

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BALIKESİR ÇEVRESİNDE DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN  
“ZARAR GÖREBİLİR” KATEGORİDEKİ *Lilium candidum* L. (Liliaceae)’DA  
RAPD TEKNİĞİNİ KULLANARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN  
BELİRLENMESİ VE KORUMA STRATEJİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşah Emine AKA

Balıkesir, Ekim-2005

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BALIKESİR ÇEVRESİNDE DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN  
“ZARAR GÖREBİLİR” KATEGORİDEKİ *Lilium candidum* L. (Liliaceae)’DA  
RAPD TEKNİĞİNİ KULLANARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN  
BELİRLENMESİ VE KORUMA STRATEJİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşah Emine AKA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fazıl ÖZEN

Sınav Tarihi : 28/ 10/ 2005

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Fazıl ÖZEN (Danışman, BAÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yard. Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ (BAÜ)

Balıkesir, Ekim-2005

## ÖZET

### BALIKESİR ÇEVRESİNDE DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN “ZARAR GÖREBİLİR” KATEGORİDEKİ *Lilium candidum* L. (Liliaceae)’DA RAPD TEKNİĞİNİ KULLANARAK GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ VE KORUMA STRATEJİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Gülşah Emine AKA  
Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fazıl ÖZEN)  
Balıkesir, 2005

*Lilium candidum*, bir doğu Akdeniz floristik elementi olup tıpta, süs bitkisi yetiştiriciliğinde ve parfümeri sanayinde ekonomik öneme sahip bir bitkidir. Türkiye’deki doğal popülasyonları doğadan sökülerek tahrip edildiği için “zarar görebilir” tehlike kategorisinde değerlendirilmektedir. Yapılan arazi gözlemleri, *Lilium candidum*’un Balıkesir çevresindeki doğal popülasyon yoğunluğunun da Türkiye’de yetiştiği diğer lokalitelerdeki gibi, giderek azalma eğiliminde olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma, Balıkesir çevresinde doğal yayılış gösteren *Lilium candidum*’un beş farklı popülasyonunun genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve elde edilen veriler yardımı ile taksonun korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada ilk önce, araştırma bölgesinden toplanan *Lilium candidum* doku örneklerinden genomik DNA (gDNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen gDNA’lar, RAPD-PCR Yöntemi ile çoğaltılarak popülasyonların genetik çeşitliliği, popülasyonlar arası genetik benzerlikler ve farklılıklar ortaya konmuştur. Elde edilen verilerin analizinde Popgene Version 1.31 istatistik programı kullanılmıştır.

Balıkesir çevresinde doğal yayılış gösteren *Lilium candidum* popülasyonları arasındaki genetik mesafe 0,0464–0,3619 değerleri arasında değişmektedir. Polimorfik bant oranı % 74,47 olarak tespit edilmiştir. Popülasyonlar arasında polimorfizm oranı en fazla olan Keçidere popülasyonunun (% 25,53), öncelikli koruma gerektiren popülasyon olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple, başta bu popülasyon olmak üzere, *Lilium candidum*’un Balıkesir çevresindeki tüm popülasyonlarının *in situ* ve tarlada koruma (agroekosistemler) stratejileri ile korunmasının uygun olacağına karar verilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada, *Lilium candidum*’un Türkiye’den yeni bir yayılış alanı rapor edilmektedir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** *Lilium candidum*, genetik çeşitlilik, RAPD, zarar görebilir, koruma stratejisi, Balıkesir, Türkiye.

## ABSTRACT

### USING RAPD TECHNIQUE THE DETERMINATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF VULNERABLE SPECIES *Lilium candidum* L. (Liliaceae) NATURALLY DISTRIBUTED IN BALIKESIR AND ITS SURROUNDINGS AND DEVELOPING CONSERVATION STRATEGIES

Gülşah Emine AKA  
Balıkesir University, Institute of Science  
Department of Biology

(MSc. Thesis / Supervisor: Prof. Dr. Fazıl ÖZEN)  
Balıkesir, Turkey-2005

Being an eastern Mediterranean floristic element, *Lilium candidum*, is used by medical, by ornamental plant cultivation, and by perfumery industry. Since its populations in Turkey are being uprooted the nature, they are considered in the “vulnerable” category of danger. By means of the field observations, it’s found out that the natural population density of *Lilium candidum* in the ambient of Balıkesir also tends to diminish, just as the other localities in Turkey.

This study is aimed in order to identify the genetic variation of five different populations of *Lilium candidum*, which finds a natural habitat in the surroundings of Balıkesir; and utilizing the gathered data resulting from that study, to develop some strategies intended for conserving the taxon.

In the first step of this study, genomic DNA (gDNA) isolation is performed upon the genomes of the sample tissues taken from *Lilium candidum*, which was previously collected at the investigation area. Those isolated gDNAs are amplified via RAPD-PCR method, so as to manifest the genetic variation of the populations, and to disclose the similarities and the differences between those populations. Popgene Version 1.31 statistics software is used to analyze the collected data.

The genetic distance among the *Lilium candidum* populations, which demonstrate a natural propagation in the surrounding of Balıkesir, varies in the interval of 0,0464–0,3619 values. The studies also show that the polymorphic band ratio amounts to 74.47 %. Keçidere population (25.53 %), having the uppermost polymorphic ratio, is found out to be the population that requires a protection of first priority. For that reason, it is determined that it is appropriate to protect each of the *Lilium candidum* populations in the surroundings of Balıkesir, with strategies of *in situ* and on-farm (agroecosystems) protection, giving the highest priority to the Keçidere population.

Furthermore, this study reports a new distribution area of *Lilium candidum* in Turkey.

**KEY WORDS:** *Lilium candidum*, genetic diversity, RAPD, vulnerable, conservation strategy, Balıkesir, Turkey.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	i
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>KISALTMALAR</b>	v
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	vii
<b>TABLO LİSTESİ</b>	viii
<b>ÖNSÖZ</b>	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1 Genel Bilgiler	1
1.1.1 <i>Lilium candidum</i> L.' un Bitki Sistematığındeki Yeri	2
1.1.2 <i>L. candidum</i> 'un Betimi	2
1.1.3 <i>L. candidum</i> 'un Dünyadaki ve Türkiye'deki Yayılışı	4
1.1.4 <i>L. candidum</i> 'un Habitat ve Ekolojisi	4
1.1.5 <i>L. candidum</i> 'un Kullanım Alanları ve Ekonomik Önemi	5
1.1.6 <i>L. candidum</i> 'un Durumu ve Tehlike Kategorisi	6
1.1.7 <i>L. candidum</i> ile İlgili Yapılan Çalışmalar	6
1.2 Biyolojik Çeşitlilik ve Önemi	8
1.3 Genetik Çeşitlilik ve Koruma Ekolojisi	9
1.3.1 Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması	10
1.3.1.1 <i>In Situ</i> Koruma	11
1.3.1.2 <i>Ex Situ</i> Koruma	12
1.4 Moleküler Markırlar	12
1.4.1 Moleküler Markırların Özellikleri	12
1.4.2 Protein Markırlar	13
1.4.3 DNA'ya Dayalı Markırlar	14
1.5 Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Temel Moleküler Yöntemler	14
1.5.1 RFLP (Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi )	14

1.5.2 AFLP (Çoğaltılmış Parça Polimorfizmi)	16
1.5.3 SSR (Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit)	16
1.5.4 SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)	17
1.5.5 RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)	17
1.5.5.1 RAPD Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları	24
1.5.5.2 RAPD Tekniğinin Uygulama Alanları	25
1.6 Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi	26
<b>2. MATERYAL VE METOT</b>	<b>28</b>
2.1 Materyal	28
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar	28
2.1.2 Kullanılan Çözeltiler	28
2.1.2.1 gDNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	28
2.1.2.2 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	29
2.1.2.3 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler	29
2.1.3 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler	30
2.1.4 Bitki Materyali	30
2.1.5 Kullanılan Araç ve Gereçler	34
2.2 Metot	35
2.2.1 Bitki Örneklerinin Toplanması	35
2.2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması	35
2.2.3 Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu	35
2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi	37
2.2.5 DNA Miktar Tayini	38
2.2.6 RAPD-PCR	38
2.2.7 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi	39
<b>3. BULGULAR</b>	<b>40</b>
3.1 gDNA	40
3.2 RAPD Profilleri	40
3.3 Verilerin Analizi	48
<b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA</b>	<b>52</b>
<b>5. EK</b>	<b>60</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>61</b>

## KISALTMALAR

<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Polimorfizmi)
<b>AP-PCR</b>	Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction
<b>bp</b>	Base Pair (Baz çifti)
<b>CTAB</b>	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DAF</b>	DNA Amplification Fingerprinting
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile Su
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleosid trifosfat
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EtBr</b>	Etidyumbromür
<b>gDNA</b>	Genomik DNA
<b>GEKYA</b>	Gen Koruma Yönetim Alanı
<b>IPGRI</b>	International Plant Genetic Resources Institute (Uluslararası Bitki Genetik Kaynakları Enstitüsü)
<b>kb</b>	Kilobaz
<b>OD</b>	Optik Densite
<b>PCR (PZR)</b>	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>PCL</b>	Plant Cell Lysis Solution
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi)
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>SDS</b>	Sodium Dodesil Sulfate
<b>SSCP</b>	Single Strand Conformational Polymorphism (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarı)

<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Trisborateetilendiamintetraasetikasit
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method with Aritmetic Mean
<b>UNCED</b>	United Nations Conference on Environment and Development
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VU</b>	Vulnerable (Zarar Görebilir)





## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil Numarası</b>	<b>Şekil Adı</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1	<i>Lilium candidum</i> 'un Genel Görünümü	3
Şekil 1.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	19
Şekil 1.3	RAPD Reaksiyonu	20
Şekil 2.1	Araştırma Bölgesinin Haritası (Kepsut çevresi)	32
Şekil 2.2	Araştırma Bölgesinin Haritası (Edremit-Kuşadası)	33
Şekil 3.1	İzole Edilen gDNA'ların Agaroz Jeldeki Görünümü	41
Şekil 3.2	OPA 13 Primeri İle Elde Edilen RAPD Profili	42
Şekil 3.3	OPA 10 Primeri İle Elde Edilen RAPD Profili	43
Şekil 3.4	OPC 11 Primeri İle Elde Edilen RAPD Profili	44
Şekil 3.5	OPA 12 Primeri İle Elde Edilen RAPD Profili	45
Şekil 3.6	OPC 02 Primeri İle Elde Edilen RAPD Profili	46
Şekil 3.7	OPB 12 Primeri İle Elde Edilen RAPD Profili	47
Şekil 3.8	RAPD-PCR Analizinde Kullanılan Veri Matrisi	49
Şekil 3.9	Populasyonlar Arasındaki Genetik Mesafeyi Gösteren Dendrogram	51

## TABLO LİSTESİ

<b><u>Tablo Numarası</u></b>	<b><u>Tablo Adı</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 2.1</b>	gDNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	28
<b>Tablo 2.2</b>	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Kompozisyonları	29
<b>Tablo 2.3</b>	RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Enzimler	30
<b>Tablo 2.4</b>	RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve Nükleotid Dizileri	30
<b>Tablo 2.5</b>	<i>L. candidum</i> 'un Toplandığı Lokalizasyonlar, Koordinatlar ve Toplanma Tarihleri	31
<b>Tablo 2.6</b>	Kullanılan Araç-Gereçler, Marka ve Modelleri	34
<b>Tablo 2.7</b>	RAPD-PCR Şartları	38
<b>Tablo 2.8</b>	RAPD-PCR Döngü Koşulları	39
<b>Tablo 3.1</b>	Primerlere Göre Oluşan Bant Sayıları ve Polimorfizm Değerleri	48
<b>Tablo 3.2</b>	<i>L. candidum</i> Populasyonlarının Polimorfizm Oranları	50
<b>Tablo 3.3</b>	<i>L. candidum</i> Populasyonları Arasındaki Benzerlik İndeksi	50
<b>Tablo 3.4</b>	Populasyonlar Arası Genetik Mesafe	51

## ÖNSÖZ

Tezimi hazırlamakla geçirdiğim uzun ve yoğun çalışma sürecinde, beni deneyim ve bilgileriyle yönlendiren, karşılaştığım bütün güçlükleri aşmamda yardımcı olan, ihtiyaç duyduğum her an değerli zamanlarını ayırıp, ilgilerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Fazıl ÖZEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın laboratuvar imkanlarını sağlayan Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi Müdürü Doç. Dr. Hakan KÖÇKAR'a, bu merkezde çalışan Ferit KARANFİL'e ve diğer çalışanlara teşekkür ederim.

