D., Dentali, S. J.,” Triterpenoids of *Amsonia grandiflora*”, **Phytochemistry**, 26,4, 1213-1213 (1987).

[24] Engelmann, F., “Conservation In Vitro of Forest Tree Genetic Resources”, Lecture Given During the Training Course in Management of Forest Genetic Resources and Agroforestry Areas, **Biotrop** - Bogor – Indonesia, 16, (1989).

[25] Sauerwein, M., Ishimaru K. and Shimomura, K., “Indole Alkaloids In Hairy Roots of *Amsonia elliptica*”, **Phytochemistry**, 30, 4, 1153-1155, (1991).

[26] Uomori, A., Nakagawa, Y., Yoshimatsu, S., Seo, S., Sankawa U. and Takeda, K., “Biosynthesis of Campesterol and Dihydrobrassicasterol In Cultured Cells of *Amsonia elliptica*”, **Phytochemistry**, 31, 5, 1569-1572, (1992).

[27] Weber, H.C., Klahr, A., and Marron-Heimbuch, M., “Anatomical Structures of The VA Mycorrhiza in The Apocynaceae (Gentianales)”, **Bot. Acta**, 108, 525–534, (1995).

[28] Al-Rajhi, D., Al-Hazmi, A. S., Hussein, H., Ibrahim, A.A., Al-Yahya, F., Mostafa, S., “Nematicidal Properties of *Rhazya stricta* and *Juniperus polycarpos* on *Meloidogyne javanica* Growing in Saudi Arabia”, **Alex. Sci. Exch.**, 18, 2, 135-142, (1997).

- [29] Assaeed, A. M., Al-Doss, A. A., "Allelopathic Effects of *Rhazya stricta* On Seed Germination of Some Range Plant Species", ***Annals of Agricultural Sciences, Ain Shams Univ. Cairo***, 42, 159–167, (1997).
- [30] Scocco, C., Corvi Mora, P. and Corti, C., "Introduction of *Amsonia tabernaemontana* Walt. in Hilly Area: Germination Test and First Searches About The Results in Rutin", ***Acta Hort. (ISHS)***, 457,357-362, (1998).
- [31] Assaeed, A.M. & Al-Doss, A.A., "Seedling Competition of *Lasiurus scindicus* and *Rhazya stricta* In Response To Water Stres", ***Journal of Arid Environments***, 49, 315-320, (2001).
- [32] Kamel, A., Al-Mutlaq, K., "Selective Herbicidal Activity Of An İndole Alkaloid İsolated From *Rhazya stricta* Decne. Growing in Saudi Arabia", ***14th Australian Weeds Conference Proceedings: weed management - balancing people, planet, profit Edited by B.M. Sindel and S.B. Johnson***, published by Weed Society of NSW Inc., soft cover, 718, (2004).
- [33] Stano, J., Neubert, K., Micieta, K. and Blanarikova, V., "Demonstration of Aminopeptidase Activities Secreted by *Amsonia tabernaemontana* Walt. Cells.", ***Eng. Life Sci.***, 5, 4, 375-377, (2005).
- [34] Stano, J., Micieta, K., Matejka, P., Korenova, M., Blanarikova, V., Fulmekova, M., "Identification and determination of extracellular sucrose in cell suspension of *Amsonia tabernaemontana* Walt.", ***Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae***, 54, 178-183, (2007).
- [35] Mayer, J, Vogt. H,& M. Sieger (Hrsg.) "Biodiversitätsforschung als Zukunftsdisziplin". ***Berichte des Institutes für Didaktik der Biologie***, IDB 5.Universitat Münster, (1996).
- [36] "*Biyolojik Çesitlilik ve Çevre Koruma Rehberi*", ***T.T.K.D.*** (Türkiye Tabiatını Koruma Derneği), Ankara, (2001).
- [37] "*Biyoteknoloji*" www.ortohum.gov.tr/Tekbul/biotek.doc, **(Ziyaret tarihi: 3 Nisan 2010)**.
- [38] Bundesministerium Für umwelt, Natur und Reaktorsicherheit *Umweltpolitik Agenda 21, Konferenz der Vereinigten Nationen für Umwelt und Entwicklung in Juni 1992 in Rio de Janeiro – Dokumente – Bonn*, (1997).
- [39] Frankel, O. H. and Bennet, E. "Genetic Resources in Plants", ***Their Exploitation and Conservation***. IBP Handbook No: 11. Oxford University Press. (1970).
- [40] Frankel, O. H. and Hawkes, J. G., "Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow", ***International Biological Programme 2. Cambridge University Press***, (1975).
- [41] Özgen, M., Adak, M.S., Karagöz, A., Ulukan, H., "Bitki Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımı", ***Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi Kitapçığı***, Ankara, 28, 2, 309-344, (1995).

