

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

86577

RASTGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK DNA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU (RAPD-PCR) ARACILIĞI İLE KONYA ÇEVRESİNDEKİ
HYACINTHELLA Schur (*LILIACEAE*) TÜRLERİ ARASINDAKİ
GENETİK UZAKLIKLARIN BELİRLENMESİ

Emine ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Konya, 1999

86577

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RASTGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK DNA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU (RAPD-PCR) ARACILIĞI İLE
KONYA ÇEVRESİNDEKİ *HYACINTHELLA* Schur (*LILIACEAE*)
TÜRLERİ ARASINDAKİ GENETİK UZAKLIKLARIN BELİRLENMESİ

Emine ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 09.09.1999 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu
ile kabul edilmiştir

.....
L. AÇIK
Yrd.Doç.Dr. Leylâ AÇIK
(Danışman)

.....
Doç.Dr. Ali ATEŞ
(Üye)

.....
Doç.Dr. Kuddisi ERTUĞRUL
(Üye)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**RASTGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK DNA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU (RAPD-PCR) ARACILIĞI İLE
KONYA ÇEVRESİNDEKİ *HYACINTHELLA* Schur (*LILIACEAE*)
TÜRLERİ ARASINDAKİ GENETİK UZAKLIKLARIN BELİRLENMESİ**

Emine ARSLAN

Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Leylâ AÇIK
1999, 70 Sayfa

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Leylâ AÇIK
Doç.Dr. Ali ATEŞ
Doç.Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Bazı bitkilerin genetik olarak tanımlanması için izozim, Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) gibi moleküler markırlar geliştirilmiştir. Bu markırlar bitki ıslahında, tohumların geliştirilmesinde ve bitki sistematğinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. RAPD-PCR bitki türleri arasındaki genetik polimorfizmin belirlenmesinde kullanılır. Bu çalışmada, *Hyacinthella lazulina*, *Hyacinthella hispida*, *Hyacinthella heldreichii*, *Hyacinthella acutiloba*, *Hyacinthella glabrescens*, *Hyacinthella campanulata* ve *Hyacinthella lineata* türleri arasında, RAPD-PCR tekniği ile genetik uzaklıklar bulunmuştur. Türler arası varyasyonlarla birlikte genetik uzaklıkların belirlenmesine ilave olarak aynı türün bireyleri arasındaki varyasyonlar da belirlenmiştir. Bizim çalışmalarımız bu tekniğin diğer sistematik tekniklerle beraber türlerin belirlenmesinde faydalı olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: RAPD-PZR, *Hyacinthella*, Genetik varyasyon.

ABSTRACT

Master Thesis

GENETIC DISTANCES AMONG *HYACINTHELLA* Schur (*LILIACEAE*) SPECIES BY RAPD-PCR IN KONYA

Emine ARSLAN

Selçuk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Leylâ AÇIK
1999, 70 Page

Jury: Assoc.Prof. Dr. Leylâ AÇIK
Assoc.Prof. Dr. Ali ATEŞ
Assoc.Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Molecular markers are currently being developed for some plants identification using isosymes, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). RAPD-PCR has emerged from biotechnological research as a practical genetic identity determinant useful in plant breeding, seed production and plant systematic. RAPD-PCR is also useful detection polymorphism between the individuals nuclear DNA of the same plant species. Genetic variation between *Hyacinthella lazulina*, *Hyacinthella hispida*, *Hyacinthella heldreichii*, *Hyacinthella acutiloba*, *Hyacinthella glabrescens*, *Hyacinthella campanulata* and *Hyacinthella lineata* were studied using RAPD-PCR. Interspecific variability was observed between most species. Moreover variation among individuals of the species were also studied. Our result showed that RAPD-PCR has proven to be effective and appropriate in addition to other systematic observation.

Key words: *Hyacinthella*, RAPD-PCR, Genetic variation.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada RAPD-PCR yöntemi ile *Hyacinthella* cinsine ait *H. hispida*, *H. heldreichii*, *H. glabrescens*, *H. campanulata*, *H. lineata*, *H. acutiloba*, *H. lazulina* türlerinin birbirine olan yakınlık derecelerini, tür içi ve türler arası polimorfizmin derecesini ve RAPD-PCR tekniğinin sistematik açıdan önemini incelemeyi amaçladık.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimleri ile bana öncülük eden, çalışmalarımı büyük bir titizlikle yürüten ve hiç bir yardımı esirgmeden yetişmemi sağlayan tez danışmanım Sn. Yrd. Doç. Dr. Leylâ AÇIK'a içtenlikle teşekkür ederim. Bütün çalışmalarında manevi desteğini hiç bir zaman esirgemeyen Sn. Doç. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a, laboratuvar çalışmalarında beni hiç bir zaman yalnız bırakmayan arkadaşım Arş. Gör. Ayten ÇELEBİ'ye, çalışmamda kullandığım bitkilerin teşhisleri için Sn. Doç. Dr. Hayri DUMAN'a, tez yazımda bana yardımcı olan Sn. Yrd.Doç.Dr. Gıyasettin KAŞIK'a, bütün çalışmalarında bilgisini hiç bir zaman benden esirgemeyen Sn. Doç.Dr. Ali ATEŞ'e, bitkilerin toplanmasında bana yardım eden babam Ali USLU'ya, sabır ve özveriyle daima yanımda olan aileme ve eşime teşekkür ederim.

Ayrıca bu araştırmayı bir proje ile destekleyen S. Ü. Araştırma Fonu'na, teşekkür ederim.

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER	vi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. <i>Liliaceae</i> Familyasının Özellikleri	3
2.1.1. <i>Hyacinthella</i> Schur cinsi özellikleri	5
2.1.1.1. <i>H. hispida</i>	5
2.1.1.2. <i>H. heldreichii</i>	6
2.1.1.3. <i>H. glabrescens</i>	7
2.1.1.4. <i>H. campamulata</i>	7
2.1.1.5. <i>H. lineata</i>	8
2.1.1.6. <i>H. acutiloba</i>	9
2.1.1.7. <i>H. lazulina</i>	9
2.2. Moleküler Sistematikte Kullanılan Bazı Teknikler	10
2.2.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	10
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
2.2.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	12
2.3. PCR Optimizasyonu	15
2.3.1. Enzim konsantrasyonu	15
2.3.2. Deoksinükleotid tri fosfatlar	15
2.3.3. Magnezyum konsantrasyonu	16
2.3.4. Diğer reaksiyon bileşikleri	16
2.3.5. Denatürasyon zamanı ve sıcaklık	17
2.3.6. Primerlerin DNA ipliğine birleşmesi (Primer annealing)	17

2.3.7. Primer uzaması (Primer extension)	18
2.3.8. Devir sayısı	18
2.3.9. Primerler	19
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.2. Bitki Materyali	20
3.3. Tampon ve Çözeltiler	20
3.3.1. DNA izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılan çözeltiler	20
3.3.2. PCR için kullanılan çözeltiler	21
3.3.3. PCR Amplifikasyonu için kullanılan primerler	22
3.3.4. Agaroz jel elektroforez için kullanılan çözeltiler	26
3.4. DNA Konsantrasyonunun Tayini	26
3.5. Sterilizasyon	26
3.6. DNA İzolasyonu	27
3.7. PCR-PCR	27
3.7.1. Temperature cyclers'in programlanması	28
3.8. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3.9. Veri Analizleri	29
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	30
5. KAYNAKLAR	68

SİMGELER

Kısaltmalar	Açıklama
A	Absorbans
ark	Arkadaşları
dNTP	Deoksिनुकलेतित त्रिफोसत
EDTA	Etilediamin-tetra-asetik asit
kb	Kilo baz
μ	Mikron
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Tris	Tris (hidroksimetilaminometan)
Tm	Erime sıcaklığı
UV	Ultraviyole
V	Volt

1. GİRİŞ

Çalışma materyalini oluşturan *Hyacinthella* Schur cinsi *LILIACEAE* familyası içinde yer almaktadır. *Liliaceae*, çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından biridir ve çiçekçilikte çok önemli bir yer tutmaktadır. *Liliaceae* familyası yeryüzünde 250 cinse ait 3500 tür kapsamaktadır (Hickey ve King 1997). Yurdumuzda ise 32 cinse ait 388 doğal tür ile temsil edilmektedir. Bu 388 türün 118'i endemiktir (Davis 1988).

Hyacinthella soğanlı bitkiler grubunda 17 türle temsil edilen küçük bir cinstir. Türkiye'de bunlardan 10'u vardır ve bu türlerden 9 tanesi ülkemiz için endemiktir (Persson ve Persson 1992).

Son yıllarda tür tanımlanması, türler arası ve tür içi polimorfizmi belirlemek için bazı moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) (Tanskley 1989), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) (Saiki ve ark. 1988), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR) (Welsh ve Mc Clelland 1990; Williams ve ark. 1990) dır. İki ayrı araştırmacı grubu (Welsh ve Mc Clelland 1990; Williams ve ark. 1990) özgül nükleotid dizi bilgisine gereksinim olmadan polimorfizmin, PCR yöntemi ile tek bir primer kullanılarak ortaya konabileceğini gösterdiler. "Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA" (RAPD) olarak tanımlanan bu yöntemde, çok geniş bir çeşitlilik kısa zamanda kolaylıkla saptanabilmektedir. Bu teknikte, rastgele nükleotid dizisine sahip olan primerler, genomik DNA'nın bu primere uyumlu bölgelerinin çoğaltımında kullanılır. Sonuçta oluşan fragmentlerin sayı ve büyüklüğü, primerin nükleotid dizisine ve kalıp DNA'da bu nükleotidin varlığına bağlı olarak genoma özgü bir "parmakizi" oluştururlar (Klein-Lankhorst ve ark. 1991).

Rastgele seçilmiş primerle PCR, çeşitli bitki türlerinin genetik ve sistematik çalışmalarında kullanılmıştır. Bu tekniğin sıklıkça tercih edilmesi rastgele seçilmiş

primerlerin kullanıldığı PCR'ın çok az DNA ile bile yapılabilmesi ve genomik DNA hakkında önceden bilgi gereksinimine ihtiyaç duymaması nedeni ile olmuştur (Klein-Lankhorst ve ark. 1991).

RAPD-PCR, genetik harita çıkartılmasında, çeşitli amaçlarla yapılan sistematik çalışmalarda ve bazı özel genlerin önemli olan bölgelerini kontrol eden yerlerin tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu sistem kullanılarak bazı bitki türlerinin genetik haritaları bulunmuştur. Bu bitkiler *Arabidopsis thaliana* (Reiter ve ark. 1992), *Secchorum spontaneum*, yabani şeker pancarı (Al-Janabi ve ark. 1992), çam türleri (Carlson ve ark. 1991; Chaparra ve ark. 1992), alfalfa (Echt ve ark. 1992) ve soya fasülyesidir (Williams ve ark. 1990).

Biz bu çalışmada RAPD-PCR yöntemi ile *Hyacinthella* cinsine ait *H. hispida*, *H. heldreichii*, *H. glabrescens*, *H. campanulata*, *H. lineata*, *H. acutiloba*, *H. lazulina* türlerinin birbirine olan yakınlık derecelerini tür içi ve türler arası polimorfizmin derecesini ve RAPD-PCR tekniğinin sistematik açıdan önemini incelemeyi amaçladık.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Liliaceae* Familyasının Özellikleri

Liliaceae çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından birini oluşturmakta, çiçekcilikte çok önemli bir yer tutmaktadır, pek çok diğer önemli güzel kültür bitkileri ve zambaklar bu familya ya dahildir. Bunlar ekonomik soğanlı bitkilerdir (Hickey ve King 1997).

Bir çok küçük grup, sınırlı bölgelerde sınırlı bir yayılış göstermesine rağmen familya kozmopolittir (Hickey ve King 1997).

Liliaceae'nin çoğu otsudur ve bunların büyük bir yüzdesine bulblar, kormlar, rizomlar veya kalın etli kökler gibi depolama organları oluşur. Ancak bazı cinsler, örneğin *Aloe* ve *Haworthia* yaprak dökmeyen sukkulent ve birkaç *Lapageria* gibi odunsu gövdeler ile yaprak dökmeyen tırmanıcılardır. Farklı yaprak karakterleri, tabana ait linear ile paralel damarlar (*Ornithogalum*, *Endymion*, *Eremurus*, *Anthericum*), sapa ait ve genişçe elipsoid ile ağsı damarlanma (*Trilium*) familyaya dahildir. *Gloriosa*'da tendriller yaprak uçlarında gelişirken *Asparagus*'da yapraklar önemsiz derecede indirgendiği halde yapraklar uçlardadır (Hickey ve King 1997).