2004/26 no'lu projeye tezime maddi destek sağlayan Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu'na ve tezimi Hızlı Destek Programı ile destekleyen TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu'na teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin iskeletini oluşturan laboratuvar çalışmalarının temelini atmamda yardımcı olan ve tezime her türlü materyal desteğini sağlayan Cumhuriyet Üniversitesi öğretim elemanları Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI'ya ve Araş. Gör. Efkân BAĞDA'ya teşekkür ederim.

Tezimi başlangıç aşamasından itibaren değerli fikirleriyle destekleyen ve veri analizlerinde yardımcı olan sevgili hocam Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ'e gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın bana yol gösteren hocalarım Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a, Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a, Yard. Doç. Dr. Mehmet KORKMAZ'a ve teçhizat desteği sağlayan hocalarım Doç. Dr. Dilek AZAZ ile Yard. Doç. Dr. Tülin AŞKUN'a teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Edremit Milli Parklar Müdürü Basri AVCI'ya, beni her konuda destekleyen ve çalışmalarımın yardımcı olan arkadaşlarım Funda AKÇAY ve Oğuz SEYHANLI ile Araş. Gör. Selma ÇELEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımın her anında maddi ve manevi olarak beni destekleyen, beni bugünlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimle...

Balıkesir, 2005.

Gülşah Emine AKA

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Genel Bilgiler

*Lilium L.* ile ilgili tarihi kayıtlar incelendiğinde, milattan binlerce yıl önce eski Girit Uygarlığı zamanında Knossos'ta zambak yetiştiriciliğinin yapıldığı [1], Mısırlıların cenaze törenlerindeki çelenklerde zambak kullandıkları, Romalıların dini törenlerde kullanmak üzere saray bahçelerinde nergis ve sümbüllerle birlikte değişik amaçlar için zambak yetiştiriciliği yaptıkları görülmektedir. Sümerlerin 5000 yıl önceye dayanan yazıtlarından, İran'ın Susa kenti çevresinin zambak tarlalarıyla kaplı olduğu ve bu kente bitkinin adının verildiği anlaşılmaktadır [2]. Ortaçağda ise saflığı ve güzel kokusu nedeni ile Madonna Lily (Meryem Ana Zambağı) olarak isimlendirilen *Lilium candidum L.*, kiliselerde temizlik, saflık ve çalışma simgesi olmuş, dini konuları işleyen ressamlar için önemli bir kaynak oluşturmuştur [3,4].

Zambaklar, ilk çağlardan beri çeşitli amaçlar için kullanılmakta olup özellikle son yıllarda ticari alandaki önemleri giderek artmaktadır [2]. Uzun yıllar doğadan sökülerek satılan değişik zambak türlerinin soğanları son yıllarda üretilmeye de başlanmıştır. Zambaklar, soğanlı bitkiler içinde üretimi en kolay yapılan bitkilerin başında gelmektedir [5].

*Lilium candidum*, diğer birçok zambak türü gibi Kuzey Yarımküre'de yaygın olup Akdeniz iklim kuşağı bitkisidir. Bu nedenle subtropik kıyı kesiminde doğal olarak yetişmesinin yanında, değişik ekolojik koşullara nispeten uyabilen bir zambak türü olarak dünyanın değişik bölgelerinde tarla ölçeğinde kültürü yapılmaktadır. Buna karşın, bitkinin sağlıklı gelişme gösterebilmesi için optimum ekolojik ihtiyaçlarının mutlaka göz önüne alınması gerekmektedir [6]. Akdeniz Bölgesi kıyılarının dağlık kesimlerinde beyaz zambak çiçeklerinin iyi açmasının ve ovalık kesimlere oranla daha iyi soğanlar oluşturmasının, yaz aylarının daha serin, kış aylarının ise daha ılık olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim Akdeniz

Bölgesi'nin ılık kış ve yağışlı ilkbahar ayları ile sıcak yaz ayları başlangıcı *L. candidum* için uygun bir yetiştirme iklimi oluşturmaktadır [2]. Bitkinin sağlıklı gelişme gösterebilmesi için iklimin yanı sıra yetiştiği toprakların ekolojik özelliklerinin de göz önüne alınması gerekmektedir [6].

### 1.1.1 *Lilium candidum* L.' un Bitki Sistematikteki Yeri

*L. candidum*, Liliaceae familyasından çok yıllık otsu, monoik bir bitkidir. Bitkinin Cronquist Sistemi'ne göre [7] bitkiler alemindeki yeri aşağıdaki şekildedir:

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Liliopsida (Monocotyledoneae)
Subclassis	: Liliidae
Ordo	: Liliales
Familya	: Liliaceae
Genus	: <i>Lilium</i> L.
Species	: <i>Lilium candidum</i> L.

### 1.1.2 *L. candidum*'un Betimi

Çok yıllık, soğanlı, soğanlar üst üste uzamış çok sayıda pullardan oluşmuş, zarsız. Gövde 50-130 cm. morumsu, 2-12 çiçekli. Yapraklar spiral dizilişli, parlak ve tüysüz, alttakiler (bazal yapraklar) ters mızraksı (genellikle yaz sonu veya sonbaharda ortaya çıkar ve kış boyunca kalıcıdır), geri kalanlar (çiçeklenen gövde uzadıkça ilkbaharda gelişenler) daha kısa, üsttekiler mızraksı veya tam yumurtamsı. Çiçekler huni şekilli, geriye kıvrık, kar beyazı. Çiçek örtü yapraklarının parçaları şeritsiden ters mızraksıya değişen, sadece üst 1/3'ünde geriye kıvrık, 55-65 (-80) x 6-13 (-20) mm. Filamentler 45-50 (-57) mm. Anterler 9-11 mm; polenler altın sarısı. Stilus 35-50 (-60) mm. Meyveler yeşil renkli, 6 köşeli ve lokulusid kapsül.

Tohumlar çok sayıda ve düz, bir meyvede 120 kadar bulunabilmekte, boyutları 10-15 x 6-11 mm. Çiçeklenme Mayıs ayı [8].

*Lilium candidum*'un genel görünümü Şekil 1.1 'de verilmektedir.



**Şekil 1.1** *Lilium candidum*'un Genel Görünümü

### 1.1.3 *L. candidum*'un Dünyadaki ve Türkiye'deki Yayılışı

*L. candidum* dünyada doğal olarak Lübnan, Suriye, Filistin, Yunan Adaları, Balkanlar ve ülkemizde Güneybatı Anadolu'da yayılış göstermektedir. Doğu Akdeniz flora elementidir. Türkiye'deki yayılışı; C1 Aydın: Milas'tan Söke'ye 35 km. Bafa Gölü, 10–20 m., Dudley (34984)! Muğla Samsun Dağı kuzey yamacı, Güzelçamlı yukarısı, D. gözlem. C2 Muğla: Marmaris'ten Datça'ya, Hisarönü'nden 35 km., 300 m. Dudley (35427) ! C3 Antalya: Termessos, 1300 m., J.M. Davidson! Adalar: Kos, mt. Asfendiou yukarısı Dhikion, 600 m., D. (40460)! Rodos, Schacht, (cult., photo!). Berggren tarafından A2 (E) İstanbul'da (Sarıyer ile Büyükdere arasında), Kotschy tarafından İçel (Bolkar Dağı) ve Chiovenda tarafından C8 Mardin'den kaydedilmiştir [8].

Ayrıca Temeltaş [6]'ın çalışmasında *L. candidum*'un Balıkesir'in Kepsut ilçesinin Sarıçayır, Sarıfakılar, Keçidere, Mehmetler ve Durak köyleri civarında yayılış gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma için yaptığımız arazi gözlemleri sonucunda, birkaç yıl önce büyük bir yangın geçiren Sarıçayır ve Sarıfakılar Köyleri çevrelerinde bitkinin tamamen ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bu yayılış alanlarına ilave olarak, arazi çalışmalarımız sırasında *L. candidum*'un Edremit (Balıkesir)'in Kazdağları eteklerindeki Mehmetalan Köyü, Kaşıkçı Tepesi civarında da doğal olarak yetiştiği tespit edilmiştir.

Balkan Yarımadası ve Doğu Akdeniz'de doğal yayılış göstermesine rağmen, bitkinin kökeninin nereden geldiği kesin olarak bilinmemektedir. *L. candidum* ülkemizde ak zambak, beyaz zambak, mis zambağı ve bey zambağı gibi isimlerle de anılmaktadır. Türkiye'deki beyaz çiçekli tek zambak türüdür [1].

### 1.1.4 *L. candidum*'un Habitat ve Ekolojisi

Beyaz zambak, kireçtaşı, konglomeralı ve kumtaşı araziler üzerindeki makiliklerde ve kışın yapraklarını döken ormanlarda özellikle kayalık alanlarda 10–1300 m. yüksekliklerde bulunur [6]. Ekolojik istekleri bakımından kalsiyumca



zengin, iyi geçirimli ve nötr reaksiyonlu (pH=7) toprakları tercih etmektedir. Bol miktarda ışık alan ancak direkt güneş ışığı almayan alanlarda iyi gelişme gösterir. Vejetatif dönemde doğrudan güneş altında kalan bitkilerin tepe meristemleri kurumaktadır. Genders ve Hale *L. candidum*'un çiçek sapı tabanının güneş ışığından korunması gerektiğini, bu nedenle tarlalarda siper sağlayan bitkiler arasında iyi geliştiğini belirtmektedirler [4]. Beyaz zambak, bulunduğu ortamları akçakesme (*Phillyrea latifolia* L.), yasemin (*Jasminum fruticans* L.), koca yemiş (*Arbutus andrachne* L.), karaçalı (*Paliurus spina-christi* Miller.), mazı meşesi (*Quercus infectoria* Olivier subsp. *boissieri* (Reuter) O.Schwarz) gibi bitkilerle paylaşmaktadır [6]

### 1.1.5 *L. candidum*'un Kullanım Alanları ve Ekonomik Önemi

*L. candidum*, günümüzde özellikle süs bitkisi olarak yetiştirilmekte ve soğanı büyük ölçüde ihraç edilmektedir. Beyaz zambağın tıbbi bitki olarak kullanımının da uzun bir geçmişi vardır. Ancak doğada ender olarak bulunması sebebiyle modern tıpta nadiren kullanılmaktadır [9]. Zambak soğanı, dahilen; idrar arttırıcı, balgam söktürücü, haricen; çıban olgunlaştırıcı olarak, suyu (su buharı distilasyonu ile elde edilir) cilt lekelerinin ve sivilcelerin tedavisinde kullanılır. Soğanı ve çiçeği damar büzücü, yatıştırıcı, adet ve balgam söktürücü ve deri yumuşatıcıdır [9-11].

Bitkinin başlıca kullanımı, yüksek müsilajlı özelliği nedeniyle haricidir. Sütle kaynatılarak yapılan yara lapası, ülser, harici iltihaplar, tümörler vb. için kullanılır [9,10]. Ağustos ayında toplanan soğanları taze veya kurutulmuş olarak kullanılabilir [9,10]. Çiçekleri tamamen açıldığında toplanır ve taze olarak özsu (usare), merhem veya tentür yapımında kullanılır [9]. Soğanları, yanıkları ve çürükleri iz bırakmadan tedavi eder. Taze çiçeklerinin demlenmesi ile elde edilen sıvı, çürükleri tedavi etmede losyon olarak kullanılır. Son zamanlarda kökü ödeme karşı kullanılmaktadır. Polenleri ise epilepsi tedavisinde kullanılmaktadır [12].

Çiçeklerinden elde edilen yağdan, koku verici olarak parfümeride yararlanılmaktadır [10,13]. *Senecio aureus* ile birlikte modern tıpta genellikle kadın hastalıklarında kullanılır. Eklem ve romatizma ağrılarında merhem olarak kullanılır.



Çiğ soğanı acıdır ancak bu acılık kurutulduğunda veya ısıtıldığında ortadan kalkar. Soğanı pişirildiğinde, etli, özlü ve şekerlidir. Uzakdoğu'da birçok insan tarafından beslenme amacıyla kullanılmaktadır. Beyaz zambağın soğanı nişasta bakımından zengindir ve bir sebze gibi patatesle benzer şekillerde kullanılabilir. Ayrıca, nasırlarda, akciğer kanserinde, uterus kanserinde, mide bulantısında, spazmlarda, tümörlerde kullanıldığı, ağrı kesici ve diüretik özellikte olduğu rapor edilmektedir [10].

