

ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZİNCAN İLİNDE ENDEMİK OLARAK YETİŞEN VE YOK
OLMA TEHLİKESİNDE OLAN *Sonchus erzincanicus* TÜRÜNÜN
POPULASYON GENETİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI VE KORUMA STRATEJİLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Pınar KURT

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2015

Her Hakkı Saklıdır

Doç.Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN danışmanlığında, Pınar KURT tarafından hazırlanan bu çalışma 10/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza:



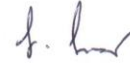
Üye : Doç.Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

İmza:



Üye : Yrd.Doç. Dr. Serap SUNAR

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Ali SÜLÜN

Enstitü Müdürü Y.

ÖZET

Yüksek Lisans

ERZİNCAN İLİNDE ENDEMİK OLARAK YETİŞEN VE YOK OLMA TEHLİKESİNDE OLAN *Sonchus erzincanicus* TÜRÜNÜN POPULASYON GENETİĞİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI VE KORUMA STRATEJİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Pınar KURT

Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Bu çalışma, Erzincan ilinde doğal yayılış gösteren endemik ve yok olma tehlikesinde olan *S. erzincanicus* türünün Ekşisu, Beşsaray ve Saztepe populasyonlarının RAPD yöntemi ile populasyon genetiğinin belirlenmesi ve elde edilen veriler ile türün korunmasına yönelik koruma stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, Popgene Version 1.32 istatistik programı ile analiz edilmiştir. Populasyon içi değerlendirmeler Jaccard (1908)'in benzerlik indeksine göre, populasyonlar arası değerlendirmeler SPSS V.16 ile hesaplanmış, UPGMA yöntemi ile dendrogramlar hazırlanmıştır. 16 RAPD primeri kullanılmış ve 250- 3000 bp büyüklüğünde 125 bant elde edilmiştir. Populasyonlar arasında polimorfizm oranı en fazla olan Beşsaray (%84,80), en az olan ise Ekşisu populasyonudur (%58,40). Genetik mesafe değerlerine göre birbirine en yakın populasyonlar Beşsaray ve Ekşisu ($D= 0,9671$), birbirine en uzak populasyonlar ise Ekşisu ve Saztepe ($D= 0,0639$)'dir. Populasyonlar arasındaki gen akışı (Nm) 1,71, genetik farklılaşma değeri (Gst) 0,127 olarak hesaplanmıştır. Başta Ekşisu populasyonu olmak üzere *S. erzincanicus* türünün Erzincan ilinde yetişmekte olduğu tüm populasyonların öncelikli olarak in-situ ve daha sonra ex-situ olarak korunmasının gerektiği saptanmıştır.

2015, 44 sayfa**Anahtar Kelimeler:** Endemik, Koruma genetiği, RAPD, *Sonchus erzincanicus*

ABSTRACT

Master Thesis

THE MOLECULAR RESEARCH AND DEVELOPING PROTECTION STRATEGIES FOR POPULATION GENETICS OF *Sonchus erzincanicus*, A SPECIES LIVING ENDEMICALLY IN ERZINCAN AND ON THE EGDE OF EXTINCTION

Pınar KURT

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

This study was carried out so that the population genetics of the population of Ekşisu, Beşsaray and Saztepe of *S. erzincanicus* – a species that is on edge of epidemic and extinction in Erzincan province using molecular methods and so that strategies can be developed in order to preserve the species with the data collected. The data collected were analysed using Popgene Version 1.32 statistics program. The intra-population assessment was done according to Jaccard (1908), the intra-population assessment was calculated using SPSS V.16, dendrograms were prepared using UPGMA method. 16 RAPD primer were used and 125 bands at a size of 250-300 bc were obtained. Beşsaray (84.80%) returned the most polimorfizm rate among the populations while Ekşisu returned the least (58.40%). The closest populations according to genetic distance values are Beşsaray and Ekşisu ($D=0.9671$) and the farthest populations are Ekşisu and Saztepe ($D=0.0639$). The gene flow between populations (Nm) was calculated as 1,71 while genetic differentiation (Gst) was calculated as 0.127. It was determined that all populations living in Erzincan province, being Ekşisu population primarily, must be preserved as in-situ – in the first place – and ex-situ, in the latter phase.

2015, 44 pages**Keywords:** Conservation genetic, Endemic, RAPD, *Sonchus erzincanicus*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen bilgi ve tecrübelerinden her fırsatta istifade ettiğim, tezimin her aşamasında bana yol gösteren ve yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bitkilerin araziden temin edilmesini sağlayan Yrd. Doç. Dr. Etem OSMA'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Mehmet KUZUCU'ya ve yüksek lisans öğrencisi Hüseyin Özkan CANÇELİK'e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca hayatımın her alanında bana destek olan aileme ve eşim Kemal KURT'a teşekkür ederim.

Pınar KURT

Temmuz , 2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	9
2.1. Moleküler Markırlar	9
2.1.1. Moleküler markırların özellikleri	9
2.1.2. Hibridizasyona dayalı moleküler markırlar	10
2.1.2.a. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/ Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi	10
2.1.3. PCR yöntemine dayalı bazı moleküler markırlar	11
2.1.3.a. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA/Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemi.....	12
2.1.3.b. SSR (Single Sequence Repeat/Basit Dizi Tekrarları) yöntemi.....	14
2.1.3.c. ISSR (Inter-Simple Sequences Repeats/Basit Dizi Tekrar Arası) yöntemi.....	15
2.1.3.d. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi	16
2.1.3.e. SCAR (Sequence Characterized Amplified Region/Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler) yöntemi.....	17
2.1.3.f. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence/ Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi) yöntemi	17
2.1.3.g. SNP (Single Nucleotide Polymorphism/ Tek Nükleotit Polimorfizmi) yöntemi	17
2.1.3.h. DAF (DNA Amplification Fingerprinting/DNA Çoğaltımlı Parmakizi) yöntemi	18
2.1.3.i. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism/ Çoğaltılan Sekans Polimorfizmi) yöntemi:.....	18
2.2. Genetik Polimorfizm.....	18
2.3. Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal	21
3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	21

3.1.3.Kullanılan çözeltiler	22
3.1.3.a.Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	22
3.1.3.b. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan çözeltiler	23
3.2.Yöntem.....	24
3.2.1. Populasyonların örneklenmesi.....	24
3.2.2. DNA izolasyonu	24
3.2.3. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler	25
3.2.4. RAPD-PCR protokolü	26
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	30
4.1. Saztepe Populasyonunda RAPD Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar	30
4.2. Beşsaray Populasyonunda RAPD Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar	31
4.3. Ekşisu Populasyonunda RAPD Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar	33
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	37
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	45

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

dk	Dakika
g	Gram
m	Metre
µl	Mikrolitre
µM	Mikrogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
sn	Saniye
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan Parça Uzunluğu Polimorfizmi)
bç	Baz Çifti
BÇS	Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi
C-EN	Critically Endangered (Yüksek Derecede Tehlikede)
CR	Critically Endangered (Kritik Tehlikede)
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
DSİ	Devlet Su İşleri
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EN	Endangered Nesli Tehlike Altında Olan Türler
EX	Nesli Tükenmiş Türler
Gst	Genetik Farklılaşma Değeri
H	Nei'nin Genetik Çeşitliliği (1972)
Hs	Beklenen Heterozigotluk Oranı
I	Shannon İnförmasiyon İndeksi
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrar Arası)
IUCN	International Union for the Conservation of Nature (Uluslar arası Doğayı Koruma Birliği)
n	Döngü Sayısı
N _a	Gözlenen Allel Sayısı
N _e	Etkili Allel Sayısı

Nm	Populasyonlar Arasındaki Gen Akışı
P	Polimorfik Lokus Sayısı
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PVP	Polyvinylpyrrolidone
R	Rarely (Nadir Bulunan)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş Parça Uzunluğu Farklılığı)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi
SSR	Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar ve Geliştirmeler Genel Müdürlüğü
TBE	Tris-Borat-EDTA Tamponu
Tris-HCl	Tris-Hidroklorür
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu)
v/v	Hacim / Hacim
w/v	Ağırlık / Hacim
UV	Ultraviyole
VU	Vulnerable (Zarar Görebilir)

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Kullanılan araç, gereçler ve markaları	21
Tablo 3.2. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler, nükleotid dizileri ve Tm değerleri	26
Tablo 3.3. RAPD- PCR çoğaltma ögeleri konsantrasyon ve miktarları.....	27
Tablo 4.1. Çalışılan populasyonlara ait populasyon için gözlenen allel sayısı, etkili allel sayısı, Ne'nin genetik çeşitliliği, Shannon's bilgi indeksi, polimormik lokus sayısı, % polimorfizm.....	35
Tablo 4.2. <i>S. erzincanicus</i> populasyonları arasındaki benzerlik indeksi.....	35

ŞEKİLLERİN LİSTESİ**Sayfa**

Şekil 1.1. <i>S. erzincanicus</i> 'un genel görünümü (http://www.dogadernegi.net/).....	2
Şekil 3.1. <i>S. erzincanicus</i> toplanan lokaliteler	24
Şekil 4.1. Saztepe popülasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genotipik bağlantı.....	30
Şekil 4.2. Beşsaray popülasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genotipik bağlantı.....	32
Şekil 4.3. Beşsaray popülasyonuna ait A1 primeri ile elde edilen RAPD profili	33
Şekil 4.4. Ekşisu popülasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genotipik bağlantı ..	34
Şekil 4.5. Nei (1972)'ye göre <i>S. erzincanicus</i> popülasyonları arasındaki genotipik bağlantı.....	36

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. Saztepe populasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi	31
Çizelge 4.2. Beşsaray populasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi	32
Çizelge 4.3. Ekşisu populasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi	34

1. GİRİŞ

Türkiye, coğrafi konumu, iklimsel özellikleri ve fiziki özelliklerinden dolayı oldukça zengin bir floraya sahiptir. Ülkemizde endemik bitki türü sayısı yaklaşık olarak % 33,5'dir. En fazla endemik türe sahip olan familya *Asteraceae* familyasıdır. *Asteraceae* familyasına ait endemizm oranı % 38'dir (Kaya ve Aksakal, 2005).

Sonchus L. cinsi, *Asteraceae* familyasına aittir. Bu cins, Orta Amerika ve Güney Amerika dışında dünyada geniş bir dağılıma sahiptir (Leventer, 2012). *Sonchus* cinsinin Avrupa florasında 14 taksonu bulunmaktadır. Bu taksonlar, *S. asper* (L.) Hill subsp. *asper*, *S. asper* (L.) Hill subsp. *glaucescens* (Jordan) Ball, *S. tenerrimus* L., *S. oleraceus* L., *S. maritimus* subsp. *maritimus*, *S. maritimus* subs. *aquatilis* (Pourret) Nyman, *S. palustris* L., *S. crassifolius* Pourret ex Willd, *S. arvensis* L. subsp. *arvensis*, *S. arvensis* L. subsp. *uliginosus* (Bieb.) Beg, *S. postulatus* L. 'tur. Ülkemizde ise *Sonchus* L. cinsi , *S. maritimus* L., *S. asper* (L.) Hill subsp. *glaucescens* (Jordan) Ball, *S. arvensis* L. subsp. *arvensis*, *S. arvensis* L. subsp. *uliginosus* (Bieb.) Beg, *S. tenerrimus* L., *S. oleraceus* L., *S. palustris* L. ve *S. erzincanicus* Matthews taksonları ile temsil edilmektedir (Davis vd., 1975). *Sonchus* L. cinsine ait genel morfolojik özellikler; tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık bitkilerdir. Gövde yaprakları genellikle gövdeyi sarıcı, tamdan pinnatifite, sapsız ve dikencikli-dişlidir. Kapitula ligulat, involukrum testi-çansı ya da silindirik şekilde; brakteler imbrikat, çok sıralıdır. Reseptakulum çıplak ve çukurlu yapıda, akenler obovat veya oblanseolat, tüysüz, yassı, her yüzü 1-5 damarlı, gagasızdır. Papus tüyleri 2 sıra halinde, beyaz, ince sert kıllar ve daha ince damarsı kıllar ile kaplıdır (Davis, 1975).

S. erzincanicus'un genel görünümü Şekil 1.1'de verilmektedir. Bitkinin Cronquist Sistemi'ne göre bitkiler alemindeki yeri aşağıdaki şekildedir.

Regnum	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida (dicotyledons)
Subclass	: Asteridae
Order	: Asterales
Family	: Asteraceae
Genus	: <i>Sonchus</i> L.
Species	: <i>S. erzincanicus</i> Matthews



Şekil 1.1. *S. erzincanicus* 'un genel görünümü (<http://www.dogadernegi.net/>)

S. erzincanicus türü, çok yıllık, otsu, ortalama 130 cm boyunda; kapitula 1,5-2 cm genişliğinde; akenlerin her bir yüzü 1-2 damarlı, alt yapraklar rozet, dikdörtgen, eliptik şekilli, tüylü ve dikenlidir. Yaprak sapı parlak sarı, akenler 3-4 mm, hafif dışı kıvrıktır. Ayrıca çiçeklenme dönemi Haziran - Eylül aylarıdır.