- [42] Güler, M., Yıldız, M., “Kuraklık ve Çölleşme İlişkileri”, Konya Ticaret Odası, <http://www.kto.org.tr/tr/dergi/dergiyazioku.asp?yno=2065&ano=106>, (**Ziyaret tarihi: 12 Kasım 2010**).
- [43] Soller, M. and Beckmann, J. S., “Genetic Polimorphism İn Varietal Identification And Genetic Improvement”, **Theor. Appl. Genet.**, 67,25-33, (1983).
- [44] Tanksley, S. D., “Molecular markers in plant breeding”, **Plant Mol. Biol. Rep.**, 1,1, 3-8, (1983).
- [45] Avise, J. C., “Molecular Markers, Natural History And Evolution”, **Chapman & Hall. International Thomson Publishing**, New York, 3-359, (1994).
- [46] Bretting, P. K. and Widrechner, M. P., “Genetic Markers And Horticultural Germplasm Management”, **Hort. Sci.**, 30, 7, 1349-1356, (1995).
- [47] Şençiçek, A.G.E., “RARD Markerlerini Kullanarak Türk susam (Sesamum indicum L.) Populasyonlarında Genetic Uzaklıkların Analizi”, Doktora Tezi, **Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Antalya, 102, (2000).
- [48] Jain, S., Srivastava, J.P. and Guotam, P.L., “Evaluation Of Genetic Resources Of Durum Wheat For Salt Stress Tolerance”, **In:Proceeding 6th International Wheat Genetics Symposium**, Kyoto, Japan, 137-141, (1983).
- [49] Koornneef, M., in O'Brien, S. J. “Genetic Maps, Cold Spring Harbor Laboratory Press”, **Cold Spring Harbor**, New York, 694-697, (1990).
- [50] Zuckerkandl, E. And Pauling, L., “Molecules As Documents Of Evolutionary History”, **J Theor Biol** 8, 357-366, (1965).
- [51] Acar İ., “*Vicia sativa*, L.nin İki Çeşidi (Karaelçi ve Sarıelçi Fiğleri)’nin Tohumları Arasındaki İzoenzim ve Çözünür Proteinlerin Elektroforetik İncelenmesi”, Yüksek lisans tezi, **Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı**, Ankara, (2005).
- [52] Sammour, R.H., “Proteins Of Linseed (*Linum usitatissimum* L.), Extraction and Characterization By Electrophoresis”, **Bot Bull Acad Sin**, 40, 121-126, (1999).
- [53] Peirce L.C. ve Brewbaker, J.L., “Application Of Isozyme Analysis İn Horticultural Science”, **Hortscience**, 8, 17-22, (1973).
- [54] Gorman, M.B. ve Kiang, Y.T., “Variety-specific Electrophoretic Variants Of Four Soybean Enzymes”, **Crop Science**, 17, 963-965, (1977).
- [55] Cardy B.J. ve Beversdorf, W.P., “Identification Of Soybean Cultivars Using Isoenzyme Electrophoresis”, **Seed Science and Technology**, 12, 943-954, (1984).
- [56] Hamrick, J.L. Godt, M.J.W. Murawski, D.A. Loveless, M.D., “Correlation Between Species Traits and Allozyme Diversity: İmplications For Conservation Biology”, **In: Falker, D.E. Holsinger, K.E. eds. Genetics and conservation of rare plants**, Oxford University Pres, U.K., 75-86, (1991).
- [57] Sammonur R.H., “Using Electrophoretic Techniques İn Varietal Identification, Biosystematic Analysis, Phylogenetic Relations and Genetic Resources Management”, **Journal of Islamic Academy of Sciences**, 4,3, 221-226, (1991).

- [58] Cooke, R.J., "The Characterisation and Identification Of Crop Cultivars by Electrophoresis" **Electrophoresis**, 5,59-72, (1984).
- [59] Babaoğlu S. ve ark., "Molecular Analysis Of Turkish Alyssum L. (Brassicaceae) Species By RAPD-PCR and SDS-PAGE Methods", **G.U. Journal of Science**, 17, 3, 25-33, (2004).
- [60] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. "Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis For Diagnosis Of Sickle Cell Anemia", **Science**, 230, 1350-1354, (1985).
- [61] Sönmezoğlu ve ark., "Markör Destekli Seleksiyonun Buğday Islahında Kullanımı", **GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi**, 27,1, 105-112, (2010).
- [62] Britten, R.J., "Rates of DNA Sequence Evolution Differ Between Taxonomic Groups", **Science**, 231, 1393-1398, (1986).
- [63] Reiter, S.R., Young, M. and Scolnik, P.A., "Genetic Linkage of The Arabidopsis Genome: Methods for Mapping with Recombinant Inbreds and RAPDs", **Methods in Arabidopsis Research**, World Scientific Publishing, Singapore, (1993).
- [64] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., "DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers", **Nucl. Acids Res.**, 18, 6531-6535, (1990).
- [65] Wough, R., Powell, W., "Using RAPD Markers For Crop Improvement", **TIBTECH**, 101, 186-191, (1992).
- [66] Welsh, J., McClelland, M. "Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers", **Nucleic Acids Research.**, 18,7213–7218, (1990).
- [67] Burr, B., R.L., Phillips, I.K., Vasil, "DNA-based Markers In Plants", **Kluwer Academic Publishers**, Netherlands, 1, (1994).
- [68] Yıldırım, A., Karadag, Y., Sakin, M.A., Gökmen, S., Kandemir, N., Akkaya, M.S. and Yıldırım, F., "Transfer of Stripe Rust Resistance Gene Yr26 to Turkish Wheats Using Microsatellite Markers", **Cereal Research Communications**, 32, 1, 25-30, (2004).
- [69] Rafalski, A., Morgante, M., Powell, W., Vogel, J.M. and Tingey, S.V., "Generating and Using DNA Markers in Plants", In: Birren B., Lai E. (Eds.): Analysis of Non-Mammalian Genomes - **A Practical Guide. Academic Pres.**, New York, (1996).
- [70] Lowe, A.J., Hinotte, O. and Guarino, L., "Standardization of Molecular Genetic Techniques for The Characterization of Germplasm Collections: The Caase of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)", **Plant Genetic Resources Newsletter**, 107, 50-54, (1996).
- [71] Ates Sönmezoglu, Ö., "Mikrosatelit DNA Belirleyicileri Kullanılarak Yerel Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Tanımlanması", Yüksek Lisans Tezi, **Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı**, Tokat, (2006).