### 1.1.6 *L. candidum*'un Durumu ve Tehlike Kategorisi

*L. candidum*, Türkiye için endemik olmamakla birlikte tükenme tehlikesi altında olan bir türdür. Özellikle alçak rakımlarda insanlarla iç içe olan yerlerde yetiştiğinden soğanları köylüler tarafından yoğun bir şekilde sökülüp satılmaktadır. Yetiştigi alanların çoğunda populasyon yoğunluğu zayıftır [6]. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'na göre VU (vulnerable) tehlike kategorisinde yer almaktadır [14]. VU kategorisi, son 10 yıl veya 3 nesil içinde populasyonda % 20 oranında bir azalma olacağı düşünülen; yayılış alanı 10 lokasyondan fazla olmayan, yayılış alanı toplam 20000 km<sup>2</sup>, olgun birey sayısı 10000'den az veya arazi çalışmaları sırasında 100 yıl içinde populasyonunda % 10 azalma olabileceği düşünülen, doğada orta vadeli gelecekte yüksek tehdit altında olan taksonları bulunduran gruptur [14].

### 1.1.7 *L. candidum* ile İlgili Yapılan Çalışmalar

*L. candidum* üzerinde günümüze değin çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu çalışmaların beyaz zambağın yetiştiriciliği ve çoğaltılması, çeşitli biyokimyasal özellikleri, sitolojisi ve sitokimyası üzerinde yoğunlaştığı dikkati çekmektedir. Literatürde rastlanan çalışmalar aşağıda belirtilmiştir:

Uzun, Çukurova Bölgesi'nde Mis Zambak (*Lilium candidum* L.) yetiştiriciliği ve sorunları üzerine [3], Erdoğan ve ark., Türkiye orijinli *L. candidum* soğanlarındaki alkaloidler üzerine [15], Karamanoğlu, içinde *L. candidum*'un da bulunduğu

Türkiye’de doğal olarak yetişen zambak türleri üzerine [16] çalışmalar yapmışlardır. Eisenreichova ve ark., *L. candidum*’dan izole edilen bileşiklerin potansiyel karsinojenik ve inhibitör aktivitesi ile ilgili [17], *L. candidum*’dan elde edilen etanolün anti-maya aktivitesi üzerine [18], *L. candidum*’un sterollerini ile ilgili [19], *L. candidum*’dan elde edilen Lilalin flavanoid alkolü üzerine [20], *L. candidum*’dan elde edilen yeni bir açillenmiş kaemferol ile ilgili [21], *L. candidum*’dan elde edilen jatropham 5- $\alpha$ - $\beta$ -d-glucopyranoside üzerine [22], *L. candidum* soğanlarından pirolin ve pirolidin elde edilmesi ile ilgili [23], beyaz zambağın tıbbi bitki olarak kullanımı konusunda [24], beyaz zambağın iyileştirici etkisi ile ilgili [25], *L. candidum*’un içerikleri ile ilgili [26] ve *L. candidum*’daki pirolin türevleri ile ilgili [27] çalışmışlardır. Rosetti ve Suria, *L. candidum* soğanlarındaki sigma-metilen glutamik asit konusunda [28], Satou ve ark. *L. candidum* soğanındaki steroidal saponinler konusunda [29], Mimaki ve ark., *L. candidum* soğanındaki yeni steroidal içerikler üzerine [30] çalışmalar yapmışlardır. Reznikova, *L. candidum*’un mikrosporogenez boyunca anter dokuları arasındaki ilişki ile ilgili [31], Saureland, *L. candidum*’a çeşitli mayoz safhalarında röntgen ışığı verildikten sonra meydana gelen nicel etkiler üzerine [32], Avramov, *L. candidum* soğanının diüretik etkileri ile ilgili [33] çalışmışlardır. Reznikova ve ark., *L. candidum* anterlerindeki dokuların mikrosporogenez ve gametogenez boyunca DNA ve histonları ile ilgili sitokimyasal bir çalışma yapmışlardır [34]. Pieroni, İtalya’daki yukarı Lucca eyaletinde, içlerinde *L. candidum*’ un da bulunduğu tıbbi bitkilerin geleneksel kullanımları üzerinde çalışmış, *L. candidum*’un *Herpes zoster*’e karşı antiviral aktivite gösterdiğini tespit etmiştir [35]. Lipp, içlerinde *L. candidum*’un da yer aldığı çeşitli bitki türlerinin olgunlaşmış ve olgunlaşmasını tamamlamamış polenlerinin absisik asit ve pirolin içeriklerini analiz etmiştir [36]. Tuyl ve ark., *L. candidum* ve *Nerine* bitkisinin geniş kapsamlı hibridizasyonunda üreme aracı olarak ovaryum kültürü ve in vitro polinasyon konusunda [37], *Lilium*’un türler arası hibridizasyonunda poliploidinin araştırılması üzerine [38], izoelektrik odaklanma ile *Lilium* cinsinde türler arası hibridlerin belirlenmesi ve akrabalıkların tayin edilmesi ile ilgili [39] ve *Lilium*’un kromozom sayısının duplikasyonunda kolşisine alternatif olarak orizalin kullanılması ile ilgili [40] çalışmalar yapmışlardır. Kvednich ve Karavets, *Lilium* cinsi ve türlerindeki sinergidlerin fertilizasyonu üzerine [41], Haladova ve ark., *L. candidum*’da dimerik pirolin alkaloidler konusunda [42], *L. candidum* soğanındaki

steroidal saponinler üzerine [43], *L. candidum*'daki yeni azot içerikli bileşikler ile ilgili [44] ve *L. candidum* petallerindeki steroidal saponinler konusunda [45] çalışmışlardır. Kruczkowska, doku kültürü ile bitkinin toprak üstü kısımlarından bazı zambak çeşitlerinin üretilmesi konusunda [46], Semerikhina ve Bugara, Liliium ve pancarın mikrospor tetratlarındaki DNA'nın fiziksel ve kimyasal karakteristikleri konusunda [47] çalışma yapmışlardır. Ayrıca Erdoğan ve ark., *L. candidum*'daki etiolin steroidal alkaloidi üzerine çalışmışlar [48], Eisenreichova ve ark., *L. candidum* soğanlarından yeni bir steroidal saponin bulmuşlardır [49]. Marasek ve Orlikowska içlerinde *L. candidum*'un da bulunduğu dokuz zambak türünün karyolojisi üzerinde çalışmışlardır [50]. Rosetti, *L. candidum* polenlerindeki serbest aminoasitlerle ilgili bir çalışma yapmıştır [51]. Lisa ve ark., *L. candidum*'un antifungal etkisi üzerine [52], Lombard, *L. candidum* polenlerindeki RNA bileşenleri ile ilgili [53], Masterova ve ark., *L. candidum*'daki dikarboksilik asitler üzerine [54] çalışmalar yapmışlardır. Nagy ve ark, *L. candidum*'dan yeni bir flavanoid bulmuşlar [55], *L. candidum* flavanoidlerinin karakterizasyonu ve bitkinin değişik bölgelerinde dağılımı konusunda [56] çalışmışlardır. Uhrin ve ark., *L. candidum* içerikleri ile ilgili bir çalışma yapmışlardır [57].

## 1.2 Biyolojik Çeşitlilik ve Önemi

Ekosistemler, canlılar ile cansız varlıkların doğada birbirinden ayrılmaz bir şekilde oluşturdukları ilişkiler sistemi olduğuna göre, her canlının ekosistem içindeki yeri tartışmasız son derece önemlidir. Genel olarak, bir ülkedeki tüm bitki ve hayvan türleri, hem o ülkenin, hem de dünyanın biyolojik çeşitliliği olarak tanımlanır [58]. Biyolojik çeşitliliğin bir unsuru olan yeryüzündeki canlı türlerinden herhangi birisinin varlığını sürdürebilmesi, bir diğersinin var olması ile yakından ilişkilidir. Doğadaki bu ilişkiler sisteminde beklenmeyen bir bozulma ortaya çıktığında, meydana gelebilecek tahribat sadece bozulmanın ortaya çıktığı ekosistem diliminde değil, dalga dalga ekosistemin tamamında kendisini hissettirecektir. Sonuçta, doğal dengedeki bu beklenmeyen bozulma ise her bir canlının yaşamını tehlike altına sokacaktır.

Bir ülkenin varlığı ve ekonomik kalkınmasında yeraltı kaynakları (madenler, kömür, petrol, doğalgaz, yeraltı suları vs.) o ülke için ne denli önemli ise, yerüstü kaynakları da o derece önemlidir. Yerüstü zenginliklerinden birisi olan biyolojik çeşitliliğin bu bakış açısından önemi açıkça ortadadır.

### 1.3 Genetik Çeşitlilik ve Koruma Ekolojisi

Normal olarak bir türe ait çeşitli populasyonlar ve bu populasyonların içinde de birbirinden farklı binlerce birey bulunur. Bir türe ait her birey, türün başka bireyleri ile ortak genleri paylaşmasına rağmen taşıdığı pek çok gen bakımından farklı bir genetik yapıya (genotip) sahiptir. Bir türün populasyonları arasında da morfolojik, anatomik, fizyolojik, biyokimyasal ve davranış özellikleri bakımından çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Populasyonlar arasındaki farklılıklar bir genin farklı allellerinden ve bu allellerin populasyonlar arasında farklı frekans dağılımlarından ileri gelmektedir. Bir tür içindeki genetik farklılıkların tümü “genetik çeşitlilik” olarak adlandırılmaktadır [59].

Biyolojik çeşitliliğin bileşenlerinden biri olan genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ekosistemlerin sağlıklı ve verimli olması ve sürdürülebilir işletimi için en önemli şartlardan birisidir. Tür içi genetik çeşitliliğin fazlalığı, değişen çevre şartlarına uyum açısından bir güvencedir. Populasyon içi ve populasyonlar arasındaki genetik farklılıklar, bitki ve hayvanların kendi çevrelerinde ortak evrimleşmesinin bir sonucudur. Bu çeşitliliğin yapılanmasının ve boyutunun tespiti, türlerin varlıklarını korumaları açısından zorunludur.

Genetik çeşitliliğin fazla olması iki açıdan önemlidir [59]:

- Genetik çeşitliliği fazla olan türler ve ırklar, zamana ve yere göre değişen çevre koşullarına daha başarılı uyum yapma yeteneğine sahiptir.

- Genetik çeşitliliği fazla olan türler ve ırklar, bilimsel ve teknolojik gelişmelere bağlı olarak, değişen insan isteklerini karşılamada daha etkili ve daha yararlı olurlar.

Koruma, “Conservation” sözcüğü latineden gelmektedir. Con: “Bir arada”, Serviare: “Korunmak” demektir. Koruma ekolojisi alanına giren konular arasında, yararlı biyolojik maddelerin sürekli üretimini sağlayacak alanlar ve yöntemler ile yenilenemeyecek kaynakların yok oluşunu önleme yer almaktadır. Koruma ekolojisi ayrıca biyokimyasal döngüleri de açıklamaya çalışır. Çünkü enerji veya maddenin alınımı ya da dağıtım olayı, oluşum kadar hızlı olmaktadır. Böylece yenilenebilir kaynakların koruma ekolojisi, sadece ender türlerin korunmasını içermemektedir. Aksine sınırlı kaynakların dengeli şekilde kullanılması, kaynakların arttırılması da koruma ekolojisi alanına girmektedir [60].

### 1.3.1 Bitki Genetik Kaynaklarının Korunması

Koruma, gen havuzunda bulunan çeşitliliğin, gerçek ya da potansiyel kullanımına kadar etkin biçimde saklanması ve genetik çeşitliliğin insanlığın kullanımına sunulmasıdır. Korunacak öncelikli bölgeler seçilirken, genetik çeşitliliği en fazla olan bölgeler dikkate alınmalıdır. Bu bölgeler o türe ait bütün genetik varyasyonları bulundurduklarından türün devamlılığı için adeta bir sigorta özelliğindeki alanlardır [61].

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

*Ex situ* koruma; genetik çeşitlilik unsurlarının doğal habitatları dışında korunmasıdır. Konuya ilişkin bilimsel teknikler 1960’lı ve 1970’li yıllarda (Frankel ve Bennet, 1970; Frankel, 1973; Frankel ve Hawkes, 1975) geliştirilmiş ve 1974

yılında IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute)'nin kurulmasını sağlamıştır [61].

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

Bir başka deyişle, *ex situ* koruma; hedef alanda hedef türlerin örnekleme ve depolanması çalışmalarını kapsadığı halde; *in situ* koruma, hedef türlerin karşılaşıldığı alanda seçilmesi, yönetilmesi ve kaydedilmesi çalışmalarını içerir [61].

Bu iki temel koruma sistemine ilave olarak, özellikle bitkilerin korunmasındaki bir diğer koruma yöntemi kültür alanlarında (agroekosistemler) yapılan korumadır [62].

### 1.3.1.1 *In Situ* Koruma

*In situ* koruma; doğal kaynakların kendi doğal yaşam alanlarında korunmaları anlamına gelmektedir. Bu tür koruma sisteminde, doğal yaşam alanlarındaki popülasyonlar çeşitliliğini devam ettirerek sistemdeki bitkiler evrimlerini sürdürebilmekte ve yeni özellikler taşıyan bitkilerin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır [61].