S. erzincanicus türünün yetiştiği ortamlar; yerleşim yerleri, tarım alanları, meralar, mesire alanları, atık alanları ve yol kenarlarıdır. Ancak tür, bu ortamların içerdiği

risklerden dolayı sınırlı bir alanda küçük populasyonlar halinde bulunmaktadır. Erzincan çevresinde Kova olarak adlandırılan *Junchus heldreichianus* subsp. *orientalis* bitkisi ile oluşturulan torf içinde yaşamaktadır. *J. heldreichianus* subsp. *orientalis* bitkisi Erzincan Ovasında yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bitki, *S. erzincanicus*'un alt yapraklarını güneşin zararlı etkisinden koruduğu, topraktaki organik madde miktarını artırdığı ve topraktaki nem oranını belirli oranda tuttuğundan, *S. erzincanicus* için uygun bir yaşam ortamı sağlamaktadır (Aslay ve Kandemir, 2009).

S. erzincanicus türü endemik bir tür olup dünyada sadece Erzincan da sınırlı bir alanda yayılış göstermektedir. 1957 yılında Erzincan Ovası'nın doğusunda, hafif tuzlu bataklıklardan toplanan *Sonchus* cinsine ait örneklerin yeni bir tür olduğu belirlenmiştir. Tür, 1974 yılında *S. erzincanicus* Matthews olarak bilim dünyasına tanıtılmıştır (Davis, 1975). *S. erzincanicus* türü, Erzincan da taban suyunun çok yüksek olmadığı, nemli topraklarda yetişmektedir. Tür, hafif tuzlu, kuvvetli alkali, yoğun killi, kireçli ve organik madde bakımından zengin ortamlarda yetişmektedir. Ayrıca tür, hafif bazik ve düşük organik madde içeren topraklarda da zaman zaman yetişebilmektedir. Ancak türün, toprak neminin düşük olduğu ortamlarda yavaş geliştiği görülmüştür (Kandemir vd., 2006). Tür 2004 yılında yeniden tespit edilmiştir (Özhatay, 2006). Kurutma çalışmaları, bilinçsiz ve aşırı otlatma, yaşam alanlarının tahrip edilmesi gibi nedenlerden dolayı yok olma tehlikesi altındadır. Avrupa Yaban Hayatını Koruma Sözleşmesinde (Bern Sözleşmesi) de belirtildiği şekilde, küresel ölçekte korunması gereken türler arasında yer almaktadır (Özhatay vd., 2005).

Türün yaşam alanlarından biri olan Ekşisu Sazlığı ve çevresinde DSİ tarafından yapılan kurutma çalışmaları ve aşırı otlatma ile tür de, birey sayısında azalma, gelişiminde yavaşlama ve morfolojik olarak farklılıklar meydana gelmiştir. Belirtilen nedenlerden dolayı türün yaşama şansı azalmış ve zaman içerisinde alanda yok olmuştur. Bu da biyolojik çeşitliliğin zarar görmesine ve tür populasyonları arasındaki bağlantının kopmasına, türe ait populasyonlar arasındaki genetik

çeşitliliğin azalmasına neden olmuştur (Aslay ve Kandemir, 2009). *S. erzincanicus*'un IUCN tehdit kategorisi Endangered (EN) dir (Ekim vd., 2000; Özhatay, 2006).

Yapılan çalışmalar ve gözlemler sonucunda gelecek beş yıl içinde türe ait popülasyonun birey sayısında en az % 85 oranında azalma olacağı ve bunun sonucunda türün yeni IUCN kategorisinin Critically Endangered olabileceği düşünülmektedir (Aslay ve Kandemir, 2009).

Biyolojik çeşitlilik, yeryüzündeki tüm canlı organizmaları, onların yaşam alanlarını ve genlerini kapsadığından zaman içerisinde maruz kalacağı etkiler dolaylı olarak bütün türleri etkileyecektir. *S. erzincanicus* türünün doğal yaşam ortamında azalması ya da zaman içerisinde yok olması bağlantılı olduğu türleri de etkileyerek biyolojik çeşitliliğin ve genetik çeşitliliğin azalmasına neden olacaktır.

Yeryüzündeki biyolojik çeşitlilik, nüfus artışının etkisiyle tahrip olmakta ve hızla yok olmaktadır. Bu da genetik çeşitliliğin azalmasına ve yok olmasına neden olmaktadır. Habitat parçalanmaları ve habitat tahribatları ile çevre kirliliği de biyolojik çeşitlilik için tehlike oluşturmaktadır (Frankman, 2003).

Biyolojik çeşitlilik; genetik çeşitlilik ve ekolojik çeşitlilikten oluşmaktadır. Genetik çeşitlilik, bir türe ait kalıtsal bilginin çeşitliliğidir ve canlının çevreye uyumunda önemli bir faktördür. Ekolojik çeşitlilik ise, belirli bir alanda bulunan ekosistemler ve tür sayısıdır. Bir tür topluluğundaki tür sayı arttıkça tür çeşitliliği de artmaktadır (Kence, 2005).

Biyolojik çeşitlilik, genetik çeşitliliğe bağlıdır ve genetik çeşitlilik kaybedildiğinde zaman içerisinde biyolojik çeşitlilik de yok olacaktır (Klug *et al.*, 2011). Böylece Uluslararası düzeyde farkındalığı artırarak tüm dünya ülkeleri tarafından kabul

edilmiş olan Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi (BÇS) ile genetik kaynakların korunması konusu küresel boyutta değerlendirilmiştir (TAGEM, 2009).

Biyolojik çeşitlilik ülkelerin en önemli doğal kaynaklarından birisidir. Biyolojik çeşitliliğin korunmasında önemli olan ekosistemlerin korunmasıdır. Bu korumada, ekosistemlerin değerlendirilmesi, sürdürülebilirliğinin sağlanması ve kayıt altına alınması ile toplumun bu kaynakların korunması konusunda bilinçlendirilmesi en önemli adımlardır (Anonim, 2003).

Biyolojik çeşitliliğin korunması çalışmaları, dünyanın birçok yerinde koruma alanların oluşturulmasını sağlamıştır. Koruma alanları, biyolojik çeşitliliğin korunmasında ve sürdürülebilirliğinin sağlanmasında büyük öneme sahiptir (Putz vd., 2001).

Son yıllarda toprak, su ve havanın yanı sıra genetik kaynaklar da temel doğal kaynaklar arasında sayılmaktadır (Karagöz vd., 2010). Genetik kaynakların korunması konusu ise günümüzün öne çıkan konularından biridir (TAGEM, 2009). Genetik kaynaklar, canlıların gelişiminde etkili olan genleri içerir. Bu yönüyle bitki ıslahı çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle ülkelerin mevcut genetik kaynaklarını koruması gerekmektedir (Karagöz vd., 2010).

Genetik çeşitliği fazla olan türler farklı çevre şartlarına başarılı bir şekilde uyum yapma özelliğine sahiptir. Bu türler aynı zamanda değişen insan ihtiyaçlarını karşılamada daha başarılıdır (Aka, 2005).

Genetik çeşitlilik, türlerin hayatlarını devam ettirmelerinde ve adaptasyon yapmalarında son derece önemlidir. *S. erzincanicus* gibi nesli tükenme tehlikesinde olan türler tekrar genetik çeşitlilik oluşturamayabilirler. Özellikle izole olmuş küçük populasyonlar genetik etkilere karşı daha duyarlıdırlar (Klug *et al.*, 2011).

Türlerin doğada bulunma durumlarına göre sınıflandırılmasında; nesli tükenmiş olanlar (EX), nesli tükenme tehlikesi taşıyan türler (EN), kaybolma eğiliminde olan türler (VU), nadir olarak bulunan türler (R), tanımlanmamış türler, durumu bilinmeyen türler ve tehlike altında olmayan türler olarak gruplandırılmaktadır.

IUCN, Uluslararası Doğayı Koruma Birliği kriterlerine göre; türe ait birey sayısında, son 100 yılda %10 oranında azalma varsa “Düşük derece tehlike altında (“V” Vulnerable)”, son 20 yılda %20 oranında azalma varsa “Orta derece tehlike altında (“EN” Endangered), son 10 yılda %50 oranında azalma varsa “Yüksek derece tehlike altında (“C.EN” Critically Endangered) olarak gruplandırılmıştır. IUCN, Uluslararası Doğayı Koruma Birliğine göre; memeli türlerinin %25’i, kuşların %11’i, sürüngenlerin %20’si, damarlı bitkilerin %12’si, balıkların %30’u tehlike altındadır (Klug *et al.*, 2011). Bu türlerin doğal yaşam ortamlarının biyolojik verimliliği devam ettirecek şekilde korunması gerekmektedir.

Koruma ekolojisi, biyolojik aktivitelerin devamını sağlayacak alanların dengeli ve bilinçli kullanılması ve biyolojik kaynakların yok olmasını önleyerek gelecek nesillere aktarılmasını sağlayacak tedbirler almayı amaçlamaktadır (Öztürk vd.,1992). Koruma ekolojisi ile türlerin devamı sağlanarak gerek biyolojik çeşitliliğin ve gerekse de genetik çeşitliliğin kontrol altına alınması amaçlanmaktadır. Ayrıca biyolojik maddelerin sürekli üretiminin yanında yenilenme şansı olmayan kaynakların yok olması da engellenecektir. Amaç sadece nadir türlerin korunması değil, mevcut kaynakların düzenli kullanımını da sağlamaktır.

Koruma ise gen havuzunda mevcut genetik çeşitliliğin daha sonra kullanılmak üzere saklanmasıdır. Bu işlem her bir bitki için farklı şekillerde gerçekleştirilmektedir. Temelde iki koruma sistemi vardır. Bunlar, yerinde (in situ) ve yeri dışında (ex situ) koruma stratejileridir (Karagöz vd., 2010).

In situ koruma; doğal kaynakların, doğal yaşam ortamlarında korunmalarıdır. Bu tür koruma sisteminde, doğal yaşam ortamlarındaki populasyonlar çeşitliliğini ve yaşamını devam ettirerek yeni özellikler taşıyan bireylerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Özgen vd., 1995).

Ex situ korumada ise tohum, DNA ve çiçek tozlarının in vitro depolanması yapılmaktadır. Ayrıca botanik bahçeleri ve tarla gen bankası yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemin bitki genetik kaynaklarını korumada sıklıkla kullanılmasının en önemli nedeni, bir taksonu kendi habitatı dışında korumanın daha ucuz ve daha kolay olmasıdır (Özgen vd., 1995).

Bu yöntem ile Türkiye’de Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Tarla Ürünleri Merkezi Araştırma Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi gen bankalarında koruma çalışmaları yapılmaktadır (Kaya vd., 1997).

S. erzincanicus türü de yok olma tehlikesinde olduğundan genetik kaynaklarının uygun yöntemlerle korunması gerekmektedir. *S. erzincanicus*’ un çok sınırlı bir alanda yetişmesi ve uzun süre ortadan kaybolup son yıllarda türe tekrar rastlanmış olunması gibi nedenlerden dolayı üzerine yapılmış yeterince araştırma bulunmamaktadır. *S. erzincanicus* ile ilgili yapılan çalışmalar;

Kandemir vd. (2006), *S. erzincanicus* Matthews (Asteraceae) türünün morfolojik, anatomik ve palinolojik karakterleri ve ekolojik özelliklerinin belirlenmesi için çalışma yapmışlardır. Çalışmada, türün yaprak özellikleri, tahıl polenleri ve yaşam alanları belirlenmiştir. Yaprakların yüzey bölgeleri ve yaprak sapları enine kesitleri anatomik olarak ilk kez ortaya konmuştur.

Yiğit vd. (2006), *S. erzincanicus* türünün aerial kısmından antibakteriyel ve antikandidal aktivitelerinin belirlenmesi için çalışma yapmışlardır.

Aslay ve Kandemir (2009), *S. erzincanicus* türünün korunması için yaptıkları çalışmada, türün Erzincan Ovasındaki dağılımları, tehditleri ve bu tehditlerin etkileri belirlenmiştir. Doğal koşullarda tohumlarından çoğalamayan türün kültür ortamında üretilen fideleri doğal ortamına aktarılmıştır.

Özgen vd. (2010), *S. erzincanicus* türünün fitokimyasal özelliklerin belirlenmesi için çalışmalar yapmışlardır.

Mavi vd. (2011), *S. erzincanicus* ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada, türün metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu engelleyici aktiviteleri, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikali süpürücü etkileri ve total fenolik miktarları belirlenmiştir. Türün metanol ve su ekstraktlarının in vitro olarak lipid peroksidasyonu engelleyici olduğu ve bazı mikroorganizma türleri için antimikrobiyel etki yaptıkları tespit edilmiştir.