Çiçekler genellikle düzenli ve hermafrodittir, salkımda taşınır, bazen tek (*Tulipa*) veya az çok bir talkım içine yoğunlaşmıştır (*Hemerocallis*). *Allium*'un çiçekleri şemsiye benzeri talkımlarda gelişmiştir. İki veya üç çiçekli olabilirken büyük bir küresel başta, çok geniş bir kaç çiçek taşıyabilir. Üç halkamın ikisinde genellikle altı, az-çok eşit periant segmentleri (nadiren dört veya altıdan fazla) vardır. Bazıları serbest (*Tulipa*) veya periant tüpüne birleşmiş halde bulunur (*Kniphofia*). Genellikle

altı stameni vardır (nadiren üç veya onikiden fazla), daima periant segmentleriyle zıt dizilmiştir (Hickey ve King 1997).

Ovaryum, birleşik üç karpelli, üst durumludur (nadiren alt durumlu veya orta durumlu), genellikle üç bölmeli ve axile plasenta, nadiren bir bölmeli ve parietalis plasentaya sahiptir. Ovuller genellikle çok sayıda (nadiren tek) ve her bir bölmede iki sıra dizilidir. Stilus tam veya bölmeli nadiren serbest, meyve ya katı kapsül ya da etli sulu ve çok taneli meyvedir. Tohumlar düz veya kavisli, embriyo bol endospermalıdır (Hickey ve King 1997).

Liliaceae'nin bir çoğu böceklerle tozlaşır, cazibe, periant segmentlerinin tabanında nektarlar meydana çıkarması veya ovaryumun bal salgılamasından kaynaklanır. Bunlar *Fritillaria* türlerinin çoğunda görülmektedir (Hickey ve King 1997).

Liliaceae üyelerinin belli başlıları bahçivanlıkta kullanılır, cinslerin çoğu son derece güzeldir. En popüler olanı lalelerdir. *Tulipa* cinsinde hibritleme bol miktarda yapılır. Özellikle geçen iki yüzyılda ve çok gösterişli hibridler elde edilebilmiştir, fakat türlerin bazıları, onaltıncı yüzyılın ortalarından beri bahçe bitkileri olarak bilinir. Diğer bir çok cins örneğin *Scilla*, *Muscari*, *Hyacinthus*, *Erythronium*, *Agapanthus*, *Colchicum*, *Kniphofia*, *Aloe*, *Hemerocallis*, *Hosta*, *Convallaria* ve *Gloriosa* bahçivanlar tarafından yaygın olarak kullanılırken *Lilium*'u da içeren bütün familyadaki türlerin çoğunluğu güzeldir. *Liliaceae*'nin bazıları ilaç vasıtası olarak kullanılmıştır, örneğin, *Aloe*, *Urginea*, *Veratrum* ve *Colchicum* gibi alkaloid colchicin ürünü veren tohum ve kormlardır. Bunlardan ayrı olarak tıpta kullanılan *Colchicum*'dan elde edilen colchicin poliploidi meydana getirmek için bitki genetiğinde kullanılmaktadır (Hickey ve King 1997).

2.1.1. *Hyacinthella* Schur cinsi özellikleri

Bulbulu, scapose, racemus, başaklı küçük bitkilerdir. Bir scapeli olduğu zaman yapraklar 2 (3) dir (Davis 1965). Bir scapeden fazla olduğu zaman yaprak sayısı 4 (5)'e çıkabilir. Scape çiçeklenme safhasında 3.5-20 cm kadardır. (Persson ve Wendelbo 1982). Meyve de scape 30 cm'ye kadar uzayabilir. Meyve de scape ve pediseller elongat'dır (Davis 1965). Brakteler çok ufak, çoğunlukla sadece bir kenar olarak görünür, hafiften iki lobludur (Persson ve Wendelbo 1982). Yapraklar tüylü veya tüysüz, çoğu kez bükülmüş, genellikle tüysüz, damarlar kurutulmuş vaziyette iken kesin olarak belirginleşir (Davis 1965).

Çiçekler ascending veya çok nadir patent, asla aşağı eğik olmaz. Meyvenin gelişimi esnasında periant devamlıdır. *Hyacinthella* periantının diğer akraba cinslerden farkı, meyvenin olgunlaşması esnasında parçalanmamış olmasıdır (Persson ve Wendelbo 1982).

Kapsül küçük 3.5-5 mm çapında, basık küremsi veya nadiren genişçe armut şeklinde veya yumurtamsı- yürek şeklinde, etrafı kabukla çevrilmiş, daima küçük bir gaga şekilli yanında devamlı stiluslu, oldukça kalın duvarlı ve serttir. Flamentler periant loblarının tabanında bağlanmıştır. Bütün *Hyacinthella* türleri çiçek gelişimi esnasında hemen hemen değişen açık mavi veya mavi - menekşe rengine, farklı renk tonlarına ve koyuluğa sahiptir. Tohumlar siyah, az-çok buruşuk, testa, yüksek büyültmede ağ gibidir (Persson ve Wendelbo 1982).

2.1.1.1. *H. hispida* J. Gay

İki yapraklı, birinci yaprağın genişliği 4-12 (17) mm'dir, ikinci yaprağın genişliği birincinin yarısından azdır, her iki yüzü de oldukça uzun belirgin tüyler ile

örtülüdür, undulat bükülmüş, yaprakların tabanında ve scapede genellikle erguvan renginde benekler vardır. Çiçeklenme safhasında scape 5-12 (16) cm, meyve de 23 cm'ye kadar uzar. Racemus (4) 10-20 (30) çiçekli, oldukça seyrek. Çiçek sapları 2-4 mm, ascending, mavi-menekşe rengindedir. Periant koyu mavi-menekşe renklidir. (4) 5-6 mm tübüler veya tübüler kampanulat, loblar tüpün yarısı kadardır, genişçe eliptik, subobtus veya obtus, submukronat. $2n = 18$, çiçeklenme zamanı ikinci ve dördüncü aylar arasındadır (Davis 1965).

Quercus coccifera ormanlarında, taşlı yamaçlarda, dağ eteğindeki kireçtaşı yığınlarında, kireçtaşı kayalıklarında, 100-1100 m de yetişir (Davis 1965).

C5 Niğde: Ulukışla'nın doğusu, tam güneşli kireçli taşlık yamaçlarda stepde, 150 m de, Adana: Fındıklı (Pozantı'nın kuzeydoğusu), seyrek *Juniperus excelsa* ile kalkerli yamaçlarda, 1200 m de bulunur (Persson ve Persson 1992).

2.1.1.2. *H. heldreichii* Boiss

İki yapraklı, birinci yaprağın genişliği (3) 5-12 (16) mm, ikinci yaprağın genişliği çoğu kez birincinin yarısından azdır, düz yüzlü tüysüz, nadiren kenar biraz scabrid, hafif erguvani, biraz undulat, maviye çalan yeşil renktedir. Çiçeklenme safhasında scape 4.5-15 cm, meyve de 25 cm'ye kadar çıkabilir. Racemus (3) 10-15 (25) çiçekli, oldukça yoğunundan seyreğe kadar olabilir. Çiçekler sapsız veya 2 cm'ye kadar olabilir. Periant çok koyu mavi-menekşe renkli, ascending (4) 5-6 (6.5) mm, tübüler veya tübüler kampanulat, loblar tübün uzunluğunun yarısı kadar, genişçe eliptik, subobtus, submukronattır. $2n = 18$, çiçeklenme zamanı ikinci ve beşinci aylar arasındadır (Davis 1965).

Kireçtaşı çakıllarında, beyaz marnlı tepelerde *Pinus* ormanlarında, küçük arazi açıklıklarında, *Quercus spp.* aralarında 150-1500 m de yetişir (Davis 1965).

C3 Antalya: İbradi'den Manavgat'a doğru, kalkerli karst bölgelerde, 950 m de, Akseki'nin güneyinde, seyrek *Quercus* çalılıkları arasında, kireçtaşı yamaçlar üzerinde açık alanlarda, 900 m de, Akseki'nin güneyinde 15.km de, *Pinus* ormanlığındaki kireçtaşı yamaçlarda, 900 m de, Gündoğmuş'dan Manavgat'a doğru 20.km de, tarla kenarlarında, 800 m de, Akseki'den Beyşehir yoluna doğru 1.km de, *Quercus cerris* ormanında bulunurlar (Persson ve Persson 1992).

2.1.1.3. *H. glabrescens* Boiss

H. heldreichii'ye benzer fakat yapraklar çoğukez daha geniş, birinci yaprağın genişliği (6) 5-20 mm, ikinci yaprağın genişliği daima birincinin hemen hemen yarısından çok az, yaprak kenarı tamamen tüysüz, çiçek sapları 2-7 mm'dir. Periant daha koyu renkli, koyu mavi-menekşe renklidir. $2n = 18$, çiçeklenme zamanı üçüncü ve dördüncü aylardır (Davis 1965).

Pinus ormanları altında kuru yamaçlarda kireçli, killi topraklarda 600-1300 m de yetişir (Davis 1965).

C5 Adana: Pozanti'nin güneyi, 1100-1400 m'de, Pozanti'dan Çamardı'ya doğru 12.3.km'de, 1200 m'de, Pozantının kuzeyi 15.km'de bulunurlar (Persson ve Persson 1992).

2.1.1.4. *H. campanulata* Persson & Wendelbo

İki yapraklı, birinci yaprağın genişliği 6-15 mm, ikinci yaprağın genişliği birincinin yarısı kadar, düz kenarlı, tüysüz, biraz undulat, erguvani hafif renkli, maviye çalan yeşil renklidir. Çiçeklenme safhasında scape 7 cm, meyve de 16 cm'ye kadar

uzar. Racemus 4-12 çiçekli, oldukça seyrek, çiçeklenme safhasında çiçek sapları 1.5-3 mm, ascending, meyve de 8 mm'ye kadar uzayabilir. Periant açık mavi 4.5-5.5 mm, kampanulat, loblar hemen hemen tütün uzunluğu kadar, genişçe ovat, obtus, emukronattır. $2n = 18$, çiçeklenme zamanı dördüncü aydır (Davis 1965).

Taşlık yamaçlarda, kireçtaşı uçurumlarda, 1100-1300 m de yetişir (Davis 1965).

C4 Konya: Konya'dan Beyşehir'e doğru 29. km de 1525m de bulunurlar (Persson ve Persson 1992).

2.1.1.5. *H. lineata* Steudel

Yaprakları iki nadiren üç, birinci yaprağın genişliği (-3) 5-15 (28) mm, ikinci yaprağın genişliği birincinin yarısından daha çok, bazen lamina üzerinde tüyler vardır, kenarları uzun ciliat veya ciliat scabridtir. Yaprakların tabanı ve scape çoğu kez hafif renkli veya mor beneklidir. Çiçeklenme safhasında scape 6.5-14 cm dir. Meyve de 20 (29) cm'ye kadar uzayabilir. Racemus 6-25 çiçekli, oldukça seyrek. Çiçeklenme safhasında çiçek sapları 2-6 mm, ascending, meyve de (2) 4-12 mm arasında değişir. Periant oldukça koyu maviden menekşe-maviye kadar değişir, (4) 4.5-5.5 (6) mm, tübüler kampanulat, loblar tütün yarısı uzunluğunda , genişçe ovat, subacut veya subobtus, submukronat, çoğu kez içe kıvrık, $2n = 16$. Çiçeklenme zamanı üçüncü ve beşinci aylar arasındadır (Davis 1965).

Quercus coccifera çalılığında, *Pinus nigra* altında, taşlık ve kumlu, bereketli topraklar ile kaplı çıplak yamaçlarda yetişir (200) 400-1500 m de bulunurlar (Davis 1965).

Manisa: Manisa Dağı 1050 m de, Denizli: Uşak'tan Denizli yoluna, Baklan ve Civrik arasında, 100 m de, Kazıkbeli'yi geçince Denizli-Kale yakınında Cucurköy Köyünde, 800 m de bulunurlar (Persson ve Wendelbo 1982).

2.1.1.6. *H. acutiloba* Persson & Wendelbo

H. lineata'ya benzer fakat normal olarak genellikle daha genişçe, üç yapraklı, birinci yaprağın genişliği (5) 10-20 (35) mm, periant açıktan orta maviye kadar değişebilir, düz, dar, çok elongat, subacut veya acut ancak loblar mikronattır. $2n = 18$, çiçeklenme zamanı dördüncü ve beşinci aylar arasındadır (Davis 1965).

Quercus çalılıklarında, kireç taşlı kayalık yamaçlarda yetişir, 1500-2100 m de bulunurlar (Davis 1965).

B6 Kayseri: Aşağıbeycahır üzeri, Pınarbaşı'nın güneyine doğru 12.km de, kireçtaşı yarıklarında ve çukurlarında, 1200 m de, Ziyaret'i geçince Gürün'den Pınarbaşı'na doğru 46.km de, kalkerli kayalık yamaçlar ile derin, zengin topraklarda, 1930-1950 m de, Sivas: Ziyaret'i geçince, ince kireçtaşı çakıllarında, tepelerde, 2100 m de, Erzincan: Erzincan'dan Başköy'e doğru 7-15.km'ler arasında, dağın yamacında, genellikle kalkerli olmayan yerlerde, 1600-2100 m de bulunurlar (Persson ve Persson 1992).