- [72] Dede, B., "Mikrosatelit DNA Belirleyicileri Kullanılarak Yerel Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Tanımlanması", Yüksek Lisans Tezi, **Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı**, Tokat, (2007).
- [73] Nei, M., "Genetic Distance Between Populations", **Am. Nat.**, 106, 283-292, (1972).
- [74] Hamrick JL, Godt MJW, Allozyme diversity in plant species. In: Brown AH, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds), Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources, Sinauer Associates, Sunderland, 43-63, (1989).
- [75] Sözen E., Özaydın, B., "A Study Of Genetic Variation In Endemic Plant *Centaurea wiedemanniana* By Using RAPD Markers", **Ekoloji**, 19, 77, 1-8, (2010).
- [76] Ge, S., Oliveira, G.C.X., Schaal, B.A., Gao, L., Hong, D., "RAPD Variation Within and Between Natural Populations of Wild Rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil", **Heredity**, 82, 638-644, (1999).
- [77] Choudhury, P.R., Kohli, S., Srinivasan, K., Mohopatra, T., Sharma, R.P., "Identification and Classification of Aromatic Rices Based on DNA Fingerprinting", **Euphytica**, 118, 243-251, (2001).
- [78] Raghunathachari, P., Khanna, V.K., Singh, U.S., Singh, N.K., "RAPD Analysis of Genetic Variability in Indian Scented Rice Germplasm (*Oryza sativa* L.)", **Current Science**, 79, 7, 994-998, (2000).
- [79] Fahima, T., Sun, G.L. Beharav, A. Krugman, T. Beiles, A. and Nevo, E., "RAPD Polymorphism of Wild Emmer Wheat Populations, *Triticum dicoccoides*, in Isreal", **Theor. Appl. Genet**, 98, 434-447, (1999).
- [80] Freitas, L.B. de., Jerusalinsky, L. Bonatto, S.L. Salzano, F.M. and de Freitas, L.B., "Extreme Homogeneity Among Brazilian Wheat Genotypes Determined by RAPD Markers", **Pesquisa-Agropecuaria-Brasileira**, 35, 11, 2255-2260, (2000).
- [81] Szucs, P., Juhasz, A. Karsai, I. Lang, L. Veisz, O. and Bedo, Z., "Use of Molecular Markers for Studying Genetic Diversity in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). **Journal-of-Genetics-and-Breeding**, 54, 1, 25-33, (2000).
- [82] Amieur, N., Bouguennec, A. Marcoz, C. Sourdille, P. Bourgoïn, M. Khelifi, D. and Branlard, G., "Diversity of Seven Glutenin and Secalin Loci Within Triticale Cultivars Grown in Europa", **Euphytica**, 123; 295- 305, (2002).
- [83] Sun, G., Bond, M. Nas, H. Martin, R. and Dong, Z., "RAPD Polymorphism in Spring Wheat Cultivars and Lines With Different Level of Fusarium Resistance", **Theor Appl Genet**, 106, 1059-1067, (2003).
- [84] Tams, S.H., Bauner, E., Oetter, G. ve Melchinger, A.E., "Genetic Diversity in European Winter Triticale Determined with SSR Markers and Coancestry Coefficient", **Theor Appl Genet**, 108, 1385-1391, (2004).

ÖZGEÇMİŞ

Tuba ERBULUCU, 16.12.1984 tarihinde İzmit'te doğdu. İlkokul ve ortaokulu 15.Kolordu İlköğretim Okulunda okudu. 2003 yılında Kocaeli 19 Mayıs Lisesi'nin yabancı dil ağırlıklı bölümünden mezun oldu. 2004 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2008 yılında Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2009 Şubat'ta Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. yüksek lisans öğrenimine başladı. Yabancı dili İngilizcedir.