S. erzincanicus Erzincan ilinde endemik olarak yayılış gösteren ve nesli tükenme tehlikesinde olan bir tür olup, tür ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada; *S. erzincanicus* türünün Erzincan'da 3 farklı lokalitedeki populasyonlarının genetik çeşitliliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Moleküler Markırlar

2.1.1. Moleküler markırların özellikleri

Türlere ait genetik bilgilerin belirlenmesine dair çalışmalarda, genetik çeşitliliğin ve genetik ilişkilerin ortaya konmasında kullanılan bilgiler genellikle botanik kaynaklardan elde edilmektedir. Botanik kaynakların tercih edilmesinin nedeni güvenilirliğinin yüksek olmasıdır (Harlan and De Wet, 1973). Botanik kaynaklarda en çok tercih edilen moleküler markırlardır. Moleküler markırlar DNA kaynaklı olduğundan bitki sistematigi çalışmalarda, bitki populasyon genetiği çalışmalarda güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Bireyler arasındaki genetik farklılığın temeli gen dizilimindeki farklılıklardır. Tür içi ve türler arası genetik farklılıkların belirlenmesi bireylerin DNA'larının moleküler düzeyde karşılaştırılması ile mümkündür. Baz sıralarındaki bu farklılıkların ortaya çıkarılmasında genetik markırlar kullanılarak, bireylere ait genetik varyasyonlar belirlenebilmesi, genom haritalarının yapılması, kalıtsal hastalıkların teşhisi ve bitki ıslahı çalışmaları yapılabilmektedir.

Moleküler markırlar, DNA markırları olarak da adlandırılmaktadır. Moleküler markırlar, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili biyolojik etkisi olmayan ve nesillere aktarılan DNA parçasıdır. Moleküler markır yöntemleri DNA daki polimorfik bölgelerin belirlenmesini esas alır. Bir moleküler markırda başarılı sonuçlar alınabilmesi için, polimorfik olması, genom boyunca bulunması, kolay uygulanabilir olması, analizinin kolay olması, ortam şartlarından etkilenmemesi ve tekrarının mümkün olması gerekmektedir (Aygün, 2006).

Moleküler markırların avantajları;

- ✓ Çekirdek, kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlarından ayrı ayrı çalışılabilir,
- ✓ Genetik değişiklikleri daha çok yansıttıkları için daha az pleiotroftir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi),
- ✓ Her bir ebeveynden gelen karakterler tespit edilebilir ve bitkilerin genetik orijinine ulaşılabilir,
- ✓ Sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir (Altun, 2006).

Moleküler markırlar, hibridizasyona dayalı moleküler markırlar ve PCR temeline dayalı moleküler markırlar olarak 2'ye ayrılmaktadır.

2.1.2. Hibridizasyona dayalı moleküler markırlar

2.1.2.a. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism\Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi

RFLP markırları ilk olarak kullanılan hibridizasyona dayalı markır sistemidir. Genetik analizlerde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. RFLP yönteminde, izole edilen genomik DNA, özel enzimlerle kesilir. Bu yöntem, prop DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki farklı kesim yerlerinin saptanması esasına dayanır (Eriş ve Gülen, 2004).

Bireylere ait bantların karşılaştırılması, enzimlerle kesilen DNA'ların uzunluklarının karşılaştırılması şeklinde yapılmaktadır. DNA uzunluklarındaki farklılık polimorfizmi ortaya koymaktadır. Bu farklılıkların nedeni DNA'da meydana gelen delesyon, duplikasyon ve kromozom rekombinasyonu olabilmektedir.

RFLP analizi ile farklı çalışmalarda aynı sonuçlar alınabilmektedir. Bu yöntem, genetik harita yapımında, heterozigot bireylerin tanımlanmasında kullanılabilir. Ancak pahalı olması, fazla işgücü ve zaman gerektirmesi, radyoaktif madde

kullanılması, fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç olması RFLP yönteminin dezavantajlarından (Farooq and Azam, 2002).

2.1.3. PCR yöntemine dayalı bazı moleküler markırlar

Polimeraz zincir reaksiyonu, nükleik asitlerin in-vitro olarak, uygun koşullar altında çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Hem araştırmada hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan PCR'ın geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle, K. Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya ödülünü almaya hak kazanmıştır.

PCR, çift iplik forma sahip olan DNA'nın yüksek ısıda denatüre olarak tek iplik forma geçmesi ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri ile çok sayıda kopyasının oluşturulmasıdır (Halden *et al.*, 1994). PCR kaynaklı markır çalışmalarında 10-25 bp uzunluğunda olan primerler kullanılır. PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşmaktadır.

Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır. Bunlar; DNA örneği, çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP), yüksek ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı ve $MgCl_2$ dir.

Moleküler genetik çalışmaları için birçok farklı kaynak materyalden farklı yöntemler kullanılarak DNA izole edilebilmektedir. PCR'da kalıp görevi gören DNA'nın temiz ve PCR inhibitörlerinden arındırılmış olması, sonucu etkilemektedir. PCR da kullanılan primer, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı özellikte, sentetik olarak sentezlenebilen oligonükleotidlerdir. Bu diziler çeşitli tasarım programları kullanılarak hedeflenen gen bölgesine özgü olarak sentezlenmektedir.

Her PCR döngüsü birbirini takip eden 3 basamaktan oluşmaktadır;

a) PCR'ın ilk basamağı olan denatürasyon aşamasında DNA zinciri denatüre olarak, tek zincirli hale gelmektedir. Bu aşama, zincir birbirinden tamamen ayrılıncaya kadar devam ederek, 90–95°C de yaklaşık 5 dk sürer. Böylece primerlerin bağlanacağı alan meydana gelir.

b) Reaksiyonun ikinci basamağı hibridizasyon aşamasıdır. Primerler tek zincirli hale gelmiş DNA'ya bağlanır. Primerlerin DNA'ya bağlanması ortalama 30–70°C'de gerçekleşir.

c) PCR'ın üçüncü basamağı polimerizasyon aşamasıdır. Taq polimeraz enzimi ilave edilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' yönünden 3' yönüne doğru ekleyerek primerin uzamasını sağlar ve böylece hedef DNA'nın iki zincirli kopyası oluşur. DNA dizisi 2n sayıda çoğalmaktadır. DNA sentezi 70–75°C arasındaki sıcaklıkta gerçekleşir.

PCR'ın ardından elde edilen amplifikasyon ürünlerinin değerlendirmesi elektroforez yöntemi ile yapılmaktadır. Elektroforez yöntemi materyale ve amaca göre çeşitlilik göstermektedir (Yıldırım, 2010).

2.1.3.a. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA/Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemi

RAPD ilk olarak 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR'ı temel alan bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Özaydın, 2004).

RAPD yöntemi, genomik DNA'ya, rastgele seçilmiş 9-10 bp oligonükleotidlik primerin, düşük bağlanma sıcaklığında rastgele bağlanarak, PCR ile çoğaltma yapmaktadır. Bu yöntemle elde edilen çoğaltma ürünü standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri jel üzerinde bantlar halinde gözlenmekte ve değerlendirme yapılırken, jel üzerinde bantların varlığı veya yokluğuna

bakılmaktadır. Tüm organizmalar için aynı primerlerin kullanılabilmesi önemli bir avantajdır (Williams *et al.*, 1990).

Her bir organizmanın genomik DNA'sı farklı olduğundan, aynı primer ile oluşturulacak RAPD belirteçleri de farklıdır (Glick, 1998). Ortaya çıkan bu farklılık bireylerin karşılaştırılmasını sağlamaktadır. RAPD de kullanılan primer sayısı arttırıldıkça oluşacak bant sayısı da artacak ve bu yönüyle, yakın türleri ayırmada ve tür içerisindeki varyasyonu belirlemede avantaj sağlayacaktır. RAPD belirteçlerinin dominant olması, heterozigotluğun teşhisini zorlaştırmaktadır (Mathieu-Daudé *et al.*, 1997).

Bu yöntemde DNA çoğaltma; primerin uzunluğuna, primerin GC içeriğine ve primer dizisindeki tek bir nükleotidin yerine bağlı olarak gerçekleşmektedir. MgCl₂, dNTP ve Taq DNA polimeraz konsantrasyonları reaksiyonun tekrarlanabilirliği açısından önemlidir (Rafalski *et al.*, 1993). Aynı zamanda bu yöntem, kullanılan materyale, yabancı DNA tarafından kontaminasyonuna, DNA izolasyonundaki varyasyonlara, PCR cihazına ve PCR koşullarına da bağlı olabilmektedir (Özaydın 2004).

RAPD yönteminin tekrarlanabilir olabilmesi için yeterli miktarda ve saflıkta DNA materyali kullanılmalı, uygun primer seçilmeli aynı zamanda PCR ve elektroforez koşullarının uygunluğunun sağlanmış olması gerekmektedir (Ergül vd., 2002).

RAPD yönteminin avantajları;

- Genomik DNA'nın nükleotid dizisi ile ilgili ön bilgi gerektirmemesi (Williams *et al.*, 1990),
- Kullanılan primerlerin ilgili bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltım yapılması (Welsh and McClelland, 1990),
- Yakın türlere ait bireyleri ayırmada güvenilir bir yöntem olması (Mathieu-Daude *et al.*, 1997),

- Polimorfizm oranının yüksek olması (Waugh and Poweil, 1992),
- Bir primer ile farklı bireyler karşılaştırılabilmesi (Glick and Pasternak, 1998),
- RAPD tekniğinin uygulanması kolay, hızlı ve daha ucuz bir yöntem olması (Rafalski *et al.*, 1991),
- Otomasyonunun mümkün olması (Rafalski *et al.*, 1991),
- Uygulama da ihtiyaç duyulan DNA miktarı az olması (Waugh and Poweil, 1992),
- Kullanılan markırları çevre şartlarından ve gelişim dönemlerinden etkilenmemesidir (Williams *et al.*, 1990).

RAPD tekniğinin dezavantajı, bağlı olduğu değişkenlerin hassasiyetinden dolayı tekrarlanabilirliği düşük olmasıdır (Bardakçı, 2001). Ayrıca kullanılan markırların dominant olması ve heterozigotluğu belirlemenin de zor olmasıdır (Mathieu-Daude *et al.*, 1997).

RAPD yöntemi kullanımının ve uygulamasının kolay olması, az miktarda genomik DNA'ya ihtiyaç duyması gibi avantajlarından dolayı, çok sayıda araştırmada kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntem, polimorfizm oranının yüksek olması, çok sayıda karakterin belirlenmesini sağlamaktadır.

RAPD yöntemi bireylerde parmak izi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Parmak izi çalışması sonucunda, bireyin genom yapısıyla ilgili bilgiler elde edilebilmekte ve bireyin genotipi belirlenebilmektedir. Adli tıp vakalarında, klinik çalışmalarda, populasyon genetiği, genetik kaynakların çeşitliliğinde, genetik harita yapımı ve ekolojik çalışmalarda kullanılan güvenilir bir yöntemdir (Rafalski *et al.*, 1994).

2.1.3.b. SSR (Single Sequence Repeat/Basit Dizi Tekrarları) yöntemi

Canlı genomunda, sıklıkla tekrarlanan DNA dizileri bulunmaktadır. Bu diziler belirli sayılarda tekrarlanmaktadır. Dizilerin, genomun hangi bölgesinde bulunduğu ve kaç

defa tekrarlandığı her tür için değişiklik göstermektedir. Aynı tür içindeki bireylerde de bu dizilerin bulunup bulunmamasına dayalı olarak SSR yöntemi geliştirilmiştir. SSR, basit tekrarlı DNA dizileri genelde 1 ile 6 nükleotid uzunluğunda bazların ardışık olarak bulunması olayıdır. Burada mikrosatellit varyasyonu, tekrar sayısına bağlıdır. Bitki türlerinde sınırlı sayıda mikrosatellit markırı bulunmaktadır (Hui Lui, 1998). Tekrarlanan bölgelere özgü spesifik primerler geliştirilmekte ve bu primerler ile PCR yapılmaktadır. PCR ürünleri, elektroforez yapıldıktan sonra ethidium bromide veya gümüş nitrat kullanılarak boyandıktan sonra polimorfizm aranmaktadır.

SSR yönteminin avantajları kodominant olması, heterozigotları ve homozigotları ayırt edebilmesidir. PCR tekniği ve allellerin jel üzerinde değerlendirilmesiyle tüm genetik bilgiye ulaşılabilmektedir.

SSR yönteminin dezavantajları, her türe özgü primer gerektiğinden pahalı bir yöntem olması, sekans bilgisine ihtiyaç göstermesi ve klonlama ve dizi analizi çalışmalarını gerektirmesidir.