2.1.1.7. *H. lazulina* Persson & Persson

İki yapraklı veya iki scape'e sahipse üç yapraklı, erect patent veya patent, aşağıya eğilmiş, çoğunlukla bükülmüş undulat, tüysüz, maviye çalan yeşil çoğu kez belli belirsiz açık erguvani, kenarı düz veya scaperulous, genellikle koyu kırmızı - erguvani boyalı, ilk yaprak linear veya darca oblong - lanceolat, en az yedi çoğunlukla

on veya yirmi kez eninden daha uzun, (3) 4-9 (15) mm genişliğinde, ikinci yaprak birincinin aşağı yukarı yarısı kadardır. Scape (5) 8-25 (30) cm uzunluğunda, çok daha koyu kırmızı - erguvani benekli, meyve de 40 cm. Racemus (5) 8-30 (40) çiçekli, oldukça sık dizilmiş, başak benzeri sapsız veya saplıdır (pediseller çok nadir 1.5 mm). $2n = 22$ 'dir (Persson ve Persson 1992).

C4 İçel: Uzuncaburç 'dan Silifke'ye doğru 2.km de, *Quercus coccifera* altlarında, 1200 m de bulunur (Persson ve Persson 1992).

2.2. Moleküler Sistematikte Kullanılan Bazı Teknikler

Bitki sistematikçileri tür ayırımında sadece morfolojik karakterleri kullandıkları için çeşitli zorluklarla karşılaşabilmektedirler ve morfolojik olarak birbirine benzer iki türü ayırmada tereddüte düşmektedirler. Kromozom sayıları da eşitse bu ayırım oldukça zorlaşmaktadır. İşte bu nedenle sistematik açıdan problemlili taksonomik grupların (cins, tür, varyete v.s.) ayırımında moleküler genetik çalışmalar kullanılmaya başlanmıştır. Problemlili taksonomik grupların ayırımında kullanılabilen tekniklerden bazıları RFLP, PCR VE RAPD-PCR dir.

2.2.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

1970'lerde bakterilerden DNA restriksiyon enzimleri saflaştırılmıştır. Restriksiyon enzimleri DNA'yı 4-8 bazlık bir bölgeden tanıyarak keser. Bu dizi değişik restriksiyon enzimlerine göre farklılık gösterir. Ancak bu dizi herhangi bir şekilde değişime uğradığında (nokta mutasyonu, delesyon vs. gibi nedenlerle) restriksiyon enzimi ya daha önce kesim yaptığı bu noktayı tanıyamaz (nokta mutasyon durumu) ya da kesim noktasının yeri değiştiğinden (delesyon vs. durumu) kesilen

segmentin uzunluğunda bireyler arasında farklılıklar ortaya çıkar. Buna Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi denir. Bunlar bireylerin DNA dizilerindeki farklılıkların temelini oluşturur. Bu farklılıklar genellikle yakın taksonomik birimlerde daha az ancak uzak birimlerde daha fazladır (Tanksley 1989).

RFLP analizleri bir çok canlıda özellikle bitkilerde genetik haritaların meydana getirilmesinde büyük başarı göstermiştir. Bernatsky ve Tanksley'e (1989) göre bitki genetik kaynaklarının tanımlanmasında RFLP analizinin kullanımı faydalıdır. Bitki genetik kaynak tanımlanmasında kullanılan RFLP'lerin dezavantajı materyaller ve emeğin pahalıya mal oluşudur (Andersen ve Fairbanks 1990). RFLP'nin bir başka dezavantajı bol miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır (Roy ve ark. 1992).

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Son yıllarda özellikle 1980'li yılların başından itibaren, genetik materyaller üzerindeki çalışmalar, nükleik asit karakterizasyonunda, moleküler klonlamada, dizi analizlerinde, rekombinant teknolojisinde ve klinik uygulamalarda nükleik asit tabanlı problemlardan yararlanma imkanları giderek artmıştır. Saiki ve ark. (1985) tarafından, mevcut yöntemlerin duyarlılıkların artırılmasından ziyade, DNA veya RNA baz sıralarının sayısal olarak artırılması (amplifikasyon) teknolojisine dayanan ve dolayısıyla da mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan, Polimeraz zincir reaksiyonu'nu geliştirmişlerdir (Kumar 1989).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA dizilerinin *in vitro* şartlarda amplifikasyonu için bir metoddur, DNA teşhislerinde, diagnostik çalışmalarda, DNA dizilerinin klonlanması ve mutagenез çalışmalarında kullanılır (Kumar 1989).

Gen klonlama, dizi ve haritalama metodları sonucu genom hakkında bir çok önemli bilgiler elde edilmiştir (Kumar 1989).

PCR biyolojik çalışmaları çok kolaylaştırmıştır, gen nükleotid dizileri artık PCR ile çok kısa sürede yapılabilir. PCR, kolay ve hızlı olması nedeniyle tercih edilir. Uygulamayı çokca kolaylaştırabilen PCR, gen klonlamasında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Kumar 1989).

Polimeraz zincir reaksiyonu, iki sentetik DNA primerinin bağlanma yerleri arasında amplifiye edilmiş dizilerin karşılaştırılması ile polimorfizmin belirlenmesinde kullanılabilir (Weining ve Langridge 1991).

PCR, DNA'nın denatürasyonu, primerlerin uygun bölgelere birleşmesi ve primerlerin uzaması prensipleri üzerine kurulmuştur. Sıcaklığa dayanıklı bir enzim olan Taq DNA polimeraz, DNA'nın kontrollü-kalıp sentezini katalizler. PCR, aynı anda, kalıbın ters ucunda komplementer ipliklere bağlanmış iki primeri uzaması ile iki komplementer DNA ipliklerinin sentezini gerçekleştirir. DNA sentezinin özelliği tek yönlü oluşundan dolayı iki primerin yeri amplifiye edilmiş bölgeyi sınırlar ve her yeni sentezlenmiş DNA ipliği diğer primerin bağlanması için dizi ihtiva eder (Kumar 1989).

PCR'in her devri DNA'nın denatürasyonunu (95°C), primerlerin bağlanmasını (45-50°C) ve başka DNA sentezini başlatma (70-72°C) primeri ihtiva eder. Her devirde DNA'nın miktarı iki katına çıkar (Kumar 1989).

2.2.3. Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD yönteminde izole edilen DNA'nın çok az miktarları (25 ng) rastgele seçilmiş bir primer yardımı ile çoğaltılır. Bu oğaltım 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 yaklaşık 72°C'ye çıkarılması ile DNA sentezi başlatılır. Bu işlemler 35-45 kez tekrarlanır. Reaksiyon sonunda elde edilen ürünler jel üzerinde yürütülerek PCR ürünleri gözlenir. (Welsh ve McClelland 1990, Williams ve ark. 1990) .

RAPD markırları bitki üreticileri için ümit verici bir vasıta olmuştur. Çünkü çok az miktarda genomik DNA gerektirir, analitik yöntem hızlıdır ve nisbeten basittir. Radyoaktif izotopların kullanımına ihtiyaç duymazlar ve sadece laboratuvar donanımı ile deneyimli personel gerektirir (Deragon ve Landry 1992).

Welsh ve McClelland (1990); Williams ve ark.'a (1990) göre RAPD nisbeten bitkiler ve hayvanlardaki genetik markırları incelemek için yeni bir vasıta. Başlıca uygulama Bowditch ve ark. 1993'e göre genetik uzaklığın derecesini belirlemek ve yakın akraba olan türlerin genomlarını mukayese yapmak olmuştur (Bailey ve Lear 1994).

Williams ve ark (1990) tarafından rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) olarak adlandırılan bu teknik, Welsh ve McClelland (1990); Caetano ve ark.'a (1991) göre populasyon ve türlerde genetik çeşitliliği tayin etmede kullanılmıştır (Gandeboeuf ve ark. 1997).

RAPD markırları, analık-babalık tayininde, melez çeşitlerinin homozigotluğunun belirlenmesinde kullanılır (Roy ve ark. 1992).

RAPD markırları kullanılarak safkan ve Arap atları arasında bir karşılaştırma yapılmıştır (Bailey ve Lear 1994). On Arap atı ve on safkan at arasında genetik farklılıklar belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada RAPD markırları ile brokoli ve karnabaharın mukayesesi yapılmıştır. Brokoli ve karnabaharın birbirine olan yakınlığın görülmüştür. (Hu ve Quiros 1991). On dört brokoli ve on iki tip karnabahar ayrımı için 10 mer'lik dört adet

rastgele primer ile oluşturulan RAPD markırları kullanılmıştır. İki ve üç primerle oluşturulan markırlar sıra ile her brokoli ve karnabahar (*Brassica oleraceae* L.) kültürünü ayırmada yeterli olmuştur. Markırlardaki ortalama farklılık brokoli ve karnabaharda 14.5, iki brokoli arasında 5.8 ve iki karnabahar kültürü arasında 7.9 bulunmuştur. Brokoli ve karnabahar kültürlerinin teşhisinde RAPD markırları hızlı ve güvenilir bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada yaprak bitlerinde DNA polimorfizmlerini ortaya çıkarmada RAPD-PCR kullanılmıştır (Black ve ark. 1992). Bu çalışmada dört yaprak biti türünde genetik varyasyon göstermede bu tekniğin faydalı olduğu görülmüştür. RAPD-PCR, bu türlerin her birinde bireyler arasında genetik varyasyonun çok miktarda olduğunu gösterdi. Varyasyon, biotipler, populasyonlar, renk morfolojileri ve hatta bir tek bitki üzerindeki bireyler arasında meydana çıkarılmıştır. RAPD-PCR tür teşhislerinde, parazitoit meydana çıkarmada ve populasyon çalışmalarında da kullanılmıştır.

Diğer bir çalışmada kasımpatındaki (*Dendranthema grandiflora*) genetik varyasyon belirlemede RAPD tekniği kullanılmıştır (Wolff ve Van Rinj 1993). Akraba *Dendranthema* türleri arasındaki genetik değişkenlik, ya kasımpatı da dahil türler arasında ya da kasımpatına akraba türler arasında genetik uzaklıklar çok yüksektir.

Bir başka çalışmada da *Brassica napus* transformasyon çalışmalarında PCR'ın kullanılması ile *Brassica napus* bitkisine transfer olan DNA'nın T2 ve T3 generasyonlarındaki katılımı izlenmiştir (Turgut 1994). Elde edilen sonuçlara göre, PCR gen aktarılmış bitkilerin belirlenmesinde kullanışlı ve güvenilir bir teknik olduğu gösterilmiştir.

RAPD-PCR, bitki ıslahında faydalı olduğu bulunmuştur (McDonald ve ark. 1993).

Yapılan bir başka çalışmada RAPD markırları kullanılarak *Tuber* türlerinin teşhisi ve gruplandırılması yapılmıştır (Gandebœuf ve ark. 1997). On iki *Tuber* taksonunun meyve ana bölümlerinin genetik varyasyonu RAPD tekniği ile çalışılmıştır. Varyasyon bir çok tür arasında gözlenmiştir. RAPD ve PCR, *Tuber* türleri genetik varyasyon analizleri için faydalıdır. Bir çok *Tuber* türünün çoğaltılmış DNA profillerindeki farklar gözlenmiştir. Ancak iki çift yakın akraba taksonunda *Tuber aestivum-Tuber uncinatum* ve *Tuber brumale var. brumale-Tuber brumale var. moschatum* genotip olarak fark görülmemiştir.

2.3. PCR Optimizasyonu

2.3.1. Enzim konsantrasyonu

Bir PCR'ı optimize etmek için, 0.1 ile 5 unit/100 µl arasındaki enzim konsantrasyonları denenerek, sonuçlar jel elektroforezde tayin edilmelidir. Eğer enzim konsantrasyonu çok yüksek ise spesifik olmayan geri plan ürünleri oluşabilir ve eğer çok düşükse istenilen üründen yetersiz oluşabilir. Bunun yanında değişik kaynaklardan temin edilen Taq DNA polimeraz değişik formülasyon, deney koşullarından dolayı değişik sonuçlar alınabilir (Innis ve Gelfand 1990).