Türkiye'de bitki genetik kaynaklarının korunmasında *ex situ* çalışmalar daha önce başlamasına karşın, projeli *in situ* koruma çalışmalarına ancak son 10 yılda başlanabilmiştir. Genetik çeşitliliğin yerinde korunması projesi 1993 yılında başlamış ve 5 yıl sürmüştür. Bu projede Ceylanpınar Tarım İşletmesi alanlarında buğdayın 5 yabancı akrabası için 6 adet alan "Gen Koruma Yönetim Alanı (GEKYA)" olarak seçilmiştir. Türkiye'de *in situ* yöntemlerle orman alanlarında ayrılmış 3.749.673 hektar alan koruma altındadır [61].



### **1.3.1.2 Ex Situ Koruma**

Bitki genetik kaynaklarının korunmasında en yaygın uygulama alanı bulan strateji *ex situ* koruma (tohum depolama, in vitro depolama, DNA depolama, çiçek tozu depolama, tarla gen bankası ve botanik bahçeleri) olmuştur. Bunun en önemli nedeni, bir taksonu doğal yayılış alanı dışında korumanın daha ucuz ve daha kolay olmasıdır [61].

Türkiye’de *ex situ* koruma çalışmaları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesinde 1964 yılında başlamış, 1972 yılında aynı enstitü bünyesinde kurulan ulusal tohum gen bankasında ülkemizin bitki genetik kaynaklarına ait tohum örnekleri uzun süreli (temel koleksiyonlar) ve kısa ya da orta süreli (aktif koleksiyonlar) korunmaya başlamıştır. Çalışmaların ilk aşamasını bitki türlerinin fitocoğrafik ve agroekolojik dağılımını belirlemek ve en yüksek farklılık gösteren bitki örneklerinin toplanması oluşturmuştur. Temel koleksiyon örnekleri Ulusal Tohum Gen Bankası’ndaki soğuk odalarda -18 /-20 °C, uzun süreli aktif koleksiyon örnekleri ise 0 °C’de orta süreli olmak üzere iki set halinde saklanmaktadır. Günümüzde Ulusal Gen Bankası’ndaki materyal sayısı 50000 örnek kadardır ve yaklaşık 600 cinse dağılmış örnekleri içermektedir [61]. Türkiye’de Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü dışında, Tarla Ürünleri Merkezi Araştırma Enstitüsü’ndeki ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi bünyesindeki gen bankalarında da koruma çalışmaları sürdürülmektedir [63].

## **1.4 Moleküler Markırlar**

### **1.4.1 Moleküler Markırların Özellikleri**

Bir popülasyonda polimorfik olan özellik ya da karakterler moleküler markırlar olarak bilinir. Polimorfizm ise bir lokusta belirlenebilen kalıtsal varyasyon olarak tanımlanır. Bir moleküler markır için genellikle istenilen özellikler şu şekilde sıralanabilir:

1. Oldukça polimorfik olmalı,
2. Kodominant kalıtım özelliği göstermeli (bu özellik, diploid organizmalarda homozigotik ve heterozigotik durumları ayırt etmeye yardımcı olur),
3. Genomda sıklıkla bulunmalı,
4. Genom boyunca dağılım göstermeli,
5. Ayırıcı olarak tarafsız olmalı,
6. Kolay uygulanabilir olmalı (örneğin, çabuk uygulama veya maliyeti bakımından düşük olmalı),
7. Kolay ve hızlı analiz sağlamalı (örneğin, prosedürler otomasyona uygun olmalı),
8. Oldukça fazla çoğaltılabilmeli,
9. Elde edilen veriler laboratuvarlar arasında kolayca değiştirilebilmeli.

Bu kriterlerin tümüne uygun bir moleküler markır henüz bulunamamıştır [64].

#### 1.4.2 Protein Markırlar

Canlı metabolizmasında tür veya hücreye özgü bir enzimin, aynı biyokimyasal olayları katalizleyen ve farklı genler tarafından kodlanan, farklı elektrik yüklerine sahip çoklu formları izoenzim (izozim) olarak adlandırılmaktadır. Bir enzimin uygun substrat ve kofaktörlerle gerçekleştirilen reaksiyon ürünlerinin, ürünlere özgü uygun boyama ve elektroforez yöntemleri ile açığa çıkarılması, izozim-protein araştırma markırlarının araştırılma tekniğinin temelini oluşturmaktadır [65].

Bazen protein markırlardan olan izozim ve allozim analizleri birbirine karıştırılmaktadır. İzozim, aynı kimyasal substrata bağlanabilen enzimlerdir fakat genellikle aynı genin ürünlerine bağlanmazlar. İzozimleri farklı hücre organellerinde veya farklı yaşam safhalarında aktifleştirebilirler. Allozimler ise, ortolojik genler tarafından üretilen izozimlerdir. Fakat bir veya daha fazla aminoasit farkı nedeniyle farklı allelik kompozisyonlara sahiptirler. Allozim elektroforezleri, 1960 yılından itibaren bakterilerden, hayvan ve bitki türlerine kadar pek çok organizmada başarılı



bir şekilde kullanılmaktadır. Çalışmalar, çeşitli sahaları (fizyoloji, biyokimya, ekoloji, genetik gibi) ve amaçları (populasyon yapısı, üreme sistemi, hibridizasyon ve sistematik gibi) kapsamaktadır. Allozim analizleri, nispeten aydınlatıcı ve uygulaması kolaydır [64].

İzozim analizleri, hızlı ve ucuz yöntemlerdir. Ancak bu teknolojinin birçok dezavantajı da vardır. Türe özgü alleller daima bulunmayabilir ve çoğu türde genomun büyük bir kısmının çalışılmasına uygun izozim markırlarının sayısı yetersiz kalmaktadır. Polimorfizmin eksikliği ve markır belirlenmesi için çeşitli metotların kullanımı gerektiğinden, izozim analizleri genetik farklılığın belirlenmesi ile sınırlıdır. İlave olarak, izozimler fenotipik olarak benzer kültürlerin arasındaki farklılığın belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır [66].

### **1.4.3 DNA'ya Dayalı Markırlar**

DNA'ya dayalı markırlar, DNA seviyesinde bireylerin karşılaştırılmasını mümkün kılmaktadır. Fenotipe dayalı yöntemlerin karmaşıklığı ve zorluğu, DNA'ya dayalı yöntemlerle genotipin direkt olarak belirlenmesi yoluyla aşılabilmektedir. Bu nedenle, DNA'ya dayalı genetik markırlar birçok genetik sisteme katılmışlardır. DNA'ya dayalı markırların yararları, DNA'ya dayalı polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan teknolojilerle geniş bir şekilde ortaya konmuştur [67].

## **1.5 Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Temel Moleküler Yöntemler**

### **1.5.1 RFLP (Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi )**

DNA temelli ilk belirteç sistemi 1970'li yılların ortalarında kullanılan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniğidir [68]. Restriksiyon endonükleaz enzimleri doğal olarak bakterilerde bulunan ve bakteriyi yabancı DNA'ya karşı koruyan enzimlerdir. DNA zinciri bu enzimlerle kesildiğinde, tanıma

dizilerinin farklı sayılarda olması ve tanıma dizileri arasındaki insersiyon ve delesyonlardan dolayı, farklı büyüklükte DNA parçaları oluşur. Eğer iki DNA molekülü, nükleotid dizilerinde küçük farklılıklara sahiplerse, bu restriksiyon haritalarının karşılaştırılmasıyla ortaya çıkarılır [69,70].

Bir DNA segmentinin yaklaşık her 100 baz çiftinde bulunan nükleotid dizisi bireylerde değişiklik gösterir. Bu durumun sonucu olarak, DNA nükleotid bazlarının dizisindeki bu bireysel farklılıklar, DNA boyunca restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerinin bulunuşunda da farklılıklara yol açabilir. Sadece bireysel farklılıklar değil, mutasyonların da yol açabileceği bilinen restriksiyon sıralarının değişmesi veya bulunmayışı da bir polimorfizm oluşturur. Bu durumda da, restriksiyon fragment büyüklükleri, bu bölgeler için farklı olur [71].

RFLP uygulamasında, analiz edilecek DNA dizileri seçilir, DNA hazırlanır ve belli bir restriksiyon endonükleaz ile kesilir. Oluşan DNA bantları elektroforezde ayrılır ve blotting tekniği ile uygun bir membrana aktarılır. Daha sonra radyoaktif işaretlenmiş bir proba hibridizasyon gerçekleştirilir ve restriksiyon fragmentleri belirlenir [65].

İzozimler ve morfolojik karakterlere benzer olarak RFLP, bitki materyallerinin belirlenmesinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Üstelik RFLP, bireyler arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik DNA seviyesinde direkt olarak çalışma avantajı sunar [66,72-74]. RFLP analizi doğrudan dizi analizine göre daha basit ve ucuz olmakla birlikte, dizinin nasıl evrimleştiği ile ilgili daha az bilgi verir [70]. Ayrıca, polimorfizmin belirlenmesi için radyoizotopların kullanımı ve sonuçların alınmasının uzun süre gerektirmesi, RFLP analizinin en önemli dezavantajlarından. RFLP analizi, büyük miktarda (2-10 µg) saf DNA gerektirmektedir. Laboratuvar ve materyal masrafları, bitki gen kaynaklarının karakterizasyonunda RFLP'nin kullanılmasını sınırlandırmaktadır [66]. Ayrıca, radyoizotop kullanım zorunluluğu, DNA blotlama ile ilgili laboratuvar ekipmanı ve büyük miktarda DNA gerektirdiğinden, uygulaması oldukça zor bir tekniktir [75].

### 1.5.2 AFLP (Çoğaltılmış Parça Polimorfizmi)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği, RFLP ve RAPD tekniklerinin bazı dezavantajlarını gidermek amacıyla 1993 yılında geliştirilmiştir [76,77]. Çoğaltılmış parça polimorfizmi, RFLP tekniğinde olduğu gibi restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA fragmentlerinin selektif çoğaltımına dayanır [78].

AFLP tekniği uygulanırken; genomik DNA seyrek ve sık kesim yapan iki ayrı restriksiyon endonükleazla kesilir. Restriksiyon bölgelerinde genomik DNA'nın uçlarına iki özel adaptör bağlanır. Ön seçilmiş çoğaltma ve bunu izleyen seçilmiş PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çoğaltması gerçekleştirilir ve oluşan bantlar poliakrilamid jel elektroforezinde gözlemlenir [77].

Keygene tarafından geliştirilen AFLP tekniği, bitki ve hayvan ıslahı, tıbbi tanı ve adli tıp araştırmalarını içeren birçok alanda kullanılan oldukça yüksek duyarlılığa sahip bir DNA parmak izi tekniğidir [79]. Ayrıca, filogenetik sistematik, popülasyon genetiği ve yakın akraba türleri ayırmada kullanılan güvenilir ve tekrarlanabilir bir metottur [80-82]. Bunun yanısıra, bitki ve bakterilerin genetik haritalarının düzenlenmesinde, türler arasındaki genetik farklılığın analizinde ve lokal genetik haritaların oluşturulmasında da kullanılmaktadır [83].

Bu metodun anahtar özelliği, genom üzerinde rastgele dağılım gösteren birçok farklı DNA bölgesinin eş zamanlı taramasını yapabilmesidir. Dezavantajları ise homolog allellerin teşhisini zorlaştırması ile metodun saf ve yüksek moleküler ağırlıkta DNA'ya gereksinim duymasındır [83].

### 1.5.3 SSR (Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit)

SSR (Simple Sequence Repeat) tekniği, restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesi, DNA fragmentlerin ayrılması, fragmentlerin naylon membrana transferi ve genomik dizinin görünür hale gelmesi için işaretlenmiş mikrosatellit problemlerinin hibridizasyonu şeklinde gerçekleştirilir [84].

Mikrosatellitler, büyüklükleri 1–6 baz çifti (bp: base pair) arasında değişen rastgele tekrarlı DNA dizileridir ve mikrosatellit varyasyonu, tekrarların sayısındaki farklılıklara bağlıdır. Farklı bitki ve hayvan türleri, genomlarında mikrosatellit varyasyonunun farklı dağılımlarını göstermektedirler [85].

Bu yöntem, organizmaların genetik dizisi ile ilgili ön bilgi gerektirdiğinden, pek çok tür için mikrosatellit veri tabanı oluşturulmaya çalışılmaktadır [86]. Şimdiye kadar bitki türlerinde sınırlı sayıda mikrosatellit markeri bulunmuştur [85].