Kriminal çalışmalarda, bireylerin akrabalıklarının belirlenmesinde, genom haritalarının yapılmasında, populasyonun genetiği çalışmalarında güvenle kullanılmaktadır.

2.1.3.c. ISSR (Inter-Simple Sequences Repeats/Basit Dizi Tekrar Arası) yöntemi

ISSR yöntemi, uygulama olarak RAPD'e benzemekle birlikte bazı yönleriyle farklıdır. Kullanılan primerlerin mikrosatellit bölgelerinden çoğaltılmış olmaları ve primerlerin bağlanma sıcaklıklarının yüksek olması ile RAPD yönteminden ayrılmaktadır. Uçlarda tekrarlanan DNA dizileri PCR reaksiyonunda primer olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde genellikle bir primer kullanılarak PCR ürünleri elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılırlar (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Bu yöntem,

yüksek polimorfizm oranına sahip olmasıyla güvenilirdir ve otomasyona uygundur. Dominant markırdır.

2.1.3.d. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi

AFLP, çoğaltılan parça uzunluğu farklılığını esas alan bir yöntemdir ve RAPD yönteminin olumsuz yönlerini gidermek üzere Vos *et al.* (1995) tarafından geliştirilmiştir.

Bu yöntemle rastgele seçilen primer dizilerine benzeyen uçlar ile yalnız fragmentler çoğaltılmaktadır. Bir reaksiyon ile çok sayıda bant vermesi ve az miktarda DNA ile çalışılması avantajlı bir yöntem olmasını sağlamaktadır. AFLP yönteminde meydana gelen bantların sayısı amplifikasyon primerinin değişken parçasındaki bazların sayısıyla belirlenmektedir (Vos *et al.*, 1995).

AFLP yönteminde, PCR ile çoğaltım yapılması ve aynı zamanda restriksiyon enzimlerinin kullanılması bu tekniğin kullanılabilirliğini artırmaktadır. Fazla hassasiyet gerektirmesi ve kararlılığının yüksek olması sebebiyle genetik varyasyon çalışmaları için uygun bir yöntemdir (Mueller and Wolfenbarger, 1999).

Bitkilerde genetik harita oluşturmada, parmak izi çalışmalarında, genetik çeşitliliğin belirlenmesi çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemin polimorfizm oranı çok yüksektir ve çok sayıda lokusu aynı anda taraması nedeni ile parmak izi analizi için uygundur. Ayrıca heterozigot ve homozigot bireyler arasındaki farklılıklar saptanabilmektedir. Genellikle dominant markıra sahip olması, farklı genetik haritalar arasında transferinin güç olması AFLP tekniğinin dezavantajlarından (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

2.1.3.e. SCAR (Sequence Characterized Amplified Region/Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler) yöntemi

Herhangi bir özelliğe ait olan RAPD fragmenti klonlanıp dizisi belirlendikten sonra, yaklaşık 24 nükleotidlik primerler kullanılarak, RAPD markırları SCAR markırlarına dönüştürülmektedir (Paran and Michelmore, 1993). RAPD primerlerinden daha uzun primer kullanılması, sistemin başarısını ve güvenilirliğini artırmaktadır. SCAR markırları dominant markırlardır. Ancak amplifikasyon öncesinde ya da sonrasında restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak kodominant markırlara dönüştürülebilirler.

2.1.3.f. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence/Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi) yöntemi

PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle oluşan DNA fragmentlerindeki uzunluk polimorfizmleridir. Bu yöntem, kodominant bir markır sistemine sahiptir. Primer dizaynı için gerekli olan sekans bilgisi gen bankalarından, klonlanmış PCR ürünlerinden, genomik DNA'dan ya da cDNA klonlarından elde edilebilir (Jarvis *et al.*, 1994).

2.1.3.g. SNP (Single Nucleotide Polymorphism/ Tek Nükleotit Polimorfizmi) yöntemi

Genom çalışmalarında son yıllarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Tek nükleotid polimorfizmi, genetik bir lokusta farklı alleller oluşturacak şekilde baz yada bazlarda meydana gelen nokta mutasyonlarıyla oluşan polimorfizmlerdir. SNP'ler kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan DNA bölgelerinde meydana gelebilir. Teorik olarak, bir lokustaki SNP dört bazdan birini bulunduracak şekilde, dört allel oluşturabilir (Gupta *et al.*, 1999).

2.1.3.h. DAF (DNA Amplification Fingerprinting/DNA oğaltımlı Parmakizi) yöntemi

DAF yöntemi, ilk kez 1991 yılında Caetano–Anolle’s ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntemde 5 ile 8 baz uzunluğunda, tek bir rastgele primer kullanılır ve PCR şartlarının optimizasyonu son derece önemlidir. PCR sonucu oluşan ürünler poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülür ve gümüş boyama yapılarak görüntülenir. DAF tekniğı prensip olarak RAPD–PCR tekniğine benzemekle birlikte, deneysel açıdan bazı farklılıklar göstermektedir (Caetano–Anolle’s *et al.*, 1991).

2.1.3.i. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism/ oğaltılan Sekans Polimorfizmi) yöntemi:

SRAP yöntemi, bitkilerde genetik farklılık çalışmalarında kullanılan, son dönemlerde geliştirilmiş bir moleküler markır sistemidir. SRAP primerleri, 17 veya 18 nükleotid uzunluğundadır. 13 veya 14 bazlık bir ana dizini ve buna 5’ ucunda eklenmiş CCGG dizini, ters primerler de ise yine aynı uzunluktaki ana dizini ve bu dizine eklenmiş AATT dizini içermektedir. Hem ileri hem de ters primerler 3’ ucunda üç adet seçici nükleotid içermektedir. Bu yöntem, PCR’a dayalı, basit, güvenilir bir markır sistemidir. SRAP markırları, RAPD markırlarına oranla daha güvenilir sonuçlar verir. AFLP markırlarına oranla ise daha ucuz ve daha kolay bir yöntemdir (Li and Quiros, 2001).

2.2. Genetik Polimorfizm

Polimorfizm, DNA’daki yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve parça yerleşmeleri ile oluşur. Bireydeki fenotipik varyasyonunda kaynağıdır. Seleksiyon, mutasyon, migrasyon, genetik sürüklenme, gen akışı ve rekombinasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkar.

Seleksiyon, populusyonu oluşturan bireyler arasında görülen fenotipik özelliklerdeki bazı farklılıkların kalıtsal olabileceği ve yaşamsal faaliyetlerde bireye avantaj kazandıran durum olarak açıklanır. Populusyonda bazı genotip frekanslarının yükselmesine neden olur.

Mutasyon, genetik materyalde bulunan nükleotidlerin sayısında, sıralanmasında veya çeşidinde meydana gelen ve gelecek nesillere aktarılan kalıcı değişikliklerdir. Allel frekanslarının değişimesine neden olurlar. Varyasyonun en büyük kaynağıdır.

Migrasyon (g), belirli bir geni taşıyan bireylerin bir populusyondan diğerine hareketiyle oluşur ve populusyonlarda önemli frekans değişikliklerine neden olur.

Genetik sürüklenme (drift), küçük populusyonların belirli bir nedene bağlı olmaksızın allel frekanslarında meydana gelen dalgalanmalardır, populusyonlardaki farklılığı azaltır (Yıldırım, 2010).

Gen akışı, populusyonlar arasında oluşan genetik materyal değiş tokuşunda genetik farklılığın populusyon içi veya populusyonlar arasındaki kaybı olarak tanımlanır ve bunlar, genetik mesafe oluşmasına neden olan faktörlerdendir.

Rekombinasyon, yeni gen dzenlenmeleridir, yeni bir farklılık yaratmaz, ancak varolan farklılığın yeni kombinlerini üretir (de Vicente and Fulton, 2004).

Günümüzde doğal kaynakların hızla yok olması, genetik çeşitliliğin korunmasını ve gerektiğinde verimli bir şekilde kullanımları için mevcut genetik varyasyonun belirlenmesini gerektirir. Bunun için sitolojik veriler, izoenzimler, tohum depo proteinleri gibi biyokimyasallar ve daha güvenilir sonuçlar veren RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR gibi moleküler yöntemler başarıyla kullanılmaktadır (Stuber, 1992).

Genetik varyasyon çalışmaları, bireylerin görünen özelliklerini baz alan fenotipik değerlendirme ve bireylerin DNA'sını baz alan genotipik değerlendirme olarak yapılmaktadır (Yıldırım, 2010).

2.3. Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi

Yapılan bu çalışmada dünyada sadece Türkiye sınırlarında Erzincan ilinde endemik olarak yayılış gösteren ve IUCN kategorilerine göre Endangered yani nesli tükenme tehlikesinde olan *S. erzincanicus* türünün Erzincan'da 3 farklı lokalitedeki populasyonlarının genetik çeşitliliğinin araştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca bu türün çok sınırlı bir alanda yetişiyor olması ve olumsuz çevre şartları olan kurutma çalışmaları ve aşırı otlatma gibi nedenlerden dolayı türün yok olma durumunun belirlenmesi ve yeni koruma stratejilerinin belirlenmesini içermektedir.

Daha önce bu alanlarda ekolojik çalışmalar yapılmış türün varlığının kritik düzeyde olduğu görülmüştür. Bu çalışma da türün klasik koruma tedbirlerine ek olarak genetik yapısının belirlenmesinden sonra in situ korumanın yapılabileceği alanların varlığı konusunda bilgi edinilecektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan bitkisel materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak Erzincan çevresinde bulunan 3 farklı bölgeden örneklenen *S. erzincanicus* türü kullanılmıştır. Her populasyon için 15 birey örneklenmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Yapılan çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin isimleri Tablo 3.1’de yer almaktadır.

Tablo 3.1. Kullanılan araç, gereçler ve markaları

Kullanılan Araç ve Gereçler	Araç ve Gereç Markaları
Buzdolabı	Arçelik Hacim: 610 LT
-80 C Ultra Derin Dondurucu	Haier DV-86L628
-24 C Derin Dondurucu	Arçelik Hacim: 610 LT
Hassas Terazı	Shimadzu ATX224
Vortex	Daihan VM10
Elektroforez	Owl B2
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific EC300XL2
UV Spektrometre	Perkin Elmer Lambda 35
Otoklav	Sümer SM3
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert WNE22
Ultra Santrifüj	Hanıl Smart R17
PCR	Multigene GTC96S
Mikrodalga Fırın	Arzum AR245
Mikropipet Serisi	Axygen
Etüv	Daihan WIG – 105
Görüntüleme Sistemi	Vilber VL - 1011 72711

3.1.3.Kullanılan çözeltiler

3.1.3.a.Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

DNA ekstraksiyon tamponu:

100 mM	Tris-HCl	(pH 8,0)
50 mM	EDTA (Etilendiamintetra asetik asit)	(pH 8,0)
500 mM	NaCl	
%2	SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	(w/v)
%2	β -mercaptoethanol	(w/v)
%1	PVP (Polyvinylpyrrolidone)	(w/v)

CTAB/NaCl:

%10	CTAB (Setiltrimetil amonyum bromür)
0,7 M	NaCl

Fenol:Kloroform:İzoamil alkol:

25:24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

Kloroform:İzoamil alkol:

24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

TE tamponu:

10 mM	Tris-HCl	(pH 8,0)
1 mM	EDTA	(pH 8,0)

%70'lik Etil Alkol:

70 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.b. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan çözeltiler

PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler

Ethidium Bromür Çözeltisi: 500 ml 0,5x TBE (Tris-borat-EDTA) tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Bovine Serum Albumin: 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bromfenol Blue Çözeltisi: 0,25 g bromfenolblue, 0,25 g ksylensiyanol FF ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

0,5x TBE Tamponu: TBE tamponu 10x TBE olarak satın alındı ve 0,5 birim 10x TBE tampon +9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5x TBE tamponu hazırlanmıştır.

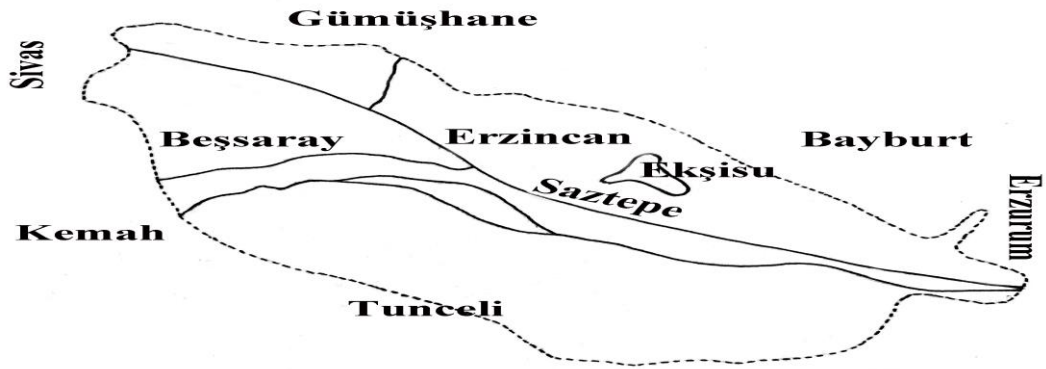
Primerlerin Hazırlanması

Kullanılan primerler yönetici firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Populasyonların örnekleme

Araştırmada *S. erzincanicus* türünün Ekşisu, Saztepe ve Beşsaray olmak üzere 3 populasyonu rastgele örnekleme yöntemi kullanılarak örnekleştir. Doğal yaşama ortamından sağlıklı ve taze yaprak örnekleri toplanarak DNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı lokalitelerin haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. *S. erzincanicus* toplanan lokaliteler

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü olarak Cheng Lin *et al.* (2001) esas alınmış ve birkaç maddesi modifiye edilmiştir.