2.3.2. Deoksinükleotid tri fosfatlar

Stok dNTP solüsyonlarının pH'ı 7.0'a nötrlenmeli ve konsantrasyonlar spektrofotometrik olarak belirlenmelidir. Herbiri 1mM dNTP içeren çalışma stoğu önerilir. 20 ve 200 µM arasındaki deoksinükleotid konsantrasyonlarında herbir ürün miktarı, spesifik ve doğruluk açısından optimum dengede olan sonuçlar verir. dNTP

karışımı yanlış birleşme hatalarının en aza indirgenmesi bakımından eşit konsantrasyonlarda kullanılmalıdır. PCR'ın spesifikliğı ve doğruluğı orjinal Klenow aracılığı ile PCR herbiri 1.5mM altında dNTP konsantrasyonu kullanmakla yükselir. Düşük dNTP konsantrasyonu hedef olmayan yerlerde yanlış primer birleşme şansını en düşüğe indirir. Hedef dizinin uzunluğı ve kompozisyonu için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu seçilmelidir (Innis ve Gelfand 1990).

2.3.3. Magnezyum konsantrasyonu

Magnezyum konsantrasyonu, primerlerin birleşmesinde hem PCR ürününün hem de kalıp DNA'nın ipliklerinin ayrılma sıcaklığında, yabancı primer-dimer oluşumunda, enzim aktivitesinde ve doğruluğunda çok önemlidir. PCR da Mg^{+2} miktarı toplam dNTP konsantrasyonun 0.5-2.5 mM üzerinde olmalıdır (Innis ve Gelfand 1990).

2.3.4. Diğer reaksiyon bileşikleri

Sıcaklığın 20 ° C olduğu durumlarda, PCR için tavsiye edilen tampon, 10-50 mM Tris-HCl (pH 8.3-8.8) dir. Primerin DNA ipliğine birleşmesini kolaylaştırmak için reaksiyon karışımına 50 mM'a kadar KCl eklenebilir. 50 mM altında NaCl veya üzerinde KCl Taq polimeraz aktivitesini inhibe eder (Innis ve Gelfand 1990).

Bir çok protokol ilave protein olmadan da iyi işlemesine rağmen bovine serum albumin (100 mg/ml) ve iyonik olmayan deterjanlarda Tween 20 veya Laureth 12 enzim stabilizasyonuna yardımcı olmak için eklenebilir (Innis ve Gelfand 1990).

2.3.5. Denatürasyon zamanı ve sıcaklık

PCR başarısızlığın en muhtemel nedeni kalıp DNA'nın eksik denatürasyonudur. Tipik koşullar 30 sn için 95 ° C veya 15 sn için 97 ° C dir. Bununla beraber özellikle G+C bakımından zengin bölgelerde daha yüksek ısılar uygun olabilir. Eksik denatürasyon, DNA tortularının geri yükselmesine ve bu sebeple de ürün veriminin düşmesine neden olur. Tam tersi olarak çok yüksek veya çok uzun denatürasyon da gereksiz yere enzim aktivitesi kaybına neden olmaktadır. Taq DNA polimeraz aktivitesinin yarı ömrü 92.5, 95 ve 97.5 ° C'lerine göre sırası ile >2 saat, 40 dakika ve 5 dakikadır (Innis ve Gelfand 1990).

2.3.6. Primerlerin DNA ipliğine birleşmesi (Primer annealing)

Bunun için gereken sıcaklık ve süre, çoğaltan primerlerin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve baz kompozisyonuna göre değişir. Uygulanabilir birleşme sıcaklığı birleşen primerlerin gerçek erime derecesinin 5 ° C derece altındadır. Taq DNA polimeraz geniş bir sıcaklık aralığında aktif olduğu için, düşük sıcaklıkta birleşme basamağında primer birleşmesi meydana gelecektir. Birleşme sıcaklıkları için 55 ° C ve 45 ° C dereceler genellikle en iyi sonucu verir. Tipik primer konsantrasyonlarında, (0.2 µM), birleşme sadece bir kaç saniye olacaktır. Birleşme sıcaklığının yükselmesi yanlış birleşen primerlere karşı ayrımı artırır ve primerlerin 3' ucundaki yanlış nükleotid büyümesini azaltır. Başlangıç devirlerindeki maksimum spesifikasyon için Taq DNA polimeraz primer birleşmesi sırasında ilk denatürasyon aşamasında ilave edilmelidir (Innis ve Gelfand 1990).

2.3.7. Primer uzaması (Primer extension)

Uzama zamanı hedef dizinin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve sıcaklığına bağlıdır. Primer uzamalar genellikle 72 °C de gerçekleştirilir. Çünkü M13-‘e bağlı olan modellerdeki kalıplarda bu ısı, primer uzaması için optimale yakındır. Bir dakikalık uzama zamanı 72 °C de 2 kb uzunluğuna kadar olan ürünler için yeterlidir. Eğer, madde konsantrasyonu çok düşükse veya ürün konsantrasyonu enzim konsantrasyonunu aşıyorsa (yaklaşık 1nM) daha uzun uzama zamanı faydalı olabilir (Innis ve Gelfand 1990).

2.3.8. Devir sayısı

Diğer parametreler optimize edildikten sonra devir sayısının optimizasyonu gereklidir. Optimum devir sayısı kalıp DNA'nın başlangıç konsantrasyonuna bağlı olacaktır. Gereğinden fazla devir, spesifik olmayan yan ürünlerin miktarını ve karışıklığını artırabilir. Şüphesiz çok azıda düşük ürün verimine neden olur. Bazı kaynaklara göre başlangıç hedef DNA konsantrasyonları ve devir sayısı şöyledir:

<u>Kalıp Moleküllerin Sayısı</u>	<u>Devir Sayısı</u>
3×10^5	25-30
1.5×10^4	30-35
1×10^3	35-40
50	40-45

(Innis ve Gelfand 1990)

1.3.9. Primerler

Primer konsantrasyonu için optimum değer 0.1 ile 0.5 μ M dir. Yüksek primer konsantrasyonları, yanlış primer seçimi ve spesifik olmayan ürünlerin toplanmasını teşvik eder ve primer-dimer olarak tabir edilen, spesifik olmayan kalıp DNA'dan bağımsız yabancı maddelerin meydana gelmesi ihtimalini artırır. Tipik primer 18 ila 28 nükleotid uzunluğunda ve %50-60 G+C kompozisyonundadırlar (Innis ve Gelfand 1990).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hyacinthella cinsine ait türler ile çalışıldı. Bu çalışmada kullanılan bütün kimyasal maddeler SIGMA firmasından temin edildi.

3.2. Bitki Materyali

İncelenen türler *H. hispida* , *H. heldereichii*, *H. glabrescens*, *H. campanulata*, *H. lineata*, *H. acutiloba*, *H. lazulina*.

3.3. Tampon ve Çözeltiler

3.3.1. DNA izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılan çözeltiler

Stok Tris Çözeltisi: 500 mM Tris (HCl ile pH 8.0'e ayarlandı)

Stok EDTA Çözeltisi: (Etilendiamin-tetra-acetic acid disodium salt) 500 mM

EDTA (5 M NaOH ile pH 8.0'e ayarlandı).

Borik Asit

Ekstraksiyon Tamponu: 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, %1 SDS

TE Tamponu: 10 mM Tris, 1 mM EDTA

Ethidyum Bromid: 10 mg/ml

Tris ile Ayarlanmış Fenol: Fenol ile Tris pH 8.0'e ayarlandı.

Fenol-kloroform (1:1) çözeltisi: Tris ile dengelenmiş fenol ve kloroform karıştırıldı (Otoklavlanmadı). +4 °C'de muhafaza edildi.

Etanol (%96'lık ve %70'lik)

Sıvı Azot

3.3.2. PCR için kullanılan çözeltiler

Nükleotid Karışımı: 100 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

Taq Polimeraz Tamponu: (10 kez yoğunlaştırılmış) 20 mM Tris HCl (pH 7,5)
1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0,2 mg/ml BSA, %0,5 Nonidet P40, %50
Gliserol

MgCl₂: 25 mM

Taq Polimeraz: 0,5 unit/μl

3.3.3. PCR Amplifikasyonu için kullanılan primerler

PRİMER 1 (O-4)

5' - AAT CGG GCT G -3'

Miktar “	25.0 OD 691 µg 204.9 nmol	Uzunluk GC Muhtevası	10-mer 60 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	225.2 pmol/µl	A	G C T
Volum için 100 pmol/µl	2252 µl	2	4 2 2
Moleküler Ağırlık Tm (termodinamik)	3068 g/mol 19.9°C		

PRİMER 2 (O-2)

5' - TGC CGA GCT G -3'

Miktar	21.3 OD 629 µg 206.6 nmol	Uzunluk GC Muhtevası	10-mer 60 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	206.6 pmol/µl	A	G C T
Volum için 100 pmol/µl	2066 µl	1	4 3 2
Moleküler Ağırlık Tm (termodinamik)	3044 g/mol 21.7°C		

PRİMER 3 (O-12)

5' - ACG ACC CAC G -3'

Miktar	11.8 OD 329 µg 110.2 nmol	Uzunluk 10-mer GC Muhtevası 60 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	110.2 pmol/µl	A G C T 3 2 5
Volum için 100 pmol/µl	1102 µl	
Moleküler Ağırlık Tm (termodinamik)	2982 g/mol 18.9°C	

PRİMER 4 (O-3)

5' - GTG ACG TAG G -3'

Miktar	23.2 OD 626 µg 201.4 nmol	Uzunluk 10-mer GC Muhtevası 60 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	201.4 pmol/µl	A G C T 2 5 1 2
Volum için 100 pmol/µl	2014 µl	
Moleküler Ağırlık Tm (termodinamik)	3108 g/mol 1.9°C	

PRİMER 5 (O-5)

5' - GGG TAA CGC C -3'

Miktar	16.6 OD 464 µg 151.9 nmol	Uzunluk 10-mer GC Muhtevası 60 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	151.9 pmol/µl	A G C T 2 4 3 1
Volum için 100 pmol/µl	1519 µl	
Moleküler Ağırlık Tm (termodinamik)	3053 g/mol 19.9°C	

PRİMER 8 (O-11)

5' - TTA TGA AAC GAC GGC CAG T-3'

Miktar	17.9 OD 480 µg 82.2 nmol	Uzunluk 19-mer GC Muhtevası 47.4 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	82.2 pmol/µl	A G C T 6 5 4 4
Volum için 100 pmol/µl	822 µl	
Moleküler Ağırlık Tm (termodinamik)	5837 g/mol 50.5 °C	

PRİMER 9 (O-1)

5' - CAG GCC CTT C -3'

Miktar	19.4 OD 607 µg 204.9 nmol	Uzunluk	10-mer GC Muhtevası 70 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	204.9 pmol/µl	A	G C T
Volum için 100 pmol/µl	2049 µl	1	2 5 2
Moleküler Ağırlık	2964 g/mol		
Tm (termodinamik)	18.6 °C		

PRİMER 10 (O-7)

5' - GAA ACG GGT G -3'

Miktar	24.2 OD 621 µg 199.3 nmol	Uzunluk	10-mer GC Muhtevası 60 %
Konsantrasyon (Volum 1 ml)	199.3 pmol/µl	A	G C T
Volum için 100 pmol/µl	1993 µl	3	5 1 1
Moleküler Ağırlık	3117 g/mol		
Tm (termodinamik)	14.4 °C		

3.3.4. Agoroz jel elektroforez için kullanılan çözeltiler

Agoroz: %2 lik agoroz, TBE ve TAE tamponunda hazırlanır.

TBE Tamponu 5×: 54 gr Tris, 27,5 g Borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0).
Distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

TAE Tamponu 50×: 242 gr Tris, 57,1 GAA, 100 ml 500 M EDTA (pH 8,0).
Distile su ile 1 lt 'ye tamamlandı.

Yükleme Tamponu: %0.25 bromofenol mavisi, %0.25 ksilen siyanol ve %40 sukroz.

Ethidium Bromid: 10 mg/ml, koyu renkli şişelerde muhafaza edildi (Otoklavlanmadı).

3.4. DNA Konsantrasyonunun Tayini

UV absorbans spektrofotometresi ile 260 nm de ölçüm yapıldı. Buna göre; $A_{260}=1$ olduğunda DNA miktarı 50 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. DNA saflığı için ise $A_{260}/A_{280}=1,8$ formülü uygulandı (Eğer 1,8'e eşit ise saf DNA, fazla ise saf olmayan DNA).

3.5. Sterilizasyon

Bütün çözeltiler, tamponlar, kullanılan tüpler ve pipet uçları 121°C'de 20 dk otoklavlandı.