#### **1.5.4 SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)**

SSCP (Single Stand Conformational Polymorphism) tekniği, 1000 bp'den daha fazla büyüklükteki tüm parçanın nükleotid dizisindeki değişimleri belirlemeyi sağlayan bir yöntemdir. SSCP iki şekilde uygulanır; birinci yöntemde DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir ve konformasyonuna göre ayrılması için jelde yürütülür. Jel, Southern Blot yapılır ve spesifik fragment hibridizasyon için prob olarak kullanılır. İkinci yöntemde ise konformasyonel jelde yürütülen spesifik parça PZR ile çoğaltılır [85].

#### **1.5.5 RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)**

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği, ilk defa 1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından uygulanan, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nu temel alan, rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı bir metottur [73]. Aynı yıllarda Welsh ve McClelland yirmi nükleotid uzunluğunda primer geliştirdikleri benzer bir yöntemi rastgele primerli polimeraz zincir reaksiyonu, AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) olarak isimlendirilmişlerdir [87]. Bu metotla aynı temele dayanan, ancak farklı olarak daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmak izi profili elde edilen bir yöntem de 1991 yılında Caetano-Anolles ve arkadaşları tarafından DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak yayınlanmıştır. Bu uygulamalarda rastgele dizili primerlerin uzunlukları,

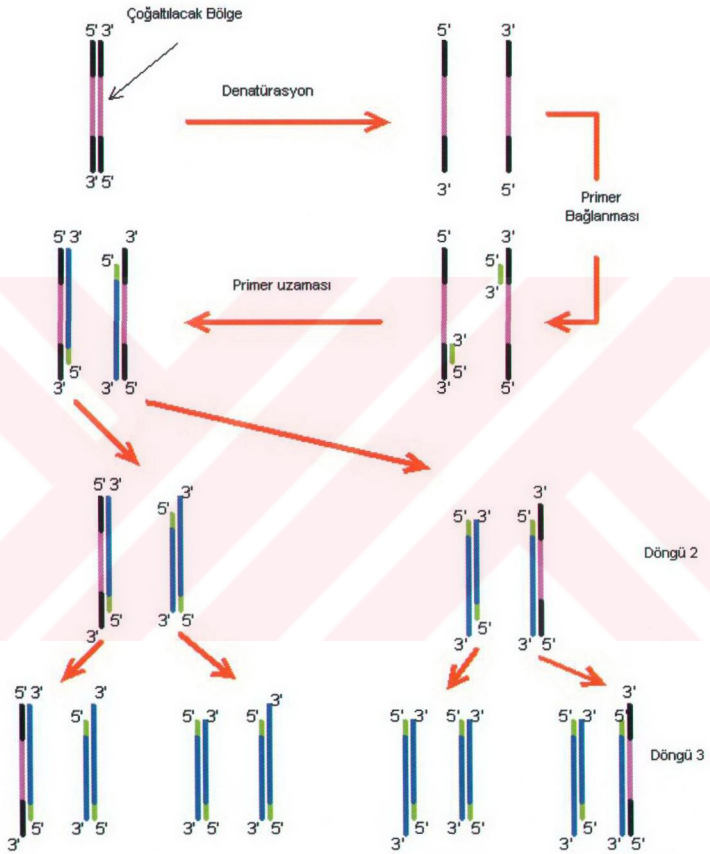
amplifikasyon şartları ve görüntüleme metodu standart PZR şartlarından farklıdır [88,89].

Polimeraz zincir reaksiyonu, Cetus Şirketi'nden bir grup bilim adamınca 1984 yılında, in vivo koşullar yerine in vitro koşullarda geliştirilen bir DNA amplifikasyon prosedürüdür. Bu metotla basit enzimatik reaksiyonlarla kompleks DNA örneğinden çok miktarda spesifik DNA fragmentleri üretilir [90-95]. PZR hücresiz gen amplifikasyonu, nükleik asitlerin klonlanması, analiz edilmesi ve modifikasyonundaki birçok standart prosedürü kolaylaştırmıştır [95].

PZR seçicilik, hassaslık ve hız olmak üzere üç özellik ile karakterize edilir [90,92-94]. Geleneksel klonlama yöntemi ile saf DNA fragmentlerinin kompleks genomdan elde edilmesi aylara varan uzun süreler gerektirir. Bu metotta, tek zincirli kalıp sekanstan spesifik DNA fragmenti sentezi için DNA polimeraz ve iki oligonükleotid primer kullanılır. Standart klonlama ve moleküler biyoloji analizlerinde alışılmış milyonlarca molekül ihtiyacına karşın, PZR az miktarda başlangıç materyaline gereksinim duyar [90,92-94]. DNA saflaştırılmasında birçok uygulama kullanılmasına karşın, PZR ham hücre lizatından bile çok iyi örnekler verir [94].

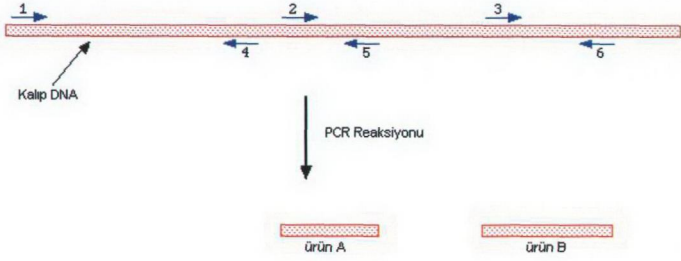
PZR, bir seri reaksiyon döngüsünden oluşur [90-95] (Şekil 1.2). Her bir döngü (1) hedef nükleik asitin tek zincirini (kalıp DNA) veren denatürasyon basamağıyla başlar. (2) Bunu takip eden annealing (bağlanma) basamağı sırasında, serbest 3'-OH ucu taşıyan tek zincirli bir oligonükleotid olan primer, komplementeri olan kalıp DNA sekansına bağlanır. (3) Sonunda da her bir primer hedef bölgedeki DNA polimeraz aktivitesiyle uzar (extension). Bu üç basamaklı döngü yeterli miktarda ürün elde edilinceye kadar tekrarlanır.

PZR ve RAPD reaksiyonlarının şematik görünümü Şekil 1.2 ve Şekil 1.3'de verilmektedir.

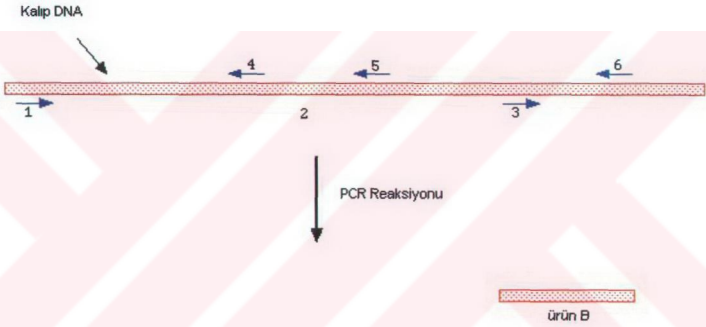


Şekil 1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) [96]

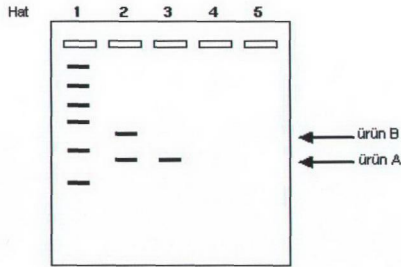
### RAPD Reaksiyonu 1



### RAPD Reaksiyonu 2



### Reaksiyon 1 ve Reaksiyon 2'nin Agaroz Jeldeki Görüntüsü



Hat 1 : DNA Standardı  
Hat 2 : Reaksiyon 1  
Hat 3 : Reaksiyon 2

Şekil 1.3 RAPD Reaksiyonu [97]

### **Şekil 1.3'ün Açıklaması**

Reaksiyon 1 ve Reaksiyon 2'de birer tane primer ve iki farklı kalıp DNA kullanılmıştır. Oklar reaksiyona katılmış olan aynı diziye sahip primerlerin kopyalarını göstermektedir. Okların yönü ise DNA sentez yönünü belirlemektedir. Sayılar, kalıp DNA'da primerlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir.

Reaksiyon 1'de 2 ve 5 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün A, 3 ve 6 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır. Reaksiyon 2'de sadece 3 ve 6 pozisyonları arasındaki bölgedeki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır. Reaksiyon 1 ve reaksiyon 2'ye eklenen primerlerin tümünden PCR sonucu bant elde edilemez. Elde edilebilen bantlar agaroz jelde görüntülenmektedir.



İstenilen bir DNA bölgesini çoğaltmak için bilinmesi gereken ilk şey, hedef DNA bölgesinin her iki ucunun nükleotid dizilerinin ne olduğudur. Böylelikle, DNA sentezinde DNA polimerazın senteze başlayacağı noktayı belirlemede kullanılan, reaksiyon için gerekli uygun primerler (öncü DNA molekülleri) sentezlenir. Primerler, DNA polimerazın senteze başlaması için ihtiyaç duyduğu serbest 3'-OH grubu taşıyan, 20–30 nükleotitten oluşmuş kısa oligonükleotidlerdir.

PZR'nun ilk basamağı, DNA iplikçiklerini ayırmak yani denatüre etmektir. Bu işlem ortalama 94–95 °C'de PZR karışımındaki iplikçiklerin birbirinden tamamen ayrılması sağlanıncaya kadar gerçekleştirilir. Böylece primerlerin bağlanması için komplementer alanların açılması sağlanmış olur.

Reaksiyonun ikinci basamağı primerlerin bağlanmasıdır. Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanabilmesi (hibritleşme) için sıcaklık 40–60 °C'ye [bağlanma (annealing) sıcaklığı] kadar düşürülür. Primer bağlanma sıcaklığı, PZR'nun başarısında önemli bir parametredir. Her bir oligonükleotid için karakteristik olan bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde, oligonükleotidin uzunluğu ve reaksiyon tamponunun iyonik gücü kadar, primerin baz kompozisyonu da önemlidir. PZR karışımında bulunan 5'-3' ve 3'-5' yönündeki iki primer, denatürasyon sonrası birbirinden ayrılan iplikçiklerdeki kendi alanlarına spesifik olarak bağlanır. Bağlanma sıcaklığının çok yüksek olduğu durumlarda primer bağlanması şekillenmezken, sıcaklığın çok düşük olduğu durumlarda da primerler yanlış yerlere bağlanabilir veya primer dimerleri oluşabilir. Bunun için optimal bağlanma sıcaklığının belirlenmesi gereklidir.

Reaksiyonun üçüncü basamağı, primer uzamasıdır. Primerlerin uzaması (extension) için kullanılan enzim, sıcak su kaplıcalarında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen DNA polimeraz I enzimidir. “*Taq* DNA polimeraz” adı verilen bu enzim, PZR sırasında DNA yüksek sıcaklık derecesinde denatüre edildiğinde bozulmadan kalır. Hibritleşme sonrasında sıcaklık *Taq* DNA polimerazın optimal çalışma sıcaklığı olan 72 °C'ye çıkarılarak ortamda bulunan dNTP'lerin yardımıyla *Taq* DNA polimerazın kalıp DNA'nın yeni zincirini sentezlemesi sağlanır. *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'-3' yönünde aktivite göstererek,

primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri de kullanarak hedef DNA diziliminin bir kopyasını yapar. Reaksiyon ısısı tekrar yükseltilerek son uzama sıcaklığı 94 °C'ye çıkarılır.

Denatürasyon-primer bağlanması-sentez bir döngüdür ve bunun sonucunda mevcut DNA iki katına çıkar. Etkin bir DNA amplifikasyonu için gerekli olan döngü sayısı genellikle 25–40 arasındadır [98]. Ancak, döngü sayısındaki artışla birlikte daha fazla sayıda farklı yapıların (örneğin değerlendirilemeyen ürünler gibi) meydana gelme olasılığı artar [99]. PZR ürünleri genellikle jel elektroforezi ile analiz edilir. Elektroforezden sonra etidyum bromid ile boyanarak elde edilen DNA bantları kolaylıkla okunabilir.

RAPD amplifikasyon prosedürü, esnek koşullar altında, rastgele bir primerle başlatılan genomik bir kalıbın analizine dayalı bir PZR reaksiyonudur [73,87]. Yöntemin temel standartları PZR'da olduğu gibidir. Ancak, kullanılan DNA kaynağı, ilgili türe ait olan genomik DNA'dır. Ayrıca PZR' dan farklı olarak RAPD tekniğinde rastgele seçilmiş 9–10 bp uzunluğunda tek bir oligonükleotid primer kullanılır ve bu primer düşük bağlanma sıcaklığında kalıp DNA'daki komplementer dizili bölgelere bağlanır. Bu profil, primer ile kalıp DNA arasındaki nükleotid dizisinin homolojisine bağlıdır. Elde edilen çok sayıda amplifikasyon ürünü agaroz jel elektroforezinde ayrılır ve EtBr (Etidyum bromür) boyaması ile UV ilüminatörde gözlenir. Kalıp DNA sonuçlarında mevcut olan veya olmayan bantlar, primer bağlanma bölgelerinin değişmesi nedeni ile açığa çıkan nükleotidler arasındaki çeşitliliği ortaya koyar. Ayrıca, primer bağlanma yerleri arasında yer alan insersiyonlar ya da delesyonlar da görülebilir [73,87].