- a. Daha önce sıvı azotta parçalanıp 2ml'lik tüplere alınan bitki materyali üzerine 1000 µl DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş, alt üst ederek karıştırılmış ve önceden 65°C'ye ısıtılmış su banyosunda 10-60 dk bekletilmiştir.
- b. 12000 g ve 4°C'de 10 dk santrifüjlenerek üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- c. 1000 µl Fenol: Kloroform: İzamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmış, 12000 g ve 4°C'de 5 dk santrifüjlenmiş ve üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- d. Üst faza 1/10 hacim CTAB/NaCl çözeltisinden eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- e. 1000 µl Kloroform: İzamil alkol eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. 12000 g ve 4°C'de 5 dk santrifüjlenerek üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- f. DNA'yı çöktürmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenerek -20°C'de 10 dk bekletilmiştir.
- g. 12000xg ve 4°C'de 10 dk santrifüjlenerek üst faz atılmıştır.
- h. Pelet önce %100'lük sonra %70'lik soğuk ethanol ile yıkanmıştır.
- i. Yıkanan pelet bir gece bekletilerek kurutulmuştur.
- i. Kurutulan DNA 100 µl TE tamponunda çözülmüştür.
- j. Kullanılincaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

%1'lik agaroz jel elektroforezi yapılarak izole edilen genomik DNA'lar gözlenmiştir. Ayrıca elde edilen DNA 250 kat (3 µl DNA+747 µl TE tamponu) seyreltilerek spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorban (A) değerleri okunmuştur. OD (okuma değeri) 260/280 değeri 1,1-1,8 arasında olması durumunda DNA'nın saf olduğu kabul edilmiştir. 50 (DNA için multifikasyon katsayısı) x 250 (seyreltme katsayısı) x OD₂₆₀ (260 nm'de okuma değeri) formülünden faydalanılarak stoktaki DNA miktarı hesaplanmıştır. Stok DNA'dan 50 ng/µl DNA içeren çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

3.2.3. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Bu çalışmada, OPERON Technologies (Alameda, California)'ya ait 45 RAPD primeri denenmiş, bunların arasından amplifikasyon veren 16 primer çalışılmıştır. Primerler G+C içeriği %60–70 olacak şekilde seçilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler, baz dizilimleri ve erime noktası (T_m) değerleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler, nükleotid dizileri ve T_m değerleri

Primer Combination	Sequence (5'-3')	T _m değeri
OPK19	CACAGGCGGA	34°C
OPBB- 3	TCACGTGGCT	32°C
OPA- 4	AATCGGGCTG	32°C
OPA-13	CAGCACCCAC	34°C
OPH- 17	CACTCTCCTC	32°C
OPK-4	CCGCCCAAAC	34°C
OPY-6	AAGGCTCACC	32°C
OPC-11	AAAGCTGCGG	32°C
OPW- 17	GTCCTGGGTT	32°C
OPBA-03	GTGCGAGAAC	32°C
OPL-09	TGCGAGAGTC	32°C
OPD-20	ACCCGGTCAC	34°C
OPN-16	AAGCGACCTG	32°C
A-1	AGTCAGCCAC	32°C
A-3	GGGTAACGC	30°C
A-8	GTGACGTAGG	32°C

3.2.4. RAPD-PCR protokolü

RAPD-PCR protokolü toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmış ve Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. RAPD- PCR çoğaltma ögeleri konsantrasyon ve miktarları

PCR çoğaltma ögeleri	Kullanılan konsantrasyon	PCR’da kullanılan miktar (µl)
PCR tamponu	10x	2 µl
DNA	100 ng/µl	1 µl
dNTP	10 Mm	0,5 µl
MgCl ₂	25 Mm	1,25 µl
Primer	5 µl	1 µl
<i>Taq</i> DNApolimeraz	5 Unit/µl	1 µl
Saf su		13,25 µl
Toplam		20 µl

Hazırlanan örnekler PCR otomatik thermocycle aletine (Eppendorf Mastercycler Gradient Authorized Thermal Cycle) yerleştirilmiş ve aşağıdaki döngüye tabi tutulmuştur.

➤ PCR aleti otomatik olarak 5 dk 94°C tutulmuştur,

➤ 4 döngü olacak şekilde sırasıyla,

1 dk 30 sn 94°C

1 dk 30 sn 37°C

3 dk 72°C’de tutulmuştur,

➤ 41 döngü olacak şekilde sırasıyla,

1 dk 94°C

1 dk 36°C

1 dk 42°C

3 dk 72°C’de tutulmuştur,

➤ Son olarak 7 dk 72°C’de tutularak süreç tamamlanmıştır.

➤ PCR aletinden çıkarılan örnekler 4°C’de saklanmıştır.

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. İşlem sırasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir;

- a. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %0,7 olacak şekilde 0,7 g agaroz tartılıp 100 ml 1x Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- b. Mikrodalga fırından çıkarılan 1x TBE agaroz çözeltisi içerisine 2 µl ethidiumbromid eklenmiştir.
- c. Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- d. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (1 µl bromfenol mavisi +5 µl PCR ürünü) yüklenmiştir.
- e. Elektrik akımı verilerek 100V-60 dk süre ile DNA'lar elektroforez işlemine tabi tutulmuştur.
- f. Elektroforez tankından çıkarılan jel UV ışık altında incelenmiş ve görüntüler alınmıştır.

3.2.6. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz

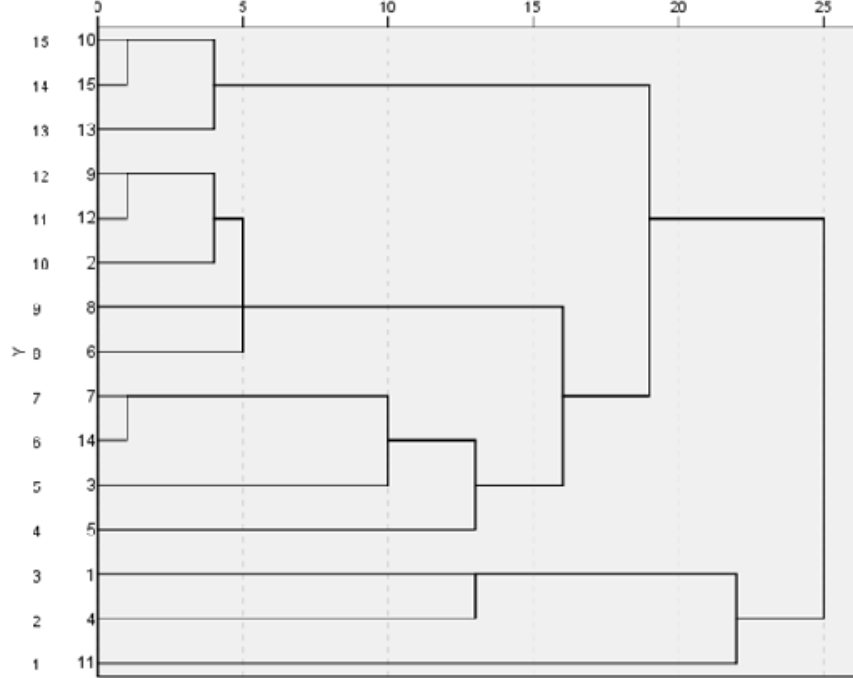
PCR ürünlerinin değerlendirilmesi her bir bireyde her primer için bantların varlığı (1) ve yokluğu (0) şeklinde ifade edilerek, oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmiştir. RAPD-PCR uygulamasıyla elde edilen veriler POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) ve POPULATION 1.2.28 analiz edilecek şekilde hazırlanmıştır (Langella, 2000). Çalışılan populasyonlar için gözlenen allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), Nei'nin (1972) genetik çeşitliliği (H) ve Shannon information indeksi (I), populasyondaki bireyler için beklenen heterozigotluğu ve gözlenen heterozigotluğu hesaplanmıştır. Populasyon içi değerlendirmeler Jaccard (1908)'in benzerlik indeksine göre, populasyonlar arası değerlendirmeler SPSS V.16

ile hesaplanmış, UPGMA (Unweighted Pair Group Method WITH Arithmetic Means) yöntemi ile dendrogramlar hazırlanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Saztepe Populasyonunda RAPD Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar

Çalışmada kullanılan 16 RAPD primeri, populasyon bireyleri arasındaki molekül büyüklüğü 250–2800 bp arasında değişen 82 adet bant vermiştir. Saztepe populasyonuna ait gözlenen allel sayısı; 1,6560, etkili allel sayısı; 1,2645, Nei's (1973) genetik çeşitliliği; 0,1715, Shannon's bilgi indeksi; 0,2737, Polimorfizm oranı % 65,60 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Jaccard'ın benzerlik indeksine göre oluşturulan dendrogram sonuçlarına göre bütün bireyler 2 grupta toplanmıştır. (Şekil 4.1). Populasyonu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi 0,22 ile 0,832 arasında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1).



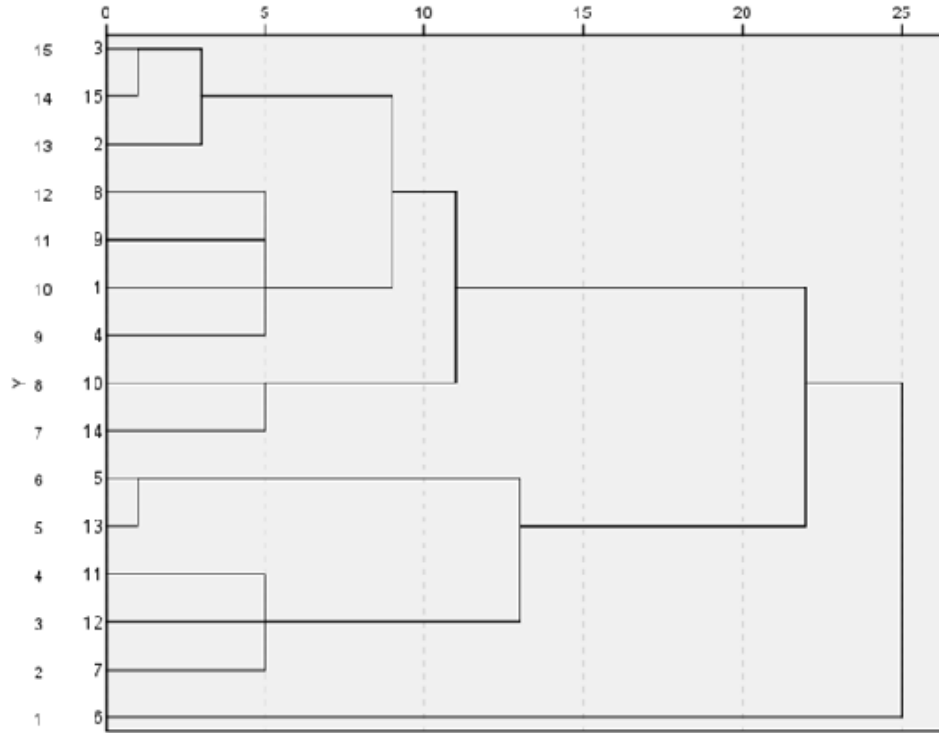
Şekil 4.1. Saztepe populasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genotipik bağlantı

Çizelge 4.1. Saztepe popülasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,000														
2	0,655	1,000													
3	0,222	0,092	1,000												
4	0,493	0,234	0,324	1,000											
5	0,048	0,218	0,182	0,153	1,000										
6	0,429	0,655	0,303	0,153	0,143	1,000									
7	0,222	0,462	0,179	0,022	0,303	0,182	1,000								
8	0,429	0,655	0,182	0,561	0,429	0,429	0,303	1,000							
9	0,493	0,545	0,367	0,418	0,153	0,561	0,022	0,561	1,000						
10	0,545	0,092	0,590	0,025	0,182	0,303	0,231	0,182	0,367	1,000					
11	0,378	0,289	0,160	0,405	0,378	0,075	0,480	0,378	0,405	0,160	1,000				
12	0,545	0,832	0,179	0,367	0,303	0,787	0,179	0,787	0,713	0,179	0,160	1,000			
13	0,655	0,333	0,462	0,078	0,218	0,218	0,092	0,218	0,234	0,832	0,098	0,092	1,000		
14	0,048	0,218	0,303	0,153	0,429	0,143	0,787	0,429	0,153	0,182	0,378	0,303	0,218	1,000	
15	0,364	0,000	0,462	0,234	0,218	0,218	0,277	0,218	0,545	0,832	0,085	0,092	0,667	0,218	1,000