3.6. DNA izolasyonu

Bitki materyalinden genomik DNA'nın elde edilmesi için her türün bireylerinden alınan yapraklar ayrı ayrı sıvı azot ilave edildikten sonra porselen havanda ezildi. Homojenat steril küçük cam beherlere alınarak ekstraksiyon tamponu ile muamele edildi. Bu karışım manyetik karıştırıcı ile 50 dk, +4°C'de karıştırıldı. Homojenat steril mikrofüj tüplerine alınarak +4°C'de 10000 rpm (devir/dakika)'da 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucu üstte kalan süpernatant kısmı alındı. Proteinlerin uzaklaştırılması için 1:1 oranda fenol kloroform eklendi. Vortex yapıldı ve tüpler 3 dakikalığına santrifüje kondu. Tekrar üstteki sıvı kısım yeni tüplere aktarıldı ve kloroform eklendi (1:1). Vortex yapıldı ve tüpler yine 3 dakikalığına santrifüje kondu. Kloroform işlemi tekrarlandı. Santrifüj işleminden sonra üst kısımda kalan sıvı kısım yeni tüplere alındı. DNA presipitasyonu için tüplere 2,5 hacim kadar etanol ilave edildi ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Bekleme işleminden sonra tüpler 10 dakika +4°C'de en yüksek hızla santrifüj edildi. Etanol kısmı atılarak, %70'lik alkolle yıkama yapıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. TE eklenerek derin dondurucuda -20°C de muhafaza edildi.

3.7. RAPD-PCR

Genomik DNA'nın çoğaltımında, sıcaklığa dayanıklı bir enzim olan Taq DNA polimeraz kullanıldı. Bu enzim -20°C'de derin dondurucuda saklandı. PCR reaksiyonu 0,5 ml propilen tüplerde 100 µl'lik toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Tüplere çeşitli bileşenler aşağıdaki oranda ilave edildi.

Bileşen	µl
Su	77
MgCl	8

Taq Pol Tamponu 10x	10
Primer	1
dNTP	1
DNA	2
Taq polimeraz	1

3.7.1. Temperature cyclers'in proglamlanması

96°C	⇒	30 saniye (denatürasyon)
30°C	⇒	30 saniye (primerlerin birleşmesi)
72°C	⇒	30 saniye (DNA sentez)

3.8. Agoroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin analizi için % 2'lik agoroz jeller kullanıldı. 1×TAE ve 1×TBE tampon içerisinde kaynatıldı. Bu jel içine 1 µl ethidium bromid eklendi. Elektroforez tabağına DNA'yı yükleyeceğimiz kuyucukları oluşturmak için tarak yerleştirildi. Sıcaklığı düştükten sonra jel, elektroforez tabağına döküldü. Hazırladığımız jel polimerleştikten sonra tarak çekildi ve TAE ve TBE tamponu içeren tanka yerleştirildi. Her bir PCR örneği yükleme tamponu ile birlikte karıştırılarak 20 µl olarak jeldeki boşluklara yüklendi.

PCR ürünleri 40-90 V arasında serbest akımda 10-20 dakika yürütüldü. Örneklerdeki DNA UV transulminatörde incelendi. Polaroid black&white print film type 667 ile fotoğraflandı. Moleküler metotlar özellikle belirtilmediği durumlarda Maniatis ve ark.'a göre yapıldı (Maniatis ve ark. 1989).

3.9. Veri Analizleri

Türler arasındaki genetik uzaklıkları bulmak için agaroz jel elektroforezinden çekilen fotoğraflara göre bantların varlığı ve yokluğu belirlenerek bir tablo oluşturuldu. Bu tablodan yola çıkılarak syntax programındaki jaccard formülüne göre dendrogramlar hazırlandı.



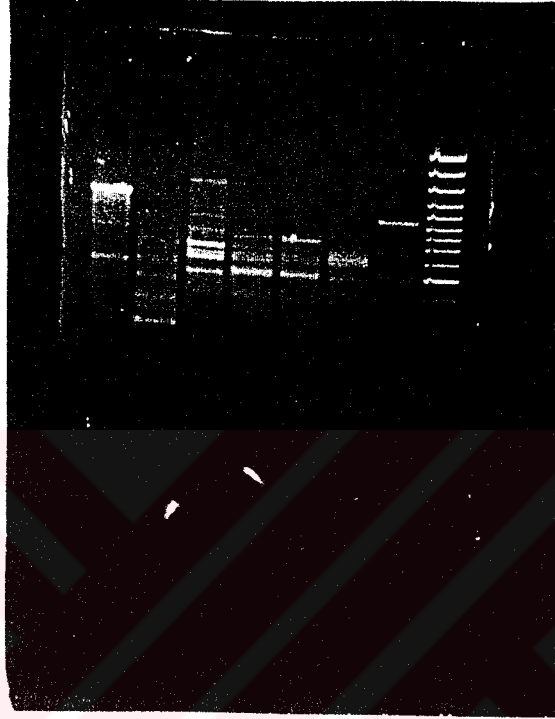
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Materyal olarak *Hyacinthella* cinsine ait; *H. hispida*, *H. heldreichii*, *H. glabrescent*, *H. campamilata*, *H. lineata*, *H. acutiloba*, *H. lazulina* ile çalışılmıştır. Bitkinin yaprakları sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilmiştir. Ya direkt DNA izole edildi veya alüminyum folyo ile sarılarak kullanmak amacıyla -20 ° C’de derin dondurucuda saklanmıştır. Bu örnekler gruplar halinde ayrıldı ve O-11, O-3, O-5, O-12, O-2, O-7, O-4, O-1 primerleri kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezinden sonra fotoğrafları çekildi ve her türe ait DNA bantları göz önünde tutularak genetik uzaklıklar hesaplandı ve syntax programı ile dendrogramlar çizildi.



4.1. RAPD-PCR Aracılığı ile *H. hispida*, *H. campanulata* ve *H. acutiloba* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar.

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.1. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-5 primeri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: *H. hispida* 4

Hat 2: *H. hispida* 4

Hat 3: *H. campanulata* 6

Hat 4: *H. campanulata* 1

Hat 5: *H. campanulata* 2

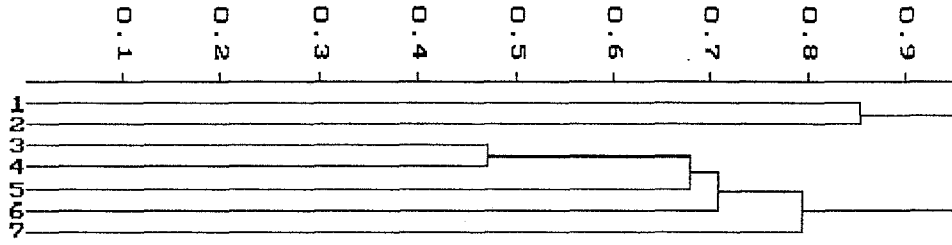
Hat 6: *H. acutiloba*

Hat 7: *H. hispida* 1

Hat 8: DNA Ladder Plus

Tablo 4.1. Şekil 4.1'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. his4: *H. hispida* 4, cam6: *H. campanulata* 6, cam1: *H. campanulata* 1, cam2: *H. campanulata* 2, acu: *H. acutiloba*, his1: *H. hispida* 1

İncelenen Tür İsimleri	his4	his4	cam6	cam1	cam2	acu	his1
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	1	1	0	1	0
	1	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	0	1
	1	1	1	1	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0
	0	1	1	1	1	1	1
	0	0	1	1	1	1	0
	1	1	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	1	1	1
	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	1	0	0
	0	1	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0

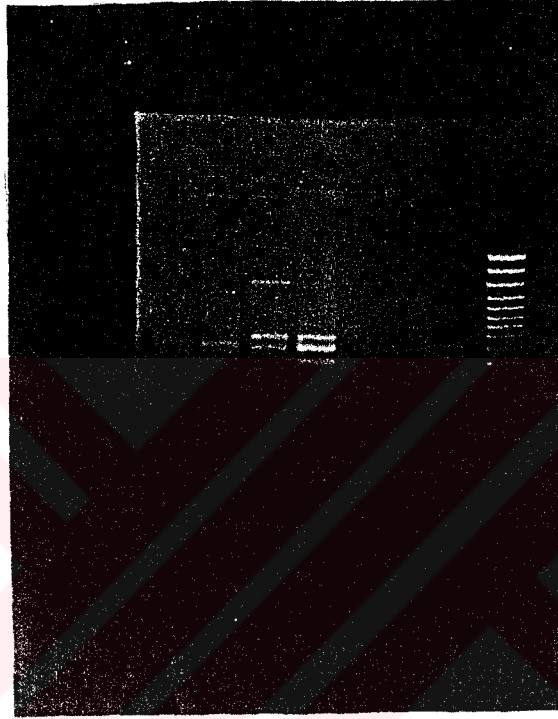


Şekil 4.2. Şekil 4.1'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. hispida* 4
2. *H. hispida* 4
3. *H. campanulata* 6
4. *H. campanulata* 1
5. *H. campanulata* 2
6. *H. acutiloba*
7. *H. hispida* 1

4.2. RAPD-PCR aracılığı ile *H. hispida*, *H. glabrescens*, *H. acutiloba* ve *H. lazulina* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.3. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-5 primeri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: *H. hispida* 5

Hat 2: *H. glabrescens* 2

Hat 3: *H. acutiloba*

Hat 4: *H. glabrescens* 3

Hat 5: *H. glabrescens* 2

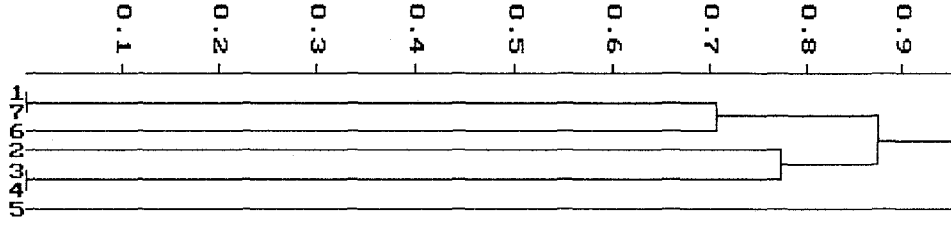
Hat 6: *H. lazulina* 1

Hat 7: *H. lazulina* 2

Hat 8: DNA Ladder

Tablo 4.2. Şekil 4.3'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. his5: *H. hispida* 5, gla2: *H. glabrescens* 2, acu: *H. acutiloba*, gla3: *H. glabrescens* 3, gla2: *H. glabrescens* 2, laz1: *H. lazulina* 1, laz2: *H. lazulina* 2

İncelenen Tür İsimleri	his5	gla2	acu	gla3	gla2	laz1	laz2
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	1	1	1	0	0
	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	0	1	1
	1	0	0	0	0	0	1
	0	1	1	1	0	0	0

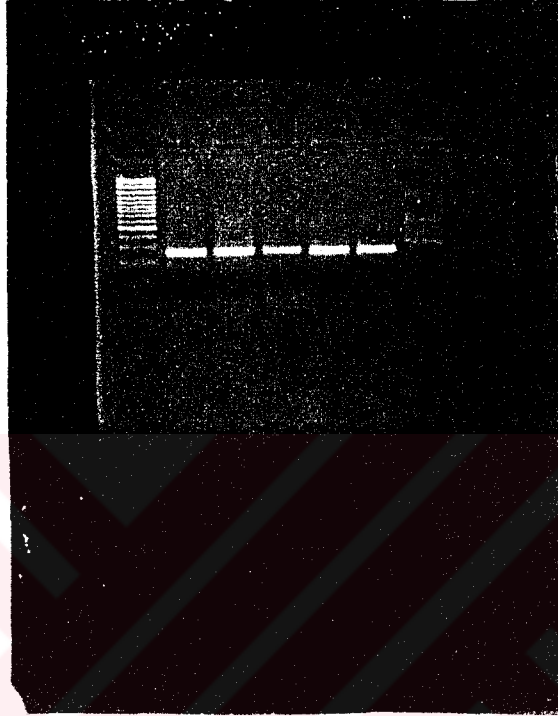


Şekil 4.4. Şekil 4.3'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. hispida* 5
2. *H. glabrescens* 2
3. *H. acutiloba*
4. *H. glabrescens* 3
5. *H. glabrescens* 2
6. *H. lazulina* 1
7. *H. lazulina* 2

4.3. RAPD-PCR aracılığı ile *H. hispida*, *H. campanulata* ve *H. acutiloba* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar

1 2 3 4 5 6 7



Şekil 4.5. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-4 ve O-5 primerleri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: DNA Ladder Plus

Hat 2: *H. hispida* 5

Hat 3: *H. hispida* 4

Hat 4: *H. hispida* 2

Hat 5: *H. campanulata* 1

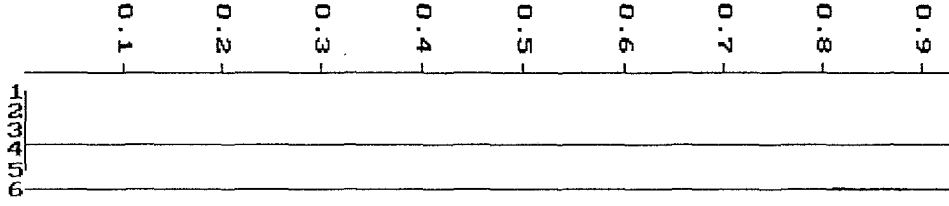
Hat 6: *H. acutiloba*

Hat 7: *H. campanulata* 2

Tablo 4.3. Şekil 4.5.'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. his5: *H. hispida* 5, his4: *H. hispida* 4, his2: *H. hispida* 2, cam1: *H. campamilata* 1, acu: *H. acutiloba*, cam2: *H. campamilata* 2