RAPD primerleri genomda kendisine komplementer olan bölgelerle eşleşirler. Farklı genomlar karşılaştırıldığında, aralarında nükleotid farklılıkları varsa, primer bağlanma yeri değişebilir. Bu yüzden amplifiye edilen DNA parçalarının uzunlukları farklı olmakta ve elektroforez yapıldığında, bu polimorfizm, ilgili lokusta bantın bulunması veya bulunmaması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Aynı anda genomun çok sayıda farklı bölgesinde amplifikasyon olduğu için, oluşan bant kalıbından allelleri ayırmak mümkün değildir. Bu yüzden RAPD belirteçleri dominant özelliktedir [89].

RAPD tekniğinin reaksiyon koşulları son derece hassastır. Metodun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen çok sayıda farklı parametre vardır [73,87,100-104]. Kullanılan kalıp DNA'nın konsantrasyonu en önemli değişkenlerden biridir [105-107]. Ayrıca, primer konsantrasyonu [73,108]; MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu [109,110]; DNA polimeraz enzimi konsantrasyonu [100,102,111]; bağlanma sıcaklığı [67]; erime ve bağlanma sıcaklıkları arasındaki geçiş [112] ve denatürasyon, bağlanma, uzama zamanları [113] da reaksiyon sonucunda elde edilecek ürünleri etkiler. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğu için RAPD tekniğinin optimizasyonu oldukça zordur. Bu yüzden, bir bandın varlığı ancak kesin olarak belirlendikten sonra karşılaştırmada kullanılmalıdır [87].

#### 1.5.5.1 RAPD Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları

RAPD yönteminin avantajlarını şöyle sıralayabiliriz:

1. RAPD yönteminin en önemli avantajı, araştırılacak taksonun genomik DNA dizisi ile ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir [69,73,87, 114].
2. Amplifikasyonda tek bir primer seti kullanılır ve bu oligonükleotid, özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapar [69,73,87,101]. Kullanılan primerler, bütün türler için kullanılabilen evrensel primer setleridir [115].
3. Çoğalacak DNA, primer ile kalıp DNA arasındaki nükleotid dizinin homolojisine bağlıdır. Genomun kompleks yapısından çok fazla etkilenmez [86].
4. Bu yöntem sayesinde tek bir primerle dahi farklı organizmaların karşılaştırılması mümkündür [116].
5. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacağından, yakın türleri ayırma konusunda birçok yöntemden daha duyarlıdır [102]
6. RAPD tekniği, uygulanabilirliği nedeni ile pek çok örnekte karakterize edilebilir. Ayrıca, radyoaktiviteye, blotting ve DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır [102,116].
7. Kullanımı hızlı ve kolaydır [102]. Kullanılan teçhizat ve malzemeler, diğer tekniklere göre daha ucuzdur [67,75, 117].

8. Otomasyona açık bir tekniktir [67,75,118].
9. Diğer yöntemlere göre reaksiyon başına daha az miktarda kalıp DNA gerektirir (10–25 ng) [67, 117-120].
10. Polimorfizm derecesi oldukça yüksektir [72,117,119,121].
11. RFLP ve izozim analizlerinin aksine RAPD tekniği kullanılarak, Mendel kalıtımına dayalı genetik polimorfizm belirlenebilir [118].
12. DNA'ya dayalı bir markır sistemi olduğu için, çevresel varyasyonlardan, morfolojik ve izozim markırlardan doğan problemleri ortadan kaldırmaktadır [73,122, 123].

RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, belirteçlerinin dominant olması sebebiyle heterozigotları teşhis etmenin zor olmasıdır [102]. Reaksiyon birçok hassas değişkenle birbirine bağlı olduğu için, elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği düşüktür [103,104].

#### 1.5.5.2 RAPD Tekniğinin Uygulama Alanları

RAPD tekniği sadeliği, kullanışlılığı ve getirdiği diğer pek çok avantaj nedeniyle büyük ilgi görmüş ve çok sayıda araştırmacı grup tarafından kullanılmaya başlanmıştır. RAPD yöntemi, polimorfizm sayısının sınırsızlığı nedeni ile çok sayıda karakterin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. RAPD belirteçleri; genetik haritaların yapımı, populasyon yapısının genetik analizi, bireylerin parmak izi, ayırt edici özelliklerin haritasının yapımı, genomun özel bölgesi için hedef belirteç belirlemesi gibi değişik alanlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, ekoloji ve populasyon biyolojisinde de yaygın kullanım alanı bulmaktadır [100].

RAPD metodu prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının DNA parmak izini belirlemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Belirlenen parmak izleri, genotipin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, prenatal tanı, ebeveyn belirleme, kültür ve ırk belirlenmesi, adli tıp, klinik tanı, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, salgınlar ve ekoloji gibi alanlarda yoğun bir

şekilde kullanılmaktadır [100]. Ayrıca bu yöntem, klinik mikrobiyolojide, özellikle ayırt edilmesi çok zor olan alt türlerin belirlenmesinde kullanılır [124].

RAPD metodunun bitkiler için son derece geniş bir kullanım alanı vardır. Botanikte, pek çok tür için bilgi verici sistemlere gereksinim duyulduğundan, özellikle genetik varyasyon çalışmalarında başvurulan bir yöntemdir [100]. Türlerin genetik haritalarının hazırlanmasında bazen tek başına, bazen de RFLP, AFLP ve Mikrosatellit gibi diğer tekniklerle birlikte kullanılmaktadır [81].

## 1.6 Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi

Türkiye, jeolojik ve jeomorfolojik çeşitliliğe, değişik iklim ve toprak tiplerine, zengin su kaynaklarına (deniz, göl, akarsu) ve büyük yükseklik farkları nedeniyle çok çeşitli yaşam alanlarına sahip bir ülkedir. Bunlara ilave olarak, Asya ve Avrupa kıtaları arasında bir geçit oluşturduğu ve üç farklı bitki coğrafyası bölgesinin geçiş alanında bulunduğu için son derece zengin floristik bir yapıya sahiptir. Avrupa kıtasının tamamında 12 bin civarında doğal bitki türü bulunurken, yüzölçümü itibariyle bu kıtanın neredeyse 1/5'i kadar büyüklükte olan Türkiye florası 10 binin üzerinde tür ve tür altı takson ile temsil edilmektedir. Türkiye'nin bu floristik özellikleri, faunistik özellikleri ile bir arada değerlendirildiğinde bir kıta özelliği gösterdiği dikkati çekmektedir [125].

Ülkemiz bu eşsiz flora zenginliğine rağmen maalesef yasal boşlukların da etkisiyle doğal bitkilerini ciddi anlamda koruyamamaktadır. Buna karşılık özellikle Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika başta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde bitkilerin korunmasına yönelik çalışmaların son yıllarda büyük önem kazandığı dikkati çekmektedir [126-129]. Bir coğrafi bölgedeki (ülke veya kıta) biyolojik çeşitliliğin ortaya konulması ne kadar önemli ise, bir türe ait genetik çeşitliliğin belirlenmesi sonucunda geliştirilen koruma stratejilerinin yardımıyla bu biyolojik çeşitliliğin korunması da en azından onun kadar önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın iki amacı bulunmaktadır; birincisi, Türkiye’de zarar görebilir (vulnerable) kategorideki [14] bitkilerden birisi olan *L. candidum*’un Balıkesir çevresinde doğal yayılış gösterdiği 5 farklı lokalitedeki popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin araştırılmasıdır. İkinci amacı ise, elde edilen veriler ışığında taksonun korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesidir.

*L. candidum* gibi ekonomik öneme sahip ve soğanlı olduğu için doğadan kolaylıkla sökülebilen bitkilerin korunmasına yönelik çalışmalara farklı bir bakış açısı kazandırmak için yeni geliştirilen moleküler biyoloji tekniklerden yararlanmak, taksonun koruma stratejilerinin belirlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Balıkesir’in ve özellikle üniversitemizin simgesi konumdaki ve tükenme tehlikesindeki bu bitkinin doğadan yok olup gitmesinin engellenmesi de son derece önemlidir.

Bu çalışmada Türkiye’de bugüne değin kullanılan klasik ekolojik çalışmalardan farklı olarak bir moleküler biyoloji tekniği olan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Tekniği kullanılmıştır. RAPD Tekniği son yıllarda dünyada moleküler taksonomi, moleküler genetik (popülasyon genetiği) ve moleküler ekoloji (koruma ekolojisi) alanlarında çok sık kullanılan teknikler arasında yer almaktadır [73,130-152]. Bu nedenle bu çalışma, ülkemizde tükenme tehdidindeki taksonların klasik koruma tedbirleriyle korunmalarına alternatif olarak, bir taksonun genetik yapısının ortaya konulduktan sonra *in situ* koruma gerektiren lokalitelerin var olup olmadığının belirlenmesi gibi bazı önemli ipuçlarını da verebilecek bir çalışma özelliği taşımaktadır.

## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1 MATERYAL**

#### **2.1.1 Kullanılan Kimyasallar**

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, Sigma, MBI Fermentas, TaKaRa ve Riedel firmalarından temin edilmiştir.

#### **2.1.2 Kullanılan Çözeltiler**

##### **2.1.2.1 gDNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler**

Genomik DNA (gDNA) izolasyonunda kullanılan tüm çözeltiler ve tamponlar, Bio Basic firmasına ait Spin Column Genomic DNA Isolation Kit (For Plant)'den sağlanmıştır. Bu kit içinde yer alan ve gDNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve tamponlar Tablo 2.1'de görülmektedir.

**Tablo 2.1 gDNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar**

PCL Çözeltisi
PP Çözeltisi
PB Çözeltisi
Elüsyon Tamponu
Yıkama Çözeltisi
Ribonükleaz A (10 mg/ml)



### 2.1.2.2 Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan TBE çözeltisi BioBasic firmasından, yükleme boyası ve DNA standardı MBI Fermentas firmasından sağlanmıştır. Bu çözeltiler ve kompozisyonları Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.2** Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler ve Kompozisyonları

Çözelti	Kompozisyonu
TBE (10X)	0,89 M Tris Base 0,89 M Borate 0,02 M EDTA
Yükleme Boyası	10 mM Tris-HCl (pH=7,6) %0,03 Bromfenol blue %0.03 Ksilen siyanol FF %60 Gliserol 60 mM EDTA
DNA Standardı	0,1 µg/µl

### 2.1.2.3 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan çözeltiler ve enzimler, TaKaRa firmasına ait Taq PCR Core Kit'ten sağlanmıştır. Bu kit içinde yer alan çözeltiler ve enzimler Tablo 2.3'de verilmektedir.



**Tablo 2.3 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler ve Enzimler**

10X PCR Tamponu (Mg <sup>+2</sup> free)
25 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP Karışımı (her biri 2,5 mM)
Taq Polimeraz Enzimi (5 ünite/ $\mu$ l)

### 2.1.3 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler, son konsantrasyonları 50 nmol olacak şekilde sulandırılmıştır. Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri Tablo 2.4'de verilmektedir.