4.2. Beşsaray Popülasyonunda RAPD Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar

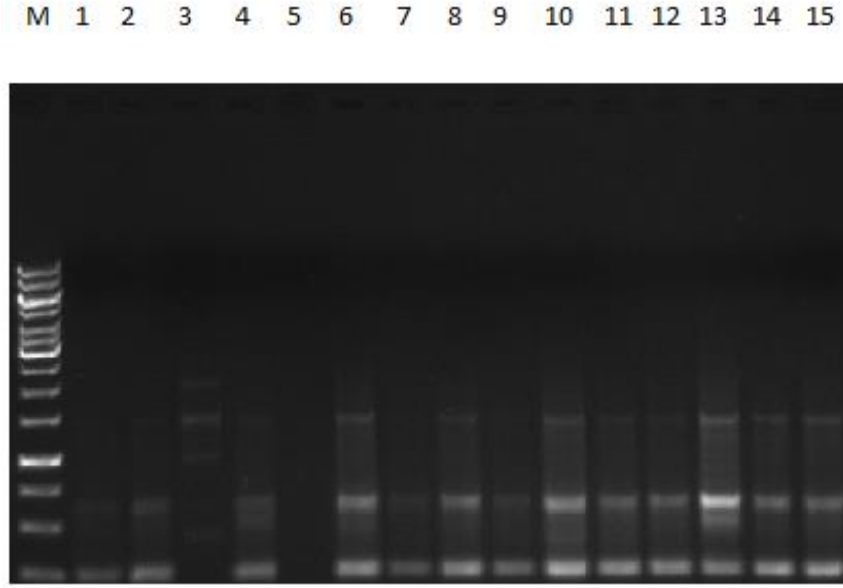
Çalışılan RAPD primerleri, popülasyon bireyleri arasındaki molekül büyüklüğü 250-3000 bp arasında değişen 106 adet bant vermiştir. Beşsaray popülasyonuna ait gözlenen allel sayısı: 1,8480, Etkili allel sayısı: 1,2454, Nei's (1973) gen çeşitliliği: 0,1725, Shannon's bilgi indeksi: 0,2909, Polimorfizm oranı % 84,80 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Jaccard'ın benzerlik indeksine göre oluşturulan dendrogramda bütün bireyler 2 grupta toplanmıştır (Şekil 4.2). Popülasyonu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi 0,41 ile 0,873 arasında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Beşsaray popülasyonunun A1 RAPD primerine karşı oluşturduğu amplifikasyon ürünleri Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Beşsaray populasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genotipik bağlantı

Çizelge 4.2. Beşsaray populasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi

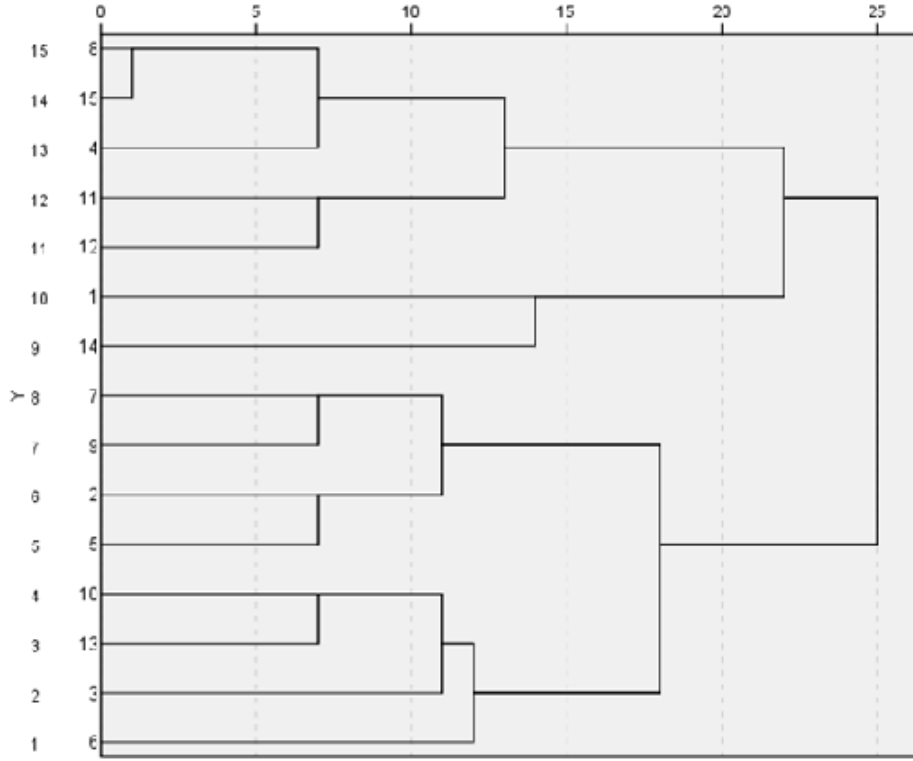
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,000														
2	0,429	1,000													
3	0,303	0,787	1,000												
4	0,000	0,000	0,000	1,000											
5	0,488	0,098	0,051	0,075	1,000										
6	0,378	0,378	0,480	0,289	0,258	1,000									
7	0,655	0,218	0,092	0,312	0,745	0,577	1,000								
8	0,429	0,429	0,303	0,068	0,098	0,158	0,218	1,000							
9	0,429	0,429	0,303	0,114	0,488	0,086	0,218	0,429	1,000						
10	0,218	0,218	0,462	0,586	0,149	0,289	0,333	0,218	0,218	1,000					
11	0,488	0,098	0,056	0,257	0,467	0,258	0,745	0,488	0,098	0,447	1,000				
12	0,488	0,098	0,041	0,148	0,467	0,516	0,745	0,098	0,098	0,447	0,733	1,000			
13	0,429	0,048	0,101	0,096	0,878	0,126	0,655	0,429	0,429	0,073	0,618	0,358	1,000		
14	0,429	0,429	0,303	0,076	0,488	0,378	0,655	0,429	0,429	0,655	0,488	0,488	0,429	1,000	
15	0,218	0,655	0,873	0,701	0,149	0,289	0,062	0,655	0,218	0,333	0,149	0,149	0,073	0,218	1,000



Şekil 4.3. Beşsaray popülasyonuna ait A1 primeri ile elde edilen RAPD profili

4.3. Ekşisu Popülasyonunda RAPD Profillerine Göre Elde Edilen Sonuçlar

Çalışılan RAPD primerleri, popülasyon bireyleri arasındaki molekül büyüklüğü 300-3000 bp arasında değişen 73 adet bant vermiştir. Ekşisu popülasyonuna ait gözlenen allel sayısı: 1,5840, etkili allel sayısı: 1,2637, Nei's (1972) gen çeşitliliği: 0,1676, Shannon's bilgi indeksi: 0,2631, Polimorfizm oranı % 58,40 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Jaccard'ın benzerlik indeksine göre oluşturulan dendrogram sonuçlarına göre bütün bireyler 2 grupta toplanmıştır (Şekil 4.4). Popülasyonu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi 0,67 ile 0,915 arasında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.4. Ekşisu popülasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genotipik bağlantı

Çizelge 4.3. Ekşisu popülasyonunu oluşturan bireyler arasındaki genetik benzerlik indeksi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1,000														
2	0,620	1,000													
3	0,179	0,620	1,000												
4	0,537	0,333	0,124	1,000											
5	0,367	0,915	0,713	0,383	1,000										
6	0,590	0,620	0,590	0,537	0,713	1,000									
7	0,713	0,870	0,367	0,383	0,709	0,713	1,000								
8	0,077	0,293	0,482	0,556	0,085	0,078	0,093	1,000							
9	0,462	0,745	0,462	0,447	0,856	0,832	0,856	0,069	1,000						
10	0,462	0,745	0,832	0,447	0,856	0,832	0,545	0,125	0,667	1,000					
11	0,124	0,333	0,124	0,067	0,383	0,124	0,383	0,286	0,447	0,149	1,000				
12	0,182	0,488	0,303	0,098	0,561	0,303	0,561	0,486	0,655	0,218	0,683	1,000			
13	0,590	0,620	0,590	0,537	0,713	0,590	0,367	0,180	0,462	0,832	0,124	0,182	1,000		
14	0,590	0,620	0,179	0,124	0,367	0,179	0,713	0,396	0,462	0,092	0,537	0,303	0,179	1,000	
15	0,099	0,158	0,548	0,482	0,068	0,114	0,154	0,580	0,097	0,374	0,241	0,615	0,567	0,082	1,000

Tablo 4.1. Çalışılan populasyonlara ait populasyon için gözlenen allel sayısı, etkili allel sayısı, Ne'nin genetik çeşitliliği, Shannon's bilgi indeksi, polimormik lokus sayısı, % polimorfizm

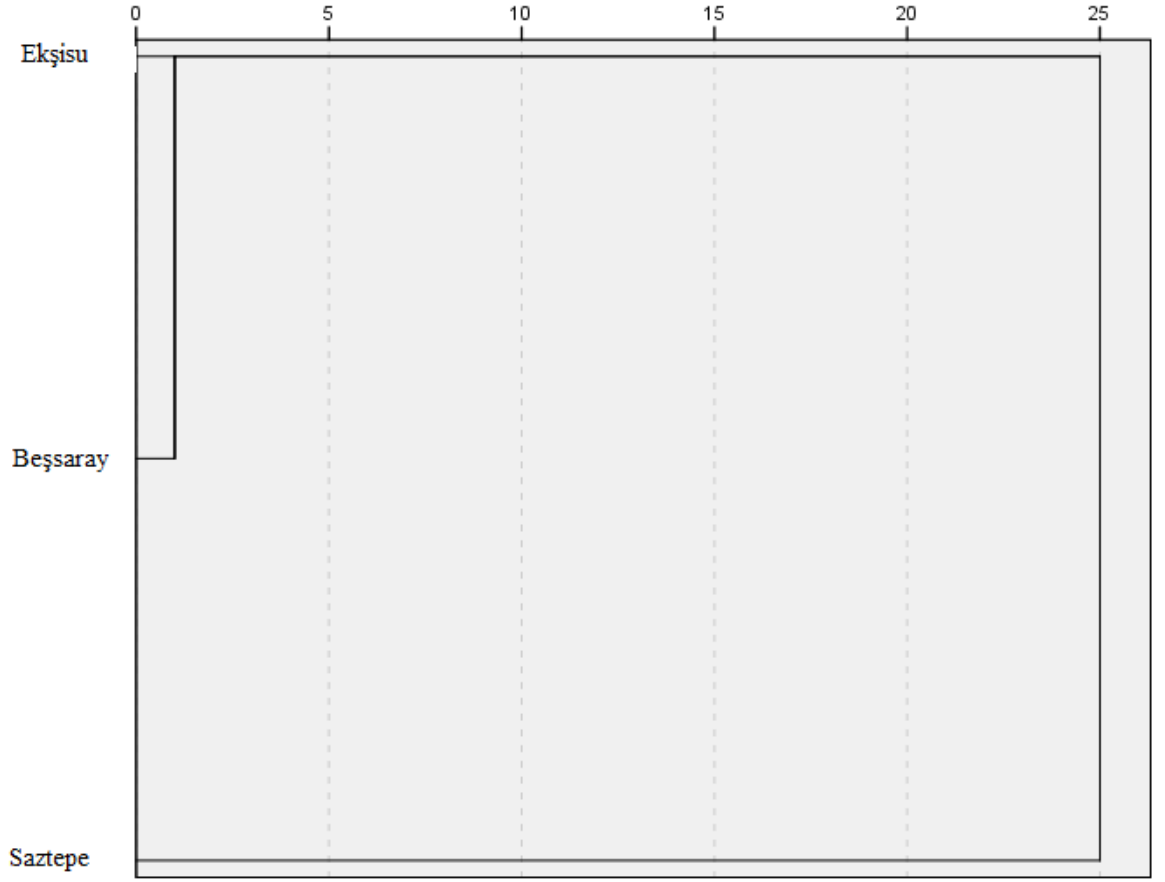
Populasyon	Na	Ne	H	I	P	%P
Saztepe	1,6560	1,2645	0,1715	0,2737	82	65,60
Beşsaray	1,8480	1,2454	0,1725	0,2909	106	84,80
Ekşisu	1,5840	1,2637	0,1676	0,2631	73	58,40
Ortalama	1,9920	1,2750	0,1946	0,3307	124	99,20

Na: Populasyon için gözlenen allel sayısı, Ne: Etkili allel sayısı, H: Ne'nin genetik çeşitliliği, I: Shannon's bilgi indeksi, P: Polimormik lokus sayısı, % P: % Polimorfizm

Tablo 4.2. *S. erzincanicus* populasyonları arasındaki benzerlik indeksi

Populasyon	Saztepe	Beşsaray	Ekşisu
Saztepe	****	0,9601	0,9381
Beşsaray	0,0407	****	0,9671
Ekşisu	0,0639	0,0334	****

Nei (1972)'ye göre hesaplanan populasyonlar arasındaki benzerlik indeksi Tablo 4.2'de verilmiştir. Tabloya göre diagonalın üst kısmı genetik benzerliği ifade ederken, alt kısmı genetik benzememezliği ifade etmektedir. Genetik mesafe değerlerine göre birbirine en yakın populasyonlar Beşsaray ve Ekşisu ($D= 0,9671$), birbirine en uzak populasyonlar ise Ekşisu ve Saztepe ($D= 0,0639$)'dir (Tablo 4.2).