İncelenen Tür İsimleri	his5	his4	his2	cam1	acu	cam2
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	1





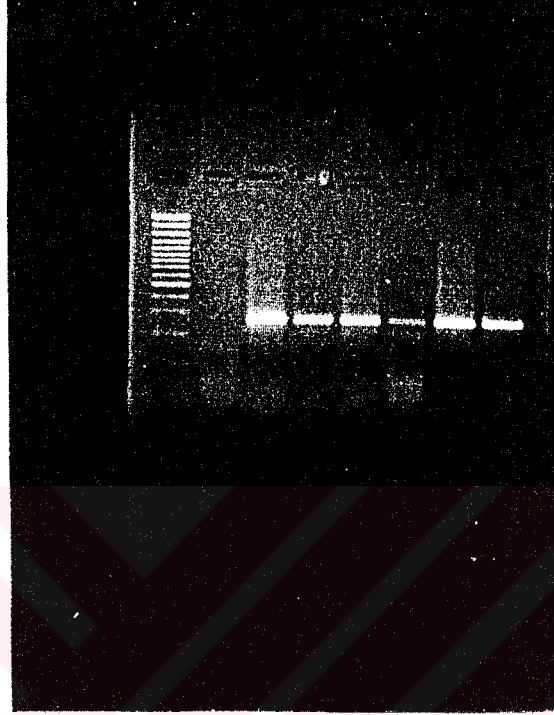
Şekil 4.6. Şekil 4.5'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. hispida* 5
2. *H. hispida* 4
3. *H. hispida* 2
4. *H. campanulata* 1
5. *H. acutiloba*
6. *H. campanulata* 2



4.4. RAPD-PCR aracılığı ile *H. glabrescens*, *H. acutiloba* ve *H. hispida* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.7. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-4 primeri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: DNA Ladder Plus

Hat 2: *H. glabrescens* 2

Hat 3: *H. glabrescens* 2

Hat 4: *H. glabrescens* 5

Hat 5: *H. glabrescens* 3

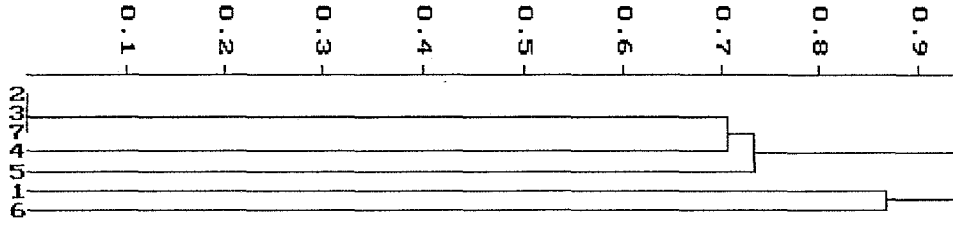
Hat 6: *H. glabrescens* 1

Hat 7: *H. acutiloba*

Hat 8: *H. hispida* 1

Tablo 4.4. Şekil 4.7.'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. gla2: *H. glabrescens* 2, gla5: *H. glabrescens* 5, gla3: *H. glabrescens* 3, gla1: *H. glabrescens*1, acu: *H. acutiloba*, his1: *H. hispida*

İncelenen Tür İsimleri	gla2	gla2	gla5	gla3	gla1	acu	his1
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	1	0
	1	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	1	0	0
	0	1	1	1	1	1	1

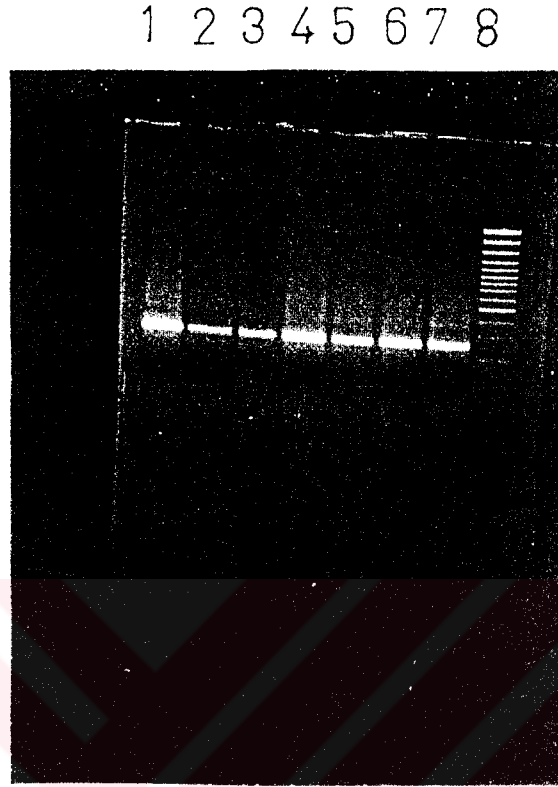


Şekil 4.8. Şekil 4.7'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. glabrescens* 2
2. *H. glabrescens* 2
3. *H. glabrescens* 5
4. *H. glabrescens* 3
5. *H. glabrescens* 1
6. *H. acutiloba*
7. *H. hispida* 1



4.5. RAPD-PCR aracılığı ile *H. lineata* ve *H. lazulina* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar



Şekil 4.9. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-4 primeri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: *H. lineata* 4

Hat 2: *H. lineata* 3

Hat 3: *H. lineata* 1

Hat 4: *H. lineata* 5

Hat 5: *H. lazulina* 2

Hat 6: *H. lazulina* 1

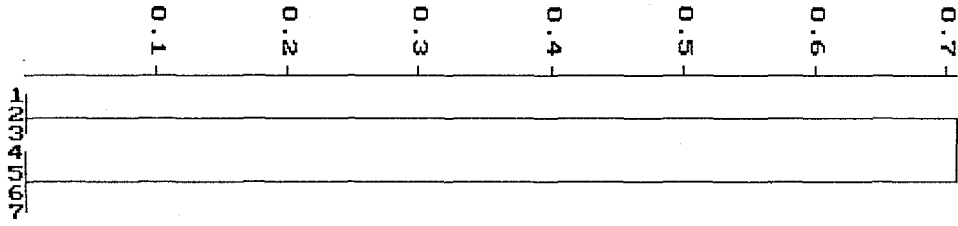
Hat 7: *H. lazulina* 3

Hat 8: DNA Ladder Plus

Tablo 4.5. Şekil 4.9.'daki *Hyacinthella* tür ve bireylerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. lin4: *H. lineata* 4, lin3: *H. lineata* 3, lin1: *H. lineata* 1, lin5: *H. lineata* 5, laz2: *H. lazulina* 2, laz1: *H. lazulina* 1, laz3: *H. lazulina* 3

İncelenen Tür İsimleri	lin4	lin3	lin1	lin5	laz2	laz1	laz3
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	0	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1



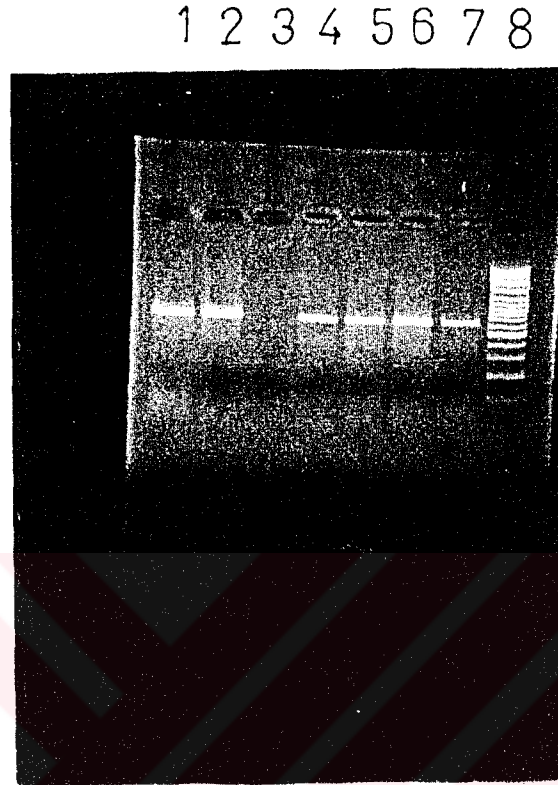


Şekil 4.10. Şekil 4.9'daki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. lineata* 4
2. *H. lineata* 3
3. *H. lineata* 1
4. *H. lineata* 5
5. *H. lazulina* 2
6. *H. lazulina* 1
7. *H. lazulina* 3



4.6. RAPD-PCR aracılığı ile *H. hispida*, *H. campanulata*, *H. lazulina* ve *H. heldreichii* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar



Şekil 4.11. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-1 primeri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: *H. hispida* 1

Hat 2: *H. campanulata* 1

Hat 3: *H. campanulata* 4

Hat 4: *H. campanulata* 2

Hat 5: *H. lazulina* 2

Hat 6: *H. lazulina* 1

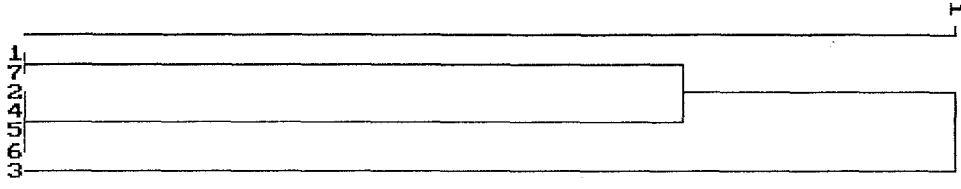
Hat 7: *H. heldreichii* 2

Hat 8: DNA Ladder

Tablo 4.6. Şekil 4.11.'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. his1: *H. hispida* 1, cam1: *H. campanulata* 1, cam4: *H. campanulata* 4, cam2: *H. campanulata* 2, laz2: *H. lazulina* 2, laz1: *H. lazulina* 1, hel2: *H. heldreichii* 2

İncelenen Tür İsimleri	his1	cam1	cam4	cam2	laz2	laz1	hel2
Bantların varlığı veya yokluğu	1	1	0	1	1	1	1
	0	1	0	1	1	1	0



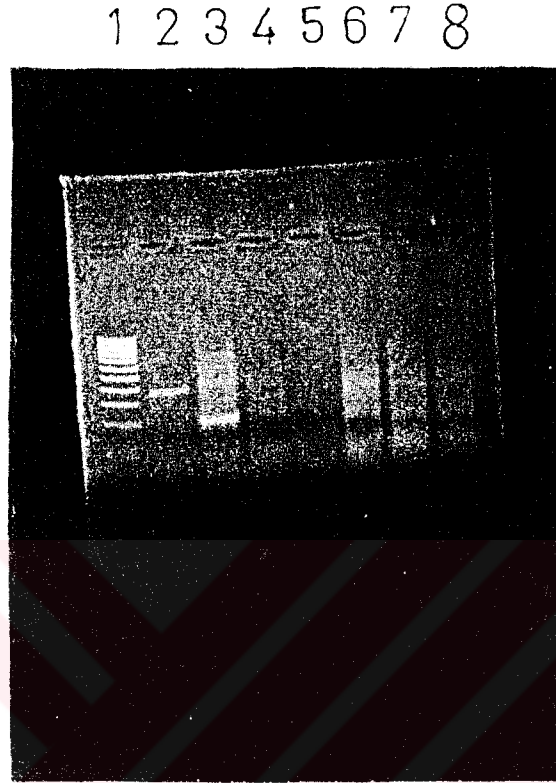


Şekil 4.12. Şekil 4.11'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. hispida* 1
2. *H. campanulata* 1
3. *H. campanulata* 4
4. *H. campanulata* 2
5. *H. lazulina* 2
6. *H. lazulina* 1
7. *H. heldreichii* 2



4.7. RAPD-PCR aracılığı ile *H. heldreichii*, *H. campanulata*, *H. lazulina*, *H. glabrescens* ve *H. hispida* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar



Şekil 4.13. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-5, O-2 primerleri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: DNA Ladder