**Tablo 2.4 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve Nükleotid Dizileri**

Primer	Nükleotid Dizileri (5'-3')	T <sub>m</sub> Değerleri
OPA-13	CAG CAC CCA C	34 °C
OPA-10	GTG ATC GCA G	32 °C
OPA-12	TCG GCG ATA G	32 °C
OPB-12	CCT TGA CGC A	32 °C
OPC-11	AAA GCT GCG G	32 °C
OPC-02	GTG AGG CGT C	34 °C

### 2.1.4 Bitki Materyali

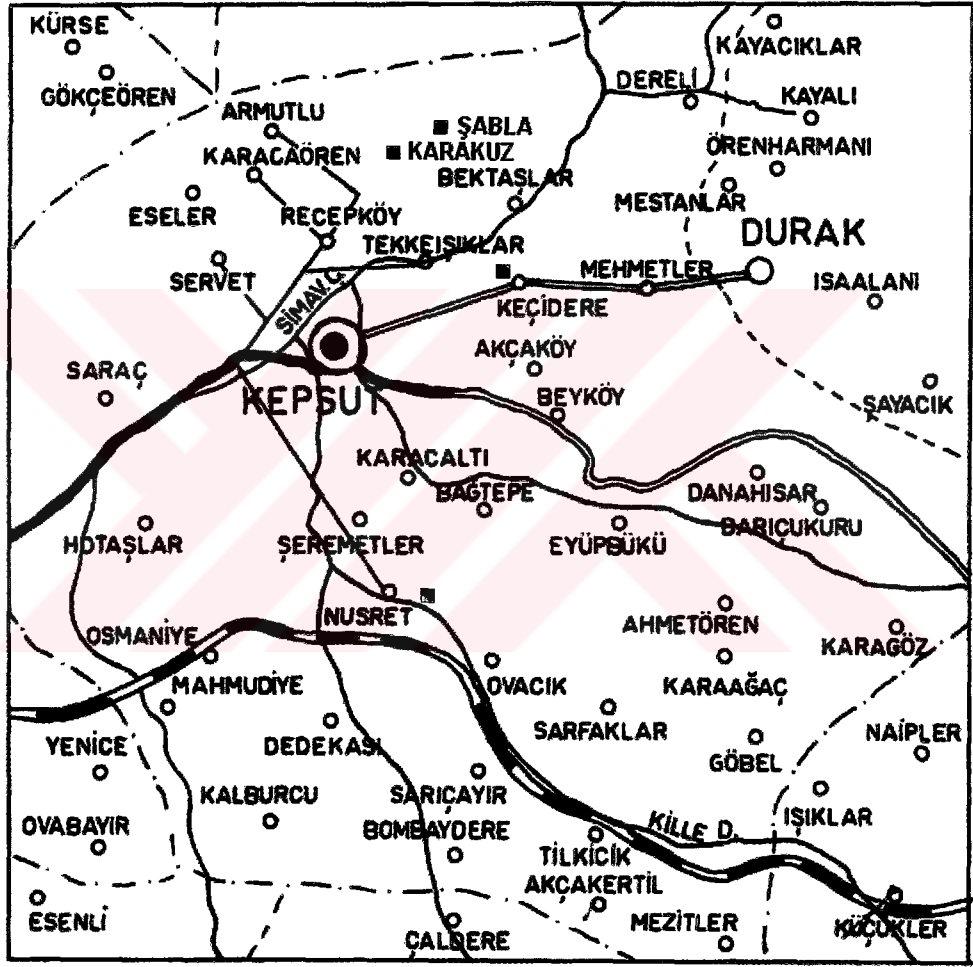
Bu çalışmanın materyalini oluşturan *L. candidum*'un doğal olarak yayılış gösterdiği lokaliteleri belirlemek amacı ile önce araştırma bölgesinde birkaç defa arazi ön inceleme gezisi yapılmış, daha sonra ise çeşitli tarihlerde gerçekleştirilen arazi çalışmaları ile popülasyonları temsil eden yeterli miktarlarda yaprak örnekleri

toplanmıştır. Seçilen yaprak örneklerinin böcek yeniği olmayan, sağlıklı ve taze örnekler olmasına dikkat edilmiştir.

Araştırma bölgesinin haritaları Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de görülmektedir. Balıkesir çevresinden toplanan *L. candidum* örnekleri araziden toplandıkları gün içinde, dış grup olarak Kuşadası (Aydın)'ndan toplanan örnekler ise silika jel içinde serin bir ortamda muhafaza edilecek şekilde ertesi gün laboratuvara getirilmiştir. Örnekler laboratuvarında distile su ile temizlenip yüzey suları havada kurutulmuş ve kilitli poşetler içinde paketlenip etiketlenerek genomik DNA izolasyonu yapıncaya kadar tazeliklerini koruyabilecekleri -80 °C'de derin dondurucuda korumaya alınmıştır. Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerinin toplandığı lokaliteler, koordinatlar ve toplanma tarihleri Tablo 2.5'de görülmektedir.

**Tablo 2.5** *L. candidum*'un toplandığı lokaliteler, koordinatlar ve toplanma tarihleri

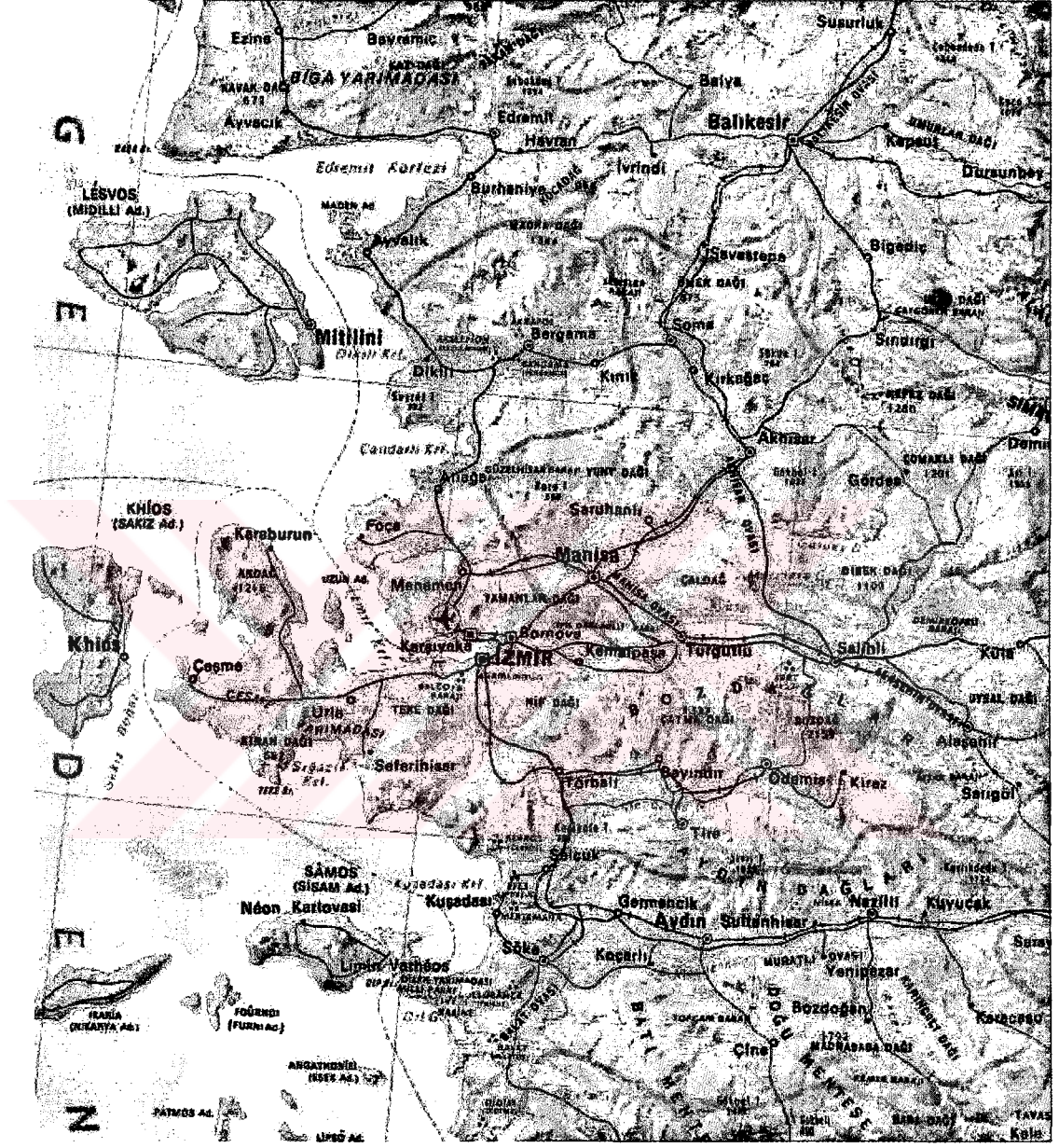
Lokalite	Koordinatlar	Toplandığı Tarih
Nusret (Kepsut)	N 39° 37' EO 28° 10'	05.06.2004
Şabla Yatakları (Kepsut)	N 39° 46' EO 28° 13'	13.05.2004
Karakuz Mevkii (Kepsut)	N 39° 45' EO 28° 13'	13.05.2004
Keçidere (Kepsut)	N 39° 42' EO 28° 12'	19.06.2004
Kaşıkcı Tepesi (Edremit)	N 39° 38' EO 26° 58'	24.05.2004
Samsun Dağı (Kuşadası)	N 37° 41' EO 27° 13'	12.12.2004



ÖLÇEK 3000 1500 0 3 6 9  
m km

■ Kepsut çevresinden *L. candidum* toplanan lokaliteler

Şekil 2.1 Araştırma Bölgesinin Haritası (Kepsut çevresi)



■ Edremit ve Kuşadası'ndan *L. candidum* toplanan lokaliteler

Şekil 2.2 Araştırma Bölgesinin Haritası (Edremit-Kuşadası)

### 2.1.5 Kullanılan Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin marka ve modelleri Tablo 2.6'da verilmiştir.

**Tablo 2.6** Kullanılan Araç-Gereçler, Marka ve Modelleri

<b>Kullanılan Araç ve Gereçler</b>	<b>Marka ve Modeli</b>
- 86 °C Ultra Derin Dondurucu	Thermo Forma ULT Freezer
- 80 °C Ultra Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low MDF-U3086S
- 25 °C Derin Dondurucu	Uğur Derin Dondurucu UDD 400-BK
Buzdolabı	Arçelik 5005 NF No-Frost
Buz Makinesi	Fiocchetti AF 10
Saf Su Cihazı	Comecta SA Destilation 3I
Hassas Terazı	Sartorius BL 2105
Vorteks	Elektromag M16
Vorteks	Velp zx <sup>3</sup>
Otoklav	Hırayama HıClave HV-85
Otoklav	Nüve OT 020
Elektroforez (Mini ve midi)	Minicell Pro EC330,Midicell Pro EC320
Elektroforez Güç Kaynağı	Consort E132
Isıtıcı Blok	FALC TD150 P2 Thermoblock
Isıtıcı Blok	Major Science MD-02N-220
Thermal Cycler	Techne Progene Ver PGN01V24-B
UV Transilüminatör	UVP GelDoc-It Imaging System
UV Visible Spektrometre	UNICAM Helios $\alpha$
Ultra Santrifüj	Hettich EBA 12R
Ultra Santrifüj	Hettich Mikro 120
Pastör Fırını	Nüve EN 500
Azot Tankı	Thermo 8037
Sıcak Su Banyosu	Elektromag M961
Mikrodalga Fırın	Arçelik Intellowave
Mikropipet Takımı	Eppendorf (0,5-10 $\mu$ l,10-100 $\mu$ l,100-1000 $\mu$ l)



## **2.2 METOT**

### **2.2.1 Bitki Örneklerinin Toplanması**

Bitki populasyonlarının örnekleme, "Rastgele Örnekleme" veya "Sistemik Örnekleme" yöntemlerinden birisi tercih edilerek yapılabilir [153]. Bu çalışmada rastgele örnekleme yolu ile toplanan bitki bireyleri arasında 5-10 m. mesafe bulunmasına dikkat edilmiştir.

### **2.2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması**

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, eppendorf tüpleri, santrifüj tüpleri, çözümler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C'de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edilmişlerdir.

### **2.2.3 Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu**

Moleküler çalışmalar için kullanılacak DNA'nın saflığı son derece önemlidir. Bu sebeple son yıllarda çok çeşitli izolasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bitkilerin kimyasal kompozisyonlarındaki farklılıklar, yeni protokollerin ortaya çıkmasına ya da var olan yöntemlerde birtakım değişikliklere gidilmesine neden olmuştur. Farklı metotlarla yapılan izolasyonlarda, elde edilen DNA miktarının düşük olması, DNA'nın kırılması ya da sekonder metabolitler tarafından kirlenmiş olması gibi sorunlar ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır.

DNA izolasyonunda yaygın olarak, Dellaporta ve ark. tarafından geliştirilen [154] metot, CTAB metodu [155] ve bu metotların modifikasyonları kullanılmaktadır. Bu metotlarla bitkilerden DNA ekstraksiyonu genellikle şu aşamalarla gerçekleştirilir: (1) Hücre duvarının, kuru buz veya sıvı nitrojen varlığında, bir havan içerisinde mekanik olarak veya parçalayıcı enzimler

kullanılarak kimyasal olarak uzaklaştırılması, (2) genellikle sodium dodesyl sulfate (SDS) veya cetyl trimetyl ammonium bromide (CTAB) gibi deterjanlar kullanılarak, hücre elemanlarının salınması için hücre zarının ortadan kaldırılması, (3) kloroform, fenol, tuz konsantrasyonu, sezyum klorid gradienti veya CTAB kullanılarak hücredeki polisakkarit, protein ve diğer bileşiklerin uzaklaştırılması, (4) bir ekstraksiyon çözeltisi ile DNA ve RNA'nın çöktürülmesi ve (5) fenol kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu [115,122].