Şekil 4.5. Nei (1972)'ye göre *S. erzincanicus* populasyonları arasındaki genotipik bağlantı

Nei (1972)'ye göre hesaplanan *S. erzincanicus* 3 populasyonu arasındaki genetik mesafe Şekil 4.5'de UPGMA metoduna göre çizilmiş ve populasyonlar 2 gruba ayrılmıştır. Beşsaray ve Ekşisu aynı grupta bulunurken, Saztepe diğer grupta bulunmaktadır.

Populasyonlar için ortalama gözlenen allel sayısı 1,9920, Etkili allel sayısı 1,2750, N_e 'nin genetik çeşitliliği 0,1946, Shannon indeksi 0,3307, Polimormik lokus sayısı 124, polimorfik lokus yüzdesi % 99,20 olarak hesaplanmıştır. Populasyonlar arasındaki gen akışı (N_m) 1,71, genetik farklılaşma değeri (G_{st}) 0,127 olarak hesaplanmıştır ($N_m=0,25 \times (1 - G_{ST}) / G_{ST}$).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Erzincan çevresinde doğal yayılış gösteren ve endemik olan *S. erzincanicus* Matthews (Asteraceae) populasyonlarının, RAPD belirteçleri kullanılarak yapılan populasyon genetiği çalışılmasında bu tür için koruma stratejilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda *S. erzincanicus* Matthews (Asteraceae) populasyonları arasındaki genetik farklılık ilk kez DNA markırları ile araştırılmıştır. Çalışılan türe ait DNA seviyesinde yapılmış çalışma ve genomu hakkında bir bilgi bulunmadığından, çalışmamızda Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışma sonuçlarını allel sayısı bakımından ele aldığımızda, tüm populasyonlar ve lokuslar için etkili allel sayısının beklendiği gibi gözlenen allel sayısından düşük olduğu görülmüştür. Gözlenen allel sayısı sadece bütün alleller aynı frekansta olduğunda etkili allel sayısına eşit olacaktır (Kimura and Crow, 1978).

Genetik farklılık ve gen akışı bir türün genetik yapısını değerlendirmede önemli göstergedir (Song *et al.*, 2010). Hamrick (1989) ortalama Nm değerini kendi kendini döleyen, tohum ve polenlerini çok kısa (2-3 m çapında) mesafelere yayan türler için 0,265, dışarıdan döllen ve tohum ve polenlerini çeşitli taşıyıcılar aracılığı ile uzak mesafelere yayabilen türler için ise 4,750 olarak bildirmiştir. Diğer taraftan, populasyonlar için kritik Nm değeri 0,50 olup, bu değer üzerindeki değerler gen akışının genetik sürüklenmeyi önleyecek miktarda olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra Nm değerinin 1'den küçük olması populasyonlarda genetik sürüklenme yüzünden farklılaşmanın başladığını göstermektedir (Wright, 1969). Yaptığımız çalışma sonucunda Nm değeri 1.71 olarak hesaplanmıştır. (bizim sonuçla kıyasla) Endemik bir tür olan *Tuberaria majör* (Cistaceae) koruma genetiği ISSR markırlarla çalışılmış ve Nm değeri 2,199 olarak bulunmuştur (Trindade *et al.*, 2012). *Limonium*

sinense için RAPD, ISSR ve AFLP markırlarında sırasıyla 0,581, 0,618, 0,612 olarak (Ge *et al.*, 2013) hesaplanmıştır.

Üreme sistemlerinin bitki türlerinde genetik çeşitliliği belirlemede önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Hamrick, 1982). Kendine döllenlen taksonlarda genetik çeşitlilik daha az olurken, dış döllenlen veya melez türlerde daha yüksek olmaktadır (Nybomand and Bartish, 2000). *S. erzincanicus* türü tohumla üremektedir. Ancak çevresel şartlardan dolayı tohumun çimlenememesi türü yumrularıyla vejetatif üremeye yöneltmiştir.

Gst değeri 0 ile 1 arasında olabilir. Kendi kendine döllenlen türlerde 0,51'den (Hamrick and Godt, 1989) daha yüksek olduğu, tohumla üreyen türlerde 0,1 ile 0,2 arasında olduğu vurgulanmıştır. Çalışma sonuçlarında Gst değeri 0,127 olarak bulunmuştur. Endemik bitkilerin koruma genetiği çalışmalarında bu değer *Limonium sinense* için RAPD, ISSR ve AFLP markırlarında sırasıyla 0,3849, 0,3577, 0,3670 olarak (Ding *et al.*, 2013), *Mentha cervina* için 0,532 (Rodrigues *et al.*, 2013) bulunurken, endemik *Planto* türleri için 0,1873 olarak hesaplanmıştır (Ferreria *et al.*, 2013). Ayrıca Türkiye'de yetişen endemik bir tür olan *Centaurea wiedemanniana*'da RAPD markırları ile yapılan bir çalışmada populasyonlar arasında yüksek derecede genetik farklılaşma (GST= 0,223) tespit edilmiştir.

RAPD markırları ile yaptığımız çalışmanın popgene analiz sonuçlarına göre genetik çeşitliliği en yüksek olan Beşsaray populasyonu (% polimorfizm: %84,80, Ne'nin genetik çeşitliliği: 0,1725) ve en az genetik çeşitliliğe sahip olan populasyon Ekşisu populasyonu (% Polimorfizm: %58,40, Ne'nin genetik çeşitliliği: 0,1676) olmuştur. Bütün populasyonlar için % polimorfizm: %99,20, Ne'nin genetik çeşitliliği: 1,2750 olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre öncelikli olarak Ekşisu populasyonu için in situ koruma yapılması gerekmektedir. Bu sayede türe ait çeşitliliğin korunarak diğer jenerasyonlara aktarılması sağlanacaktır. *S. erzincanicus* populasyonları arasında genetik farklılaşmaların belirgin olduğu buna karşın populasyonların

genetik farklılıkları ile coğrafik mesafeler arasında belirgin bir ilişkinin olmadığı söylenebilir.

İnsan aktiviteleri ve habitat kaybı populasyon büyüklüğünü azaltan ana sebeplerdir. Populasyon büyüklüğünün azalması aynı soydan birleşmenin artmasına yol açabilir. Bu durum düşük genetik çeşitlilik ile sonuçlanır. Doğa korumadaki temel amaç mümkün olduğunca genetik çeşitliliği koruyarak türlerin evrimsel potansiyellerini korumaktır. Populasyon genetik yapısı ve üreme kapasitesinin koruma stratejileri için önemli etkileri vardır. Türlerin genetik çeşitliliklerini koruyarak hayatta kalması, yeni nesiller oluşturulabilmesinde özellikle yok olma tehlikesindeki türler için koruma stratejileri gerekmektedir. *S. erzincanicus* türünde farklı populasyonlara ait bireylerde genetik çeşitlilik yüksek olmasına rağmen, türün doğal yaşam alanının bozulması türün yok olmasına neden olmaktadır. Tür IUCN kategorisine göre EN seviyesinde olması ve önceki yıllarda ortadan kaybolmuş olması türün in-situ ve ex-situ korunmasını gerektirmektedir. İn-situ koruma stratejisinde; türün yaşam alanının korunması benimsenmeli ve geride kalan tür populasyonları restore edilmelidir. Populasyona bırakılan atıklar, sazlıkta yapılan kurutma işlemleri, alanın mesire yeri olarak ve otlatma alanı olarak kullanılıyor olması populasyona zarar vermektedir. İnsan etkisiyle populasyonun bozulması engellenmelidir. Populasyonlara fideleme yöntemi ile genç bireyler kazandırılarak populasyon gençleştirilmeli ve küçük populasyonlardaki birey sayıları artırılmalıdır. Ancak türün habitatlarının insan aktivitelerinin yapıldığı yerlere yakın olması, otlatma alanlarında olması, karayoluna yakın olması gibi nedenlerden dolayı in situ korunması oldukça zordur.

S. erzincanicus türü, yüksek tehlike kategorisinde olduğundan ex-situ olarak da korunması gerekir. Düşük gen akışı, türün populasyonları arasında genetik bağlantının zamanla kopmasına neden olmaktadır. Türe ait tüm populasyonlardan alınan tohumların örneklem büyüklüğü yeterli düzeyde olmalıdır. Genetik çeşitlilik ve adaptasyonu artırmak amacıyla farklı populasyonlardan gelen genetik materyaller koruma altına alınmalıdır. Aksi takdirde geçmiş yıllarda da olduğu gibi türün ortadan kaybolması ve zaman içerisinde neslinin tükenmesi muhtemeldir.

KAYNAKLAR

- Aka, G.E., “Balıkesir Çevresinde Doğal Yayılış Gösteren ‘Zarar Görebilir’ Kategorisindeki *Lilium candidum* L. (Liliaceae)’da RAPD Tekniği Kullanarak Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi ve Koruma Stratejilerinin Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniv., *Fen Bil.Enst.*, Balıkesir (2005).
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. And Creagan, P.B., “Length Polymorphism of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean”, *Genetics*, 132, 1131-1139 (1992).
- Altun, Z., “DNA İşaretleyiciler ve Türkiye de Orman Ağaçları Islahında Kullanımı”, *Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü*, 2: 20-36 (2006).
- Anonim, Ülkesel Genetik Kaynaklar Araştırma ve Geliştirme Projesi, Toplantı Raporu, Haziran, Ankara (2003).
- Aslay, M. ve Kandemir, A., “*Sonchus erzincanicus* Matthews (Asteraceae) Türünün Korunması Üzerine Bir Çalışma”, EÜFBED-*Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (1) (2009).
- Aygün, F., “*Vicia canescens* Populasyonları Arasındaki Varyasyonunun RAPD ve FAMES ile Analizi”, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 13-14 (2006).
- Bardakçı, F., “Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers”, *Türk J.Biol*, 25: 185-196 (2001).
- Britten, R.J., “Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic Groups”, *Science*, 231, 1393-1398 (1996).
- Caetano-Anolle’s, G., Bassam, B.J. And Gresshoff, P.M., “DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers”, *Bio/Technology*, 9: 553-557 (1991).
- Chen, J., Lamikanra, O., Chang, C.J., Hopkins, D.L., “Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Xylella fastidiosa* Pierce’s disease and oak leaf scorch pathotypes”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1688-1690 (1995).
- Cheng Lin, R., Ding, Z.S., Liliang, B.L. And Kuang, T.Y., “A rapid and efficient DANN minipreparation suitable for screening transgenic plants”, *Plant molecular Biology Reporter*, 19: 379a-379e (2001).
- Cronquist, A., “Evolution and Classification of Flowering Plants, Thomas Nelson Ltd.”, London and Edinburg, Great Britain, (1968).
- Davis., P.H., “Flora of Turkey and East Aegean Island”, ed. P.H. Davis, Edinburg, 5, 632-657, (1975).
- De Vicente, M.C. And Fulton, T., “Using Molecular Marker Technology in Studies on Plant Genetic Diversity”, Learning module, Vol 1, *Institute for Genomic Diversity/International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI)*, Cornell University, Rome, Italy, 2004.
- Ding, G., Zhang, D., Yu, Y., Zhao, L., Zhang, B., “Population Genetic Diversity and Divergence of the Halobiotic Herb *Limonium sinense* estimated by AFLP and ISSR, and Implications for Conservation”, *Plant systematics and evolution*, Springer, (2013).

- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. And Adıguzel, N., “Turkish Plants Red Data Book” , *Doğal Hayatı Koruma Derneği*, Ankara, (2000).
- Eriş, A., ve Gülen, H., “Moleküler Biyoloji (Temel Bilgiler)” , *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları*, No:98 (2004).
- Ergül, A., Marasalı, B. And Ağaoğlu, Y.S., “Molecular discrimination and identification of some Turkish grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by RAPD markers” , *Vitis*, 41, 3, 159-160 (2002).
- Fang, D.Q., Roose, M.L., Krueger, R.R. And Federici, C.T., “Fingerprinting trifoliolate Orange Germplasm Accessions with Isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeats” , *Theo. Appl. Genet.*, 95, 211-219 (1997).
- Farooq, S. And Azam, F., “Molecular markers in plant breeding-I: concepts and Characterization” , *Pak. J. Biol. Sci.*, 5 (10): 1135-1140 (2002).
- Ferreira, V., Matos, M., Correia, S., Martins, N., Gonçalves, S., Romano, A. And Pinto-Carnide, O., “Genetic diversity of two endemic and endangered Plantago species” , *Biochemical Systematic and Ecology, Elsevier*, 51: 37-44, (2013).
- Fischer, M. And Matthies, D., “RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae)” , *Amer. Jour. Bot.*, 85: 811-819 (1998).
- Frankman, R., “Genetics and Conservation Biology” , *C. R. Biologies.*, 326: 22-29 (2003).
- Glick, B.R. And Pasternak, J.J., “Molecular Biotechnology (Principles and Applications of Recombinant DNA)” , *ASM Press.*, Washington, D.C. (1998).
- Guirao, P., Moya, A. And Cenis, J.L., “Optimal use of random amplified polymorphic DNA in estimating the genetic relationship of four major *Meloidogyne* spp.” , *Phytopath.*, 85: 547-551 (1995).
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C. And Ramesh, B., “Review Moleküler Markers and Their Application in Wheat Breeding” , *Plant Breeding*, 118: 369-390 (1999).
- Gülşen, O. ve Mutlu, N., “Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım Alanları” , *Alatarım*, 4 (2): 27-37 (2005).
- Halden, C., Nilsson, N.O., Rading, M.I. And Sall, T., “Evaluation of RFLP and RAPD Markers in a Comparison of Brassica Napus Breeding Lines” , *Theor. Appl. Genetics*, 88: 123-128 (1994).
- Hamrick, J.L., “Plant population genetics and evolution” , *Am. J. Bot.*, 69: 1685–1693 (1982).
- Hamrick J.L. and Godt MJW, “Allozymediversity in plantspecies. In: Brown AH, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds)” , *PlantPopulation Genetics, Breeding, and GeneticResources, SinauerAssociates*, Sunderland, 43-63, (1989).
- Hamrick, J.L., Godt. M.J.W. And Shermen-Broyless, S.L., “Factors İnfluencing Levels of Genetic Diversty in Woody Plant Species” *New Forests*, 6- 95-124 (1990).
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., “Conservationgenetic of endemicspecies. In: Avise, J.C.,Hamrick, J.L. (Eds.)” , *Conservation Genetics*. Chapman&Hall, New York, 281–304 (1996).

- Harlan, J.R., De Wet, J.M.J., “On the Quality of Evidence for Origin and Dispersal of Cultivated Plants” , *Curr. Antropol.*, 14: 51-62 (1973).
- Hui Lui, B., “Statiscal Genomics Linkage, Mapping and QTL Analyses” , *CRC Pres*, Boca Raton, New York, (1998).
- Holderegger, R., Stehlik, I. And Abbott, R.J., “Molecular analysis of the Pleistocene history of *Saxifraga oppositifolia* in the Alps” , *Molec. Ecol.*, 11: 1409-1418 (2002).
- <http://www.dogadernegi.net/our-work/species-conservation/plants/erzincan-milkwort> (23.05.2015)
- IUCN, International Union for the Conservation of Nature, <http://www.iucn.org/what/biodiversity/about/>, (Ziyaret Tarihi: 15.03.2015)
- Jarvis, P., Lister, C., Szabo, V. And Dean, C., “Integration of CAPs markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*” , *Plant Mol. Biol.* 24: 685–667 (1994).
- Kandemir, A., Makbul, S., Türkmen, Z. And Yılmaz, M., “Morphological, Anatomical and Palynological Investigation on *Sonchus erzincanicus* Matthews (Asteraceae)” , *Turk J. Bot.*, 30, 405-411 (2006).
- Karagöz, A., Zencirci, N., Tan, A., Taşkın, T., Köksal, H., Sürek, M., Toker, C. ve Özbek, K., “Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması ve Kullanımı” , *Türkiye Ziraat Mühendisleri 7. Teknik Kongresi*, 155-177 (2010).
- Kaya, Y. ve Aksakal, Ö., “Endemik Bitkilerin Dünya ve Türkiye’deki Dağılımı” , *Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi*, 7 (1): 85 (2005).
- Kaya, Z., Kün,E. And Güner,A., “National Plan for in-situ Conservation of Plant Genetic Diversity in Turkey” , *Milli Eğitim Basım Evi*, İstanbul (1997).
- Kence, A., Türkiye’nin Biyolojik Zenginlikleri (giriş) (2005).
- Kimura M., Crow J.F., “ The number of alleles that can be maintained in a finite population” ,*Genetics*, 49 (1964), pp. 725–738 (1978).
- Klug, W.S., Cummings,R.M. And Spencer,A.C., “Genetik Kavramalar, 8.cilt” , Çeviri Editörü/Editörleri, Öner,C., Sümer,S., Öner,R., Ögüş,A., Açık,L., Ankara, 664, (2011).
- Langella, O., (2000) <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php>.
- Leventer, S., “Trakya bölgesi’nde bulunan *Sonchus* L. (Asteraceae) türleri üzerinde morfolojik, anatomik ve palinolojik araştırmalar” , Trakya Üniversitesi, *Fen Bil.Ens.*, Yüksek Lisans Tezi, 1-2, Edirne (2012).
- Li, G. And Quiros, C.F., “Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) a New Marker System Based on a Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica” , *Theor Appl Genet.*, 103: 455-461 (2001).
- Loveless, M.D. and Hamrick, J.L.,. “Ecological determinants of geneticstructure in plantpopulations” , *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 15: 65-95 (1984).
- Mathieu-Daudé, F., Ralph, D. and McClelland, M., “Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA” , ed. Taylor, G. R., *CRS Press*, Boca Raton (1997).
- Mavi, A., Yiğit, N., Yiğit, D. And Kandemir, A., “Antioxidant and antimicrobial activity of Turkish endemic *Sonchus erzincanicus* extracts” , *Turk J. Biol.*, 35: 243-250 (2011)

- Mueller, U.G. And Wolfenbarger, L.L., “AFLP genotyping and fingerprinting” , *Trends Ecol. Evol.*, 14: 389-394 (1999).
- Nei, M., “Genetic Distance Between Populations” , Am. Nat., 106: 283-292 (1972).
- Nybom, H. And Bartish I.V., “Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants”, *Persp Plant Ecol Evol Syst.*, 3:93–114 (2000)
- Özaydın, S., “Rapid (Rastgele Arttırılmış Polimorfik Dna) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği” , *DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6: 113-130 (2004).
- Özhatay, N., “Türkiye’nin BTC Boru Hattı Boyunca Önemli Bitki Alanları” , 133-140 (2006).
- Özhatay, N., Byfield, A. ve Atay, S., “Türkiye’nin 122 Önemli Bitki Alanı, Doğal Hayatı Koruma Vakfı” , İstanbul, 438 (2005).
- Özgen, U., Sevindik, H., Kazaz, C., Yiğit, D., Kandemir A., Seçen, H. And Çalış, İ., “A New Sulfated α -Ionone Glycoside from *Sonchus erzinicanicus* Matthews” , *Molecules*, 15: 2593-2599 (2010).
- Özgen, M., Adak, M.S., Karagöz, A. ve Ulukan, H., “Bitki Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımı” , *Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi Kitapçığı*, 28 (2): 309-344, Ankara (1995).
- Öztürk, M.A. ve Seçmen, Ö., “Bitki Ekolojisi”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, İzmir (1992).
- Paran, I. And Michelmore, R.W., “Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce” , *Theor. Appl. Genet.*, 85: 985-993 (1993).
- Payne, S.J., “Microsatellite Analysis: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA” , ed. Taylor, G.R., *CRS Press*, Boca Raton, New York (1997).
- Putz, F.E., Blate, G.M., Redford, K.H., Fimbel, R. And Robinson, J., “Tropical Forest Management and Conservation of Biodiversity an Overview” , *Conservation Biology*, 15 (1): 7-20 (2001).
- Rafalski, A., Tingey, S.V. And Williams, J.G.K., “RAPD Markers” , *Plant Molecular Biology Manual*, 114: 1-8 (1994).
- Rafalski, J.A. And Tingey, S.V., “Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites, and Machines” , *Trends Genet.*, 9: 275-279 (1993).
- Rafalski, J.A., Tingey, S. And Williams, J.G.K., “RAPD Markers-A New Technology for Genetic Mapping and Plant Breeding” , *Ag Biotech News and Information*, 3: 645-648 (1991).
- Reisch, C., Poschlod, P. And Wingerder, R., “Genetic differentiation among populations of *Sesleria albicans* Kit” *Ex Schultes (Poaceae) from ecologically different habitats in central Europe*, *Heredity*, 91: 519-527 (2003a).
- Reisch, C., Poschlod, P. And Wingerder, R., “Genetic variation of *Saxifraga paniculata* Mill. (Saxifragaceae): molecular evidence for glacial relict endemism in central Europe” , *Biological Journ. The Linnean Society*, 80: 11-21 (2003b).
- Rodrigues, L., Berg, C., Póvoa, O. And Monteiro, A., “Low genetic diversity and significant structuring in the endangered *Mentha cervina* populations and its

- implications for conservation, *Systematics and Ecology*, Elsevier, 50: 51-61 (2013).
- Song, Z.Q., Li, X., Wang, H., Wang, J., “Genetic diversity and population structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge in China revealed by ISSR and SRAP”, *Genetica*, 138, 241–249 (2010).
- Sözen E. ve Özeydin, B., “A Study Of Genetic Variation In Endemic Plant *Centaurea wiedemanniana* By Using RAPD Markers”, *Ekoloji*, 19 (77):, 1-8 (2010).
- Stuber, W.C., “Biochemical and molecular markers in plant breeding” *Plant Breeding News*, 9: 36-61 (1992).
- TAGEM, “Genetik Kaynakların Ex-situ Korunması Projesi” (2009).
- Trindade, H., Sena, I., Gonçaves, S. And Romano, A., “Genetic diversity of wild populations of *Tuberaria majör* (Cistaceae), an endangered species endemic to the Algarve region (Portugal), using ISSR markers”, *Bioch. Systm. Ecology*, 45: 49-56 (2012).
- Uzun, A., Terzioğlu, S. ve Uzun, S., “Orman Ekosistemlerinde Biyoçeşitliliğin Korunması ve İzlenmesi” , *I. Ulusal Akdeniz Orman ve Çevre Sempozyumu*, 126-135 (2011).
- Vos, P., Hogers, R. And Bleeker, M., “AFLP: a new technique for DNA Fingerprinting”, *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407-4414 (1995).
- Vuylsteke, M., Peleman, J.D And JT van Eijk, M., “AFLP technology for DNA Fingerprinting” , *Nature Protocols*, 2, 6: 1387 (2007).
- Waugh, R. And Poweil, W., “Using RAPD Markers for Crop Improvement” , *Focus*, 10: 186-191 (1992).
- Welsh, J. And Mc Clelland, M., “Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers” , *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213-7218 (1990).
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, A. and Tingey, S.V., “DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers” , *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535 (1990).
- Wright, “Evolution and genetics of populations: The theory of gene frequencies” , Chicago Univ., *Chicago Press*, Chicago, USA (1969).
- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B., Ye, Z. H. And Mao, J. X., POPGENE, “the user-friendly shareware for population genetic analysis”, *Molecular biology and biotechnology centre*, University of Alberta, Canada, 10, (1997).
- Yıldırım, N., “Çoruh vadisinde yetişen kabarcık (*Vitis vinifera*) çeşidi populasyonları arasındaki genetik ve morfolojik farklılığın belirlenmesi” , Atatürk Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enst.*, Doktora Tezi (2010).
- Yıldırım, A. ve Kandemir, G., “Genetik Markırlar ve Analiz Metodları” , *Bitki Biyoteknolojisi II –Genetik Mühendisliğ ve 106 Uygulamaları*, Ed: Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M., Selçuk, Üniversitesi Basımevi, (2001).
- Yiğit, D., Yiğit, N., Özgen, U., Aktaş A.E. ve Kandemir A., “Endemik Bir Tür Olan *Sonchus erzincanicus* Matthews’in Antikandidal Aktivitesinin Araştırılması” , *XVI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT)*, 110 (2006).
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. And Labuda, D., “Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification” *Genomics*, 20, 176-183 (1994)

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Gümüşhane de doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Ankara da tamamladı. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü bitirdi. Evli ve bir kız çocuğu annesidir.