Hat 2: *H. heldreichii* 3

Hat 3: *H. campanulata* 1

Hat 4: *H. lazulina* 5

Hat 5: *H. lazulina* 6

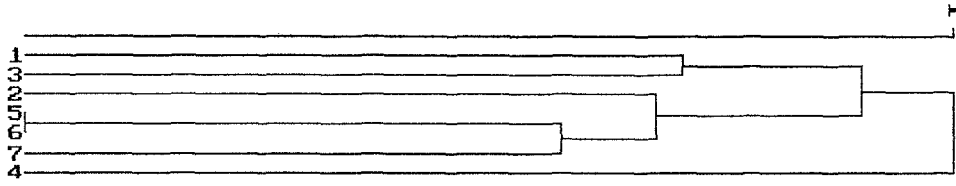
Hat 6: *H. glabrescens* 3

Hat 7: *H. glabrescens* 2

Hat 8: *H. hispida* 2

Tablo 4.7. Şekil 4.13.'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. hel3: *H. heldreichii* 3, cam1: *H. campanulata* 1, laz5: *H. lazulina* 5, laz6: *H. lazulina* 6, gla3: *H. glabrescens* 3, gla2: *H. glabrescens* 2, his2: *H. hispida* 2

İncelenen Tür İsimleri	hel3	cam1	laz5	laz6	gla3	gla2	his2
Bantların varlığı veya yokluğu	0	1	0	0	1	1	0
	0	1	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	0
	0	1	1	0	1	1	1



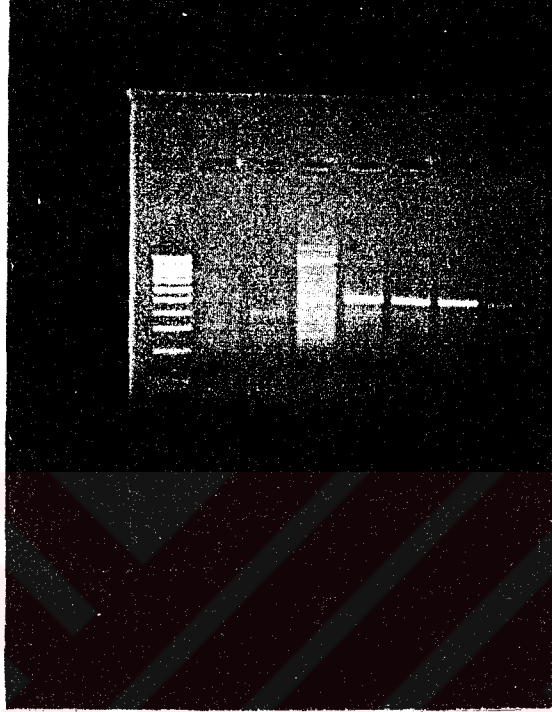
Şekil 4.14. Şekil 4.13'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. heldreichii* 3
2. *H. campanulata* 1
3. *H. lazulina* 5
4. *H. lazulina* 6
5. *H. glabrescens* 3
6. *H. glabrescens* 2
7. *H. hispida* 2



4.8. RAPD-PCR aracılığı ile *H. lazulina*, *H. hispida* ve *H. lineata* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.15. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-7 primeri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: DNA Ladder

Hat 2: *H. lazulina* 1

Hat 3: *H. hispida* 1

Hat 4: *H. lazulina* 5

Hat 5: *H. lineata* 1

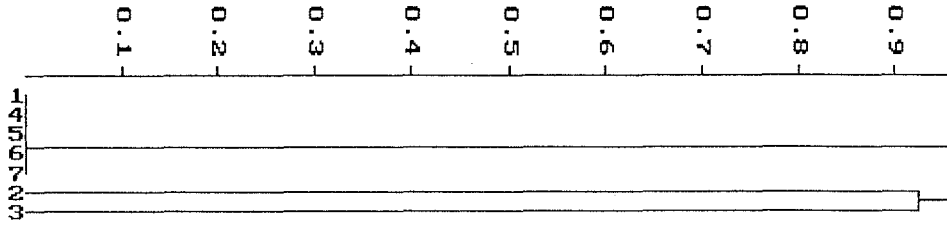
Hat 6: *H. lineata* 2

Hat 7: *H. lineata* 3

Hat 8: *H. lineata* 4

Tablo 4.8. Şekil 4.15.'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. laz1: *H. lazulina* 1, his1: *H. hispida* 1, laz5: *H. lazulina* 5, lin1: *H. lineata* 1, lin2: *H. lineata* 2, lin3: *H. lineata* 3, lin4: *H. lineata* 4

İncelenen Tür İsimleri	laz1	his1	laz5	lin1	lin2	lin3	lin4
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	1	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0
	1	0	1	1	1	1	1
	0	1	1	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0	0



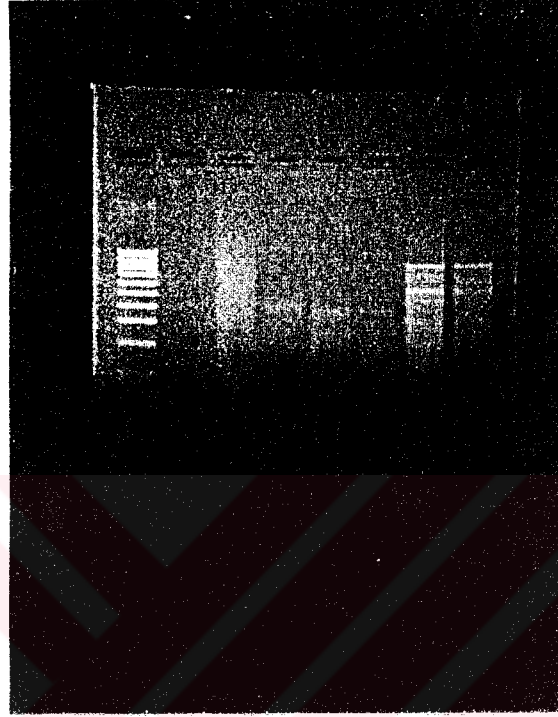
Şekil 4.16. Şekil 4.15'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. lazulina* 1
2. *H. hispida* 1
3. *H. lazulina* 5
4. *H. lineata* 1
5. *H. lineata* 2
6. *H. lineata* 3
7. *H. lineata* 4



4.9. RAPD-PCR aracılığı ile *H. heldreichii*, *H. lazulina*, *H. hispida*, *H. lineata* ve *H. campanulata* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.17. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-11, O-3 primerleri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: DNA Ladder

Hat 2: *H. heldreichii* 3

Hat 3: *H. heldreichii* 5

Hat 4: *H. heldreichii* 4

Hat 5: *H. lazulina* 4

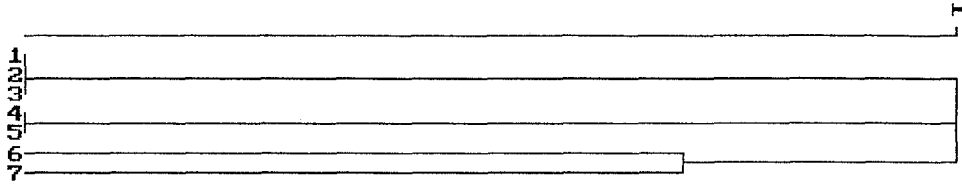
Hat 6: *H. hispida* 4

Hat 7: *H. lineata* 5

Hat 8: *H. campanulata* 4

Tablo 4.9. Şekil 4.17.'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. hel3: *H. heldreichii* 3, hel5: *H. heldreichii* 5, hel4: *H. heldreichii* 4, laz4: *H. lazulina* 4, his4: *H. hispida* 4, lin5: *H. lineata* 5, cam4: *H. campanulata* 4

İncelenen Tür İsimleri	hel3	hel5	hel4	laz4	his4	lin5	cam4
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	1	0
	1	1	1	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0



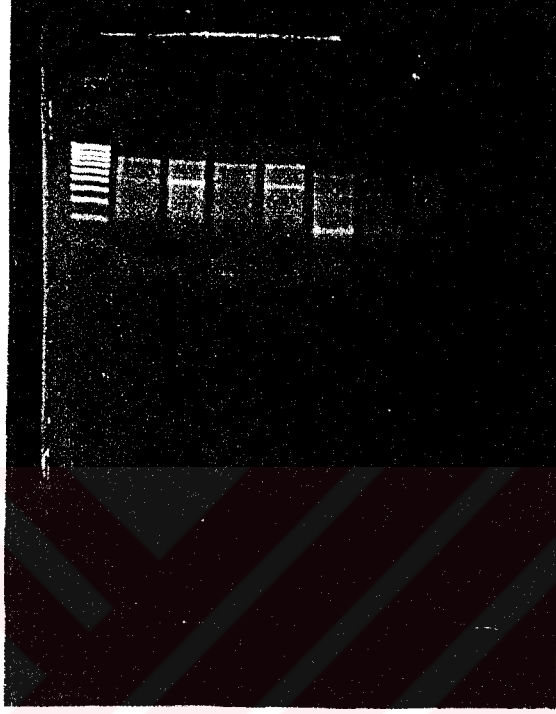
Şekil 4.18. Şekil 4.17'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. heldreichii* 3
2. *H. heldreichii* 5
3. *H. heldreichii* 4
4. *H. lazulina* 4
5. *H. hispida* 4
6. *H. lineata* 5
7. *H. campanulata* 4



4.10. RAPD-PCR aracılığı ile *H. campanulata* ve *H. lineata* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.19. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-11, O-3 primerleri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: DNA Ladder Plus

Hat 2: *H. campanulata* 3

Hat 3: *H. campanulata* 1

Hat 4: *H. campanulata* 5

Hat 5: *H. campanulata* 2

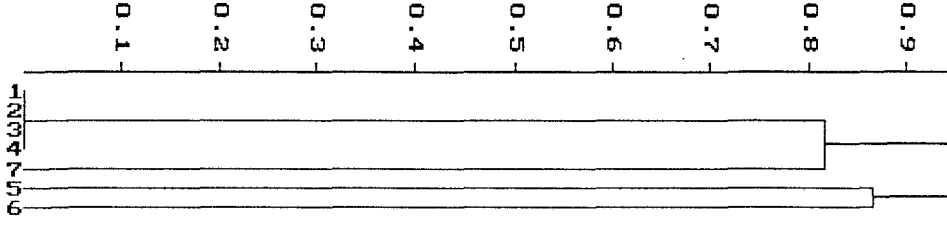
Hat 6: *H. lineata* 4

Hat 7: *H. lineata* 5

Hat 8: *H. lineata* 3

Tablo 4.10. Şekil 4.19'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. cam3: *H. campanulata* 3, cam1: *H. campanulata* 1, cam5: *H. campanulata* 5, cam2: *H. campanulata* 2, lin4: *H. lineata* 4, lin5: *H. lineata* 5, lin3: *H. lineata* 3

İncelenen Tür İsimleri	cam3	cam1	cam5	cam2	lin4	lin5	lin3
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	0	1
	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	1	1	0

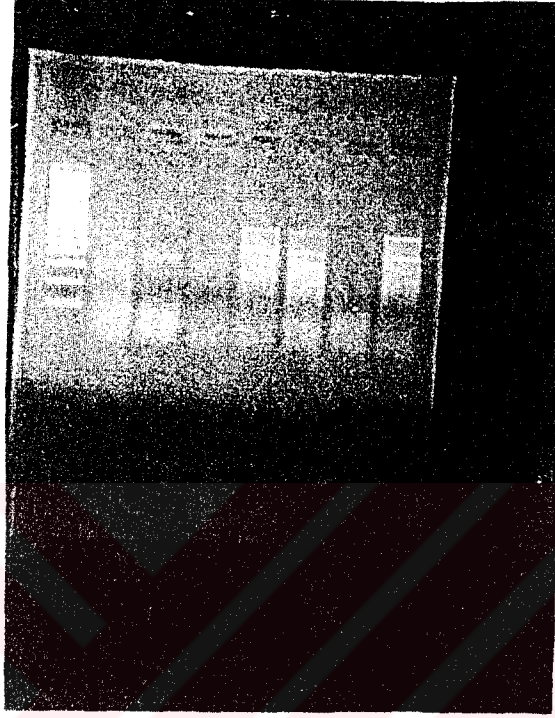


Şekil 4.20. Şekil 4.19'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. campanulata* 3
2. *H. campanulata* 1
3. *H. campanulata* 5
4. *H. campanulata* 2
5. *H. lineata* 4
6. *H. lineata* 5
7. *H. lineata* 3

4.11. RAPD-PCR aracılığı ile *H. glabrescens*, *H. hispida* ve *H. lineata* Türleri Arasındaki Genetik Uzaklıklar

1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.21. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-11, O-3 primerleri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1: DNA Ladder Plus