DNA ekstraksiyonu sırasında en çok karşılaşılan problem polisakkarit kontaminasyonudur. Çünkü polisakkaritler ve polimerazların da içinde bulunduğu birçok molekül, enzimlerin aktivitesini inhibe etmektedir. Standart DNA ekstraksiyon metotları uygulanırken, polisakkarit ve diğer kontaminantlardan korunmak ve bunları ortamdan uzaklaştırmak gereklidir. Ancak son yıllarda geliştirilen kitler daha hızlı, ekonomik ve sorunsuz izolasyon imkanı sağlamaktadır. Ayrıca, fenol kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu gibi işlemlere gerek duyulmaksızın yüksek miktarda ve saf DNA eldesine olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmada, 6 farklı lokaliteden toplanan örneklerden beşer tanesi izolasyon için seçilmiştir. gDNA izolasyonunda bitkinin bazal yaprakları kullanılmıştır. İzolasyon yöntemi olarak Bio Basic firması tarafından üretilen Spin Column DNA Isolation Kit (For Plant) seçilmiş ve izolasyon işlemi sırasında kitte verilen protokol takip edilmiştir. Bu protokole göre genomik DNA ekstraksiyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

1) Bitki dokusu porselen havan içinde sıvı azotla toz haline getirildi. Toz hale gelen doku 1,5 ml lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Örneğin erimesine izin verilmeksizin acilen ikinci adıma geçildi.

2) Toz hale getirilmiş materyalin hacmi kontrol edildi ve eşit hacimde PCL (Plant Cell Lysis Solution) ilave edildi (yaklaşık 150 µl).

3) Tüp bir süre vortekslendi ve çalkalandı. Daha sonra 65 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Herhangi bir yığılı uzaklaştırmak için vortekslendi ya da pipetlendi.

4) 25 µl PP çözeltisi eklendi. İyi karıştırıldı. Tüp 15 dakika buzda tutuldu.



5) 4 °C'de 10000 rpm'de 5 dakika santrijüj yapıldı. Temiz lizat Spin kolona aktarıldı.

6) Spin kolona 300 µl PB tamponu eklendi. Karışım 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tüp ara sıra ters yüz edildi.

7) 4 °C' de 4000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı.

8) Koleksiyon tüpünde biriken kısım uzaklaştırıldı. 500 µl yıkama çözeltisi ilave edildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.

9) Sekizinci adımdaki yıkama işlemi tekrarlandı.

10) Koleksiyon tüpünde biriken kısım uzaklaştırıldı. Yıkama çözeltisinin kalan kısmını da uzaklaştırmak için 10000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj yapıldı.

11) Kolon 1,5 ml lik temiz eppendorfa yerleştirildi. Kolonun merkez bölgesi içine 30-50 µl elüsyon tamponu ilave edildi. Oda sıcaklığında 2 veya 3 dakika inkübe edildi.

12) 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenen kolondan DNA ayrıldı.

İzole edilen gDNA, kullanılacağı zamana kadar -25 °C'de derin dondurucuda koruma altına alınmıştır.

#### **2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi**

İzole edilen genomik DNA'ların gözlemlenmesi için % 1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken; 0,5 gram agaroz tartılmış ve 50 ml 0,5 x TBE (pH=8) tamponu içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözülmüştür. Karışım 60 °C'ye kadar soğutulurak içerisine EtBr ilave edilmiştir. Önceden tarakları yerleştirilmiş olan kasete dökülmüş ve polimerleşmesi beklenmiştir. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartılmıştır. Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzeri kaplanıncaya kadar 0,5 x TBE tamponu ile doldurulmuştur.

5 µl dH<sub>2</sub>O, 5µl örnek DNA ve 3 µl yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyulara otomatik pipet yardımı ile yüklenmiştir. İlk kuyucuğa moleküler büyüklüğü belli olan bir DNA standardı yüklenmiştir. Örnekler 80 voltta

yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV transillüminatörde gözlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

### 2.2.5 DNA Miktar Tayini

İzole edilen genomik DNA'ların UV spektrometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Ölçüm işlemi kuvars küvetlerle yapılmıştır. Spektrometrik sonuçlara göre çift zincirli DNA molekülünün miktar tayini, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$C_{DNA} = OD \times 50 \times \text{Seyreltme katsayısı}$$

DNA'nın saflığı ise,  $OD_{260} / OD_{280}$  oranı ile hesaplanmıştır. Saf DNA için bu değer 1,8'dir.

### 2.2.6 RAPD-PCR

Bu çalışmada Williams ve ark. tarafından geliştirilen RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır [73]. Bitkiden izole edilen saf genomik DNA kullanılarak yapılan RAPD-PCR koşulları toplam hacim 25  $\mu$ l olacak şekilde Tablo 2.7'deki gibi düzenlenmiştir:

**Tablo 2.7 RAPD-PCR Şartları**

Distile Su	13,35 $\mu$ l	-
Tampon	2,5 $\mu$ l	10 X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 $\mu$ l	1,7 mM
dNTP	5 $\mu$ l	2,5 mM (her biri)
Primer	1,5 $\mu$ l	50 pmol/ $\mu$ l
Taq Polimeraz	0,15 $\mu$ l	0,75 unit
gDNA	1 $\mu$ l	50 ng
<b>Toplam</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	-

RAPD-PCR reaksiyon döngü koşulları ise Tablo 2.8'deki gibi düzenlenmiştir.

**Tablo 2.8 RAPD-PCR Döngü Koşulları**

<b>Ön Isıtma</b>	94 °C	1 dakika	1 devir
<b>1. Basamak</b>	94 °C	1 dakika	42 devir
<b>2. Basamak</b>	36 °C	1 dakika	
<b>3. Basamak</b>	72 °C	2 dakika	
<b>4. Basamak</b>	72 °C	5 dakika	1 devir
<b>5. Basamak</b>	4 °C	25 saat	

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

### **2.2.7 Verilerin Analizi**

RAPD-PCR uygulaması sonucunda elde edilen verilerin analizi POPGENE Version 1.31 programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1 gDNA**

Bu çalışmada DNA izolasyonu Bio Basic firması tarafından üretilen “Spin Column Genomic DNA Isolation Kit” kullanılarak yapılmıştır. Şekil 3.1’de bu kite ait protokole göre izole edilen DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntüsü verilmiştir.

#### **3.2 RAPD Profilleri**

Balıkesir çevresindeki 5 ayrı lokaliteden ve dış grup olarak seçilen Kuşadası (Aydın)’ndan toplanan bitki örneklerinden beşer tanesinden genomik DNA izolasyonu yapılmış, içlerinden miktarı ve saflığı en yüksek üçer tanesi RAPD-PCR analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Analiz için 21 adet 10 bazlık primer tesadüfi olarak seçilmiştir. Bu primerlerden elde edilen amplifikasyon ürünleri değerlendirmeye tabi tutulmuş ve sadece 6 tanesinin tekrarlanabilir ve güvenilir PCR ürünleri verdiği tespit edilmiştir. Bu primerlerin nükleotid dizileri Tablo 2.4’de belirtilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri % 1,5 oranındaki agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Sonuçlar UV ilüminatörde incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

RAPD-PCR analizi sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri sırasıyla Şekil 3.2 (OPA 13 Primeri), Şekil 3.3 (OPA 10 Primeri), Şekil 3.4 (OPC 11 Primeri), Şekil 3.5 (OPA 12 Primeri), Şekil 3.6 (OPC 02 Primeri), Şekil 3.7 (OPB 12 Primeri)’de gösterilmektedir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M



**Şekil 3.1** İzole Edilen gDNA'ların Agaroz Jeldeki Görünümü

**M.** 1kb DNA marker

**Hat 1-2-3.** Kaşıkçı popülasyonu

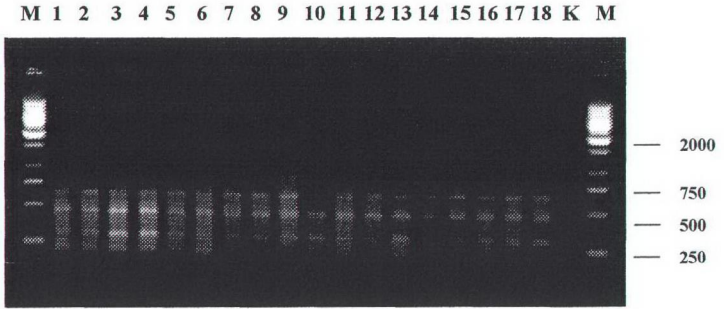
**Hat 4-5-6.** Şabla popülasyonu

**Hat 7-8-9.** Karakuz popülasyonu

**Hat 10-11-12.** Kuşadası popülasyonu

**Hat 13-14-15.** Nusret popülasyonu

**Hat 16-17-18.** Keçidere popülasyonu



**Şekil 3.2** OPA 13 Primeri ile Elde Edilen RAPD Profili

**M.** 1 kb marker

**Hat 1-2-3.** Kaşıkçı populasyonu

**Hat 4-5-6.** Şabla populasyonu

**Hat 7-8-9.** Karakuz populasyonu

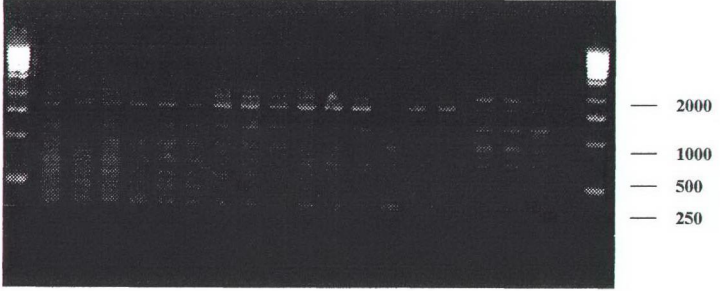
**Hat 10-11-12.** Kuşadası populasyonu

**Hat 13-14-15.** Nusret populasyonu

**Hat 16-17-18.** Keçidere populasyonu

**K.** Negatif Kontrol

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 K M



**Şekil 3.3** OPA 10 Primeri ile Elde Edilen RAPD Profili

**M.** 1 kb marker

**Hat 1-2-3.** Kaşıkçı populasyonu

**Hat 4-5-6.** Şabla populasyonu

**Hat 7-8-9.** Karakuz populasyonu

**Hat 10-11-12.** Kuşadası populasyonu

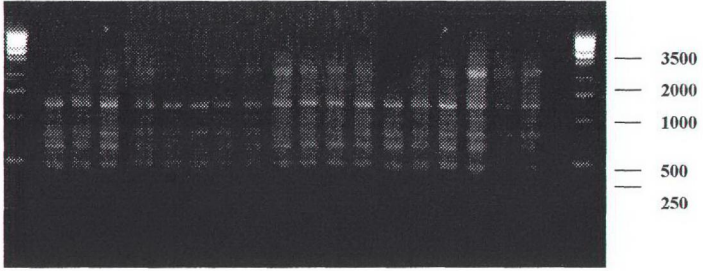
**Hat 13-14-15.** Nusret populasyonu

**Hat 16-17-18.** Keçidere populasyonu

**K.** Negatif Kontrol



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 KM



Şekil 3.4 OPC 11 Primeri ile Elde Edilen RAPD Profili

M. 1 kb marker

Hat 1-2-3. Kaşıkçı popülasyonu

Hat 4-5-6. Şabla popülasyonu

Hat 7-8-9. Karakuz popülasyonu

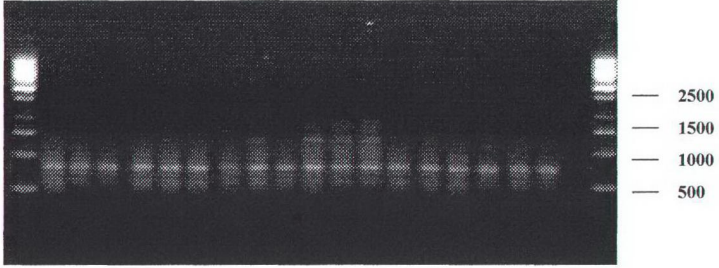
Hat 10-11-12. Kuşadası popülasyonu

Hat 13-14-15. Nusret popülasyonu

Hat 16-17-18. Keçidere popülasyonu

K. Negatif Kontrol

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 K M



**Şekil 3.5** OPA 12 Primeri ile Elde Edilen RAPD Profili

**M.** 1 kb marker

**Hat 1-2-3.** Kaşıkçı popülasyonu

**Hat 4-5-6.** Şabla popülasyonu

**Hat 7-8-9.** Karakuz popülasyonu