Hat 2: *H. glabrescens* 4

Hat 3: *H. hispida* 2

Hat 4: *H. hispida* 4

Hat 5: *H. hispida* 5

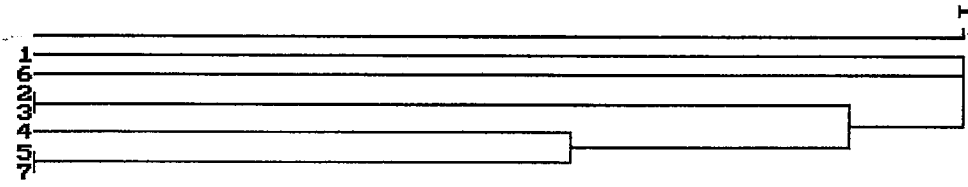
Hat 6: *H. hispida* 1

Hat 7: *H. hispida* 3

Hat 8: *H. lineata* 2

Tablo 4.11. Şekil 4.21'deki *Hyacinthella* türleri ve bireyelerine ait DNA bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları. 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir. gla4: *H. glabrescens* 4, his2: *H. hispida* 2, his4: *H. hispida* 4, his5: *H. hispida* 5, his1: *H. hispida* 1, his3: *H. hispida* 3, lin2: *H. lineata* 2

İncelenen Tür İsimleri	gla4	his2	his4	his5	his1	his3	lin2
Bantların varlığı veya yokluğu	0	0	0	1	1	0	1
	0	0	0	1	1	0	1
	0	1	1	0	1	0	1
	1	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.22. Şekil 4.21'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı

1. *H. glabrescens* 4
2. *H. hispida* 2
3. *H. hispida* 4
4. *H. hispida* 5
5. *H. hispida* 1
6. *H. hispida* 3
7. *H. lineata* 2



Bu çalışmada kullanılan *Hyacinthella* cinsi tür ve bireyelerine ait agaroz jel elektroforezinden çekilmiş fotoğrafları, DNA bantları ve bu bantların varlığı ve yokluğundan faydalanılarak syntax programı ile hazırlanmış dendrogramları sonuçlar bölümünde verilmiştir. Buna göre;

H.hispida, *H. campanulata*, *H. acutiloba* türleri O-5 primeri ile RAPD-PCR aracılığıyla amplifiye edildi (Şekil 4.1). Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.2), aynı olan bireyler arasında oldukça polimorfizm görüldü, türlerinde birbirlerine genetik bakımdan oldukça uzak olduğu görüldü. Bu primer tür ayırımı için uygundur.

H. hispida, *H. glabrescens*, *H. acutiloba* ve *H. lazulina* türleri O-5 primeri ile RAPD-PCR'a tabi tutuldu (Şekil 4.3). Syntax ile hazırlanmış bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.4), *H. hispida* ile *H. lazulina* bireyelerinden biri birbirinin aynı bulundu. *H. acutiloba* ile *H. glabrescens* de birbirinin aynı bulundu. Diğerleri genetik bakımdan birbirine oldukça uzak bulundu. Tür içinde fazla polimorfizm görüldü. Bu primer türler arası polimorfizm için uygun değildir.

Şekil 4.5 de *H.hispida*, *H. campanulata* ve *H. acutiloba* türlerinin bireyleri O-4 primeri ile RAPD-PCR ürünleri görülmektedir. Bununla ilgili bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.6), *H. hispida*'nın üç bireyi, *H. campanulata*'nın bir bireyi ve *H. acutiloba* birbirinin aynı bulunurken diğer bireylerle genetik bakımdan oldukça uzak olduğu görüldü. Bu primer *H. hispida*'ya özgü bir primerdir. *H. hispida*'da tür içi polimorfizm az olduğu görüldü.

H. glabrescens, *H. acutiloba*, *H. hispida* türleri O-4 primeri ile RAPD-PCR'ı yapıldı (Şekil 4.7). Şekil 4.8'deki bu primerle yapılan dendrograma göre *H. glabrescens*'in iki bireyi ve *H. acutiloba* birbirinin aynı, diğerleri birbirine genetik bakımdan uzak bulundu. *H. glabrescens*'de tür içi polimorfizm az olduğu görüldü. Bu primer türlerin ayırımı için uygundur.

Şekil 4.9’da *H. lineata*’nın dört bireyi ile *H. lazulina*’nın üç bireyinin O-4 primeri ile RAPD-PCR ürünleri görülmektedir. Şekil 4.10’deki bu primerle yapılan dendrograma göre *H. lineata*’nın üç bireyi genetik uzaklıklarına bakıldığında birbirinin tamamen aynı olduğu görüldü, fakat *H. lineata* türünün bir bireyi diğer bireylere genetik olarak uzak olduğu görüldü. *H. lazulina* bireyleri ise genetik olarak birbirinin aynı bulundu. *H. lineata*’nın bir bireyi genetik olarak bakılınca daha yakın bulundu. Tür içi polimorfizm *H. lineata* ve *H. lazulina*’da az görüldü (*H. lineata* 5 hariç). Bu iki tür birbirinden bu primer ile ayrılabilir.

Şekil 4.11’de görüldüğü üzere *H. hispida*, *H. campanulata*, *H. lazulina* ve *H. heldreichii* türleri O-1 primeri ile RAPD-PCR’a tabi tutuldu. Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.12), *H. hispida*’nın *H. heldreichii*’nin bir bireyi ile benzer görüldü. *H. campanulata* bireylerinin genetik uzaklıkları sıfır bulundu. Bunlara en uzak *H. campanulata* 1 bireyi bulundu. *H. lazulina* bireyleri ise genetik olarak bakılınca *H. campanulata* bireyelerine daha yakın bulundu. Türler arası polimorfizmin az tür içi polimorfizmin fazla olduğu görüldü.

H. heldreichii, *H. campanulata*, *H. lazulina*, *H. glabrescens* ve *H. hispida* türleri O-12, O-2 primerleri ile multipleks PCR (birden fazla primerin aynı anda kullanılması) ile amplifiye edildi (Şekil 4.13). Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.14), *H. glabrescens* bireyleri birbirinin aynı bulunurken *H. glabrescens* bireyleri ile *H. hispida* arasında genetik bakımdan diğerlerine nazaran daha az uzak olduğu görüldü. Diğer bireyler birbirlerine genetik bakımından uzak bulundu. *H. glabrescens*’de tür içi polimorfizm görülmedi.

H. lazulina, *H. hispida*, *H. lineata* türlerinin bireyleri O-7 primeri ile amplifiye edildi (Şekil 4.15). Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.16), *H. lazulina*’nın bir bireyi *H. lineata*’nın dört bireyi ile birbirinin aynı bulunurken, diğer bireyler arasında genetik bakımından oldukça uzak olduğu görüldü. Türler arası ve tür içi polimorfizmin az olduğu görüldü (*H. hispida* ve *H. lazulina* hariç).

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi *H. heldreichii*, *H. lazulina*, *H. hispida*, *H. lineata* ve *H. campanulata* türlerinin bireyleri O-11, O-3 primerleri ile multipleks PCR ile amplifiye edildi. Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.18), *H. heldreichii*'nin üç bireyi de birbirinin aynı, *H. lazulina* ve *H. hispida* birbirinin aynı, *H. lineata* ve *H. campanulata* diğerlerine nazaran birbirlerine genetik bakımdan biraz daha uzak olduğu görüldü. Bu gruplar birbirlerine oldukça uzak bulundu. Türler arası polimorfizm görülürken tür içi polimorfizm görülmedi. Bu primer *H. lazulina* ve *H. hispida* hariç türler arası polimorfizm için uygundur.

H. campanulata ve *H. lineata* türlerinin bireyleri O-11, O-3 primerleri ile multipleks PCR ile amplifiye edildi (Şekil 4.19). Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.20), *H. campanulata*'nın dört bireyi tamamen birbirlerinin aynı, *H. lineata* ile birbirinden genetik bakımdan uzak olduğu görüldü. *H. lineata*'nın kendi bireylerinin de birbirlerine oldukça uzak bulundu. *H. lineata*'da tür içi polimorfizm fazla görülürken *H. campanulata*'da tür içi polimorfizm görülmedi.

H. glabrescens, *H. hispida* ve *H. lineata* türleri O-11, O-3 primerleri ile multipleks PCR yapıldı (Şekil 4.21). Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4.22), *H. glabrescens* ile *H. hispida* bireyleri birbirlerine oldukça uzak görülürken *H. hispida* bireyleri arasında çok az da olsa genetik bakımdan uzak olduğu görüldü. *H. hispida* bireylerinden biri *H. lineata* ile aynı bulundu. Türler arası ve tür içi polimorfizm görüldü. Bu primer sistematik açıdan uygun değildir. Yapılan çalışmanın sistematik açıdan bitki türlerini ayırmada kullanılacak en uygun primer O-1 bulundu. Sistematik çalışmalar açısından daha etkili ayırım yapılabilmesi rRNA genlerine uygun primerler sentezlenerek ribotiplendirme daha uygun olacaktır. Türler arası ve tür içi polimorfizmin detaylı olarak belirlenmesi için daha fazla sayıda primer kullanılmalıdır.

Çalışmamızda *Hycinthella* türleri arasındaki genetik uzaklıkların bulunmasına çalışıldı. Bazı primerlere göre türün bireyleri genetik bakımdan birbirinin aynı bulunurken bazı primerlere göre de bazı türlerin bireyleri arasında oldukça

polimorfizm görüldü. Örneğin, *H. hispida*, *H. lineata* ve *H. glabrescens* bireyleri arasında oldukça polimorfizm görüldü.



5. KAYNAKLAR

- Al-Janabi, S.M., Honeycutt, R.J., McClelland, M., Sobral, B.W.S. 1992. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* "SES 208". *Plant Genome Abstracts* Vol. 31, San Diego, CA.
- Andersen, W.R., Fairbanks, D.J. 1990. Molecular Markers: Important Tools for Plant Genetic Resource Characterization. *National Plant Genetic Resources Board* Vol. 6 pp. 51-53.
- Bailey, E., Lear, T. L. 1994. Comparison of Thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers. *Animal Genetics* 25: 105-108.
- Black IV, W.C., DuTeau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R., Pettorini, J.M. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.
- Carlson, J.E., Tusieran, L.K., Glaubitz, J.C., Luk, V.W.K., Kauffeldt, C., Rutledge, R. 1991. Segregation of random amplified polymorphic DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor. Appl. Genet* Vol. 83, pp. 194-200.
- Chapparo, J., Wilcox, P., Grattapaglia, D., O'Malley, D., McCorld, S., Sederoff, R., McIntyre, L., Whetten, R. 1992. Genetic mapping of pine using RAPD markers: construction of a 191-marker map and development of half-sib genetic analysis, *Advances in Gene Technology: Feeding the world in the 21st century*, Miami Winter Symposium, Miami, FL.
- Davis, P.H. 1965. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Vol. 8 Edinburgh at the University Press.
- Davis, P.H. 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Vol. 10 Supplement, University Press, Edinburgh.
- Deregon, J.M., Landry, B. S. 1992. RAPD and Other PCR-based Analyses of Plant Genomes Using DNA Extracted from Small Leaf Disks. *Research* 1: 175-180.

- Ecth, C.S., Erdahl, L.A., McCoy, T.J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84-87.
- Gandeboeuf, D., Dupre, C., Roeckel-Drevet, P., Nicolas, P., Chevalier, G. 1997. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Can. J. Bot.* 75: 36-45.
- Hickey, M., King, C. 1997. *Common Families of Flowering Plants*, pp. 312-314, Cambridge University Press, United Kingdom.
- Hu, J., Quiros, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports* 10 : 505-511.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. pp. 3-11.
- Klein-Lankhorst, R.M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska T. And Zabel, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet* Vol. 83, pp. 108-114.
- Kumar, R. 1989. The Technique of Polymerase Chain Reaction. *Technique A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology* Vol. 1, No 3. pp. 133-152.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, C. 1989. *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. New York.
- McDonald, M. B., Elliot, L. J., Sweeney, P. M. 1993. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Sci. & Technol* 22: 171-176.
- Persson, K., Wendelbo, P. 1982. Taxonomy and cytology of the genus *Hyacinthella* (*Liliaceae-Scilloideae*) with special reference to the species in S.W. Asia. Part II. *Botaniques De Geneve* Technique Technique Vol:37 (1), p.p. 157-175.
- Persson, K., Persson, J. 1992. A new species and additional chromosome counts of *Hyacinthella* in Turkey. *Nord. J. Bot.* 12: 615-620.
- Reiter, R.S., Williams, J.G.K., Feldmen, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., Scolnik, P.A. 1992ç. Global and local-genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by

- using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci. USA* Vol. 89, pp. 1477-1481.
- Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J., Bousquet, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 173-180.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H. Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. Vol. 239, pp. 487-491.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. and Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in Plant breeding new tools for and old science. *Biotechnology*. Vol. 7, pp. 257-264.
- Turgut, K. 1994. The Use of Polymerase Chain Reaction in *Brassica napus* Transformation Studies. *Tr. J. of Biology* 20: 115-120.
- Weining, S., Langridge, P. 1991. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 82: 209-216.
- Welsh, J., Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* Vol. 18, pp. 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.G., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* Vol. 18, pp. 6531-6535.
- Wolff, K., Van Rinj, J. P. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71: 335-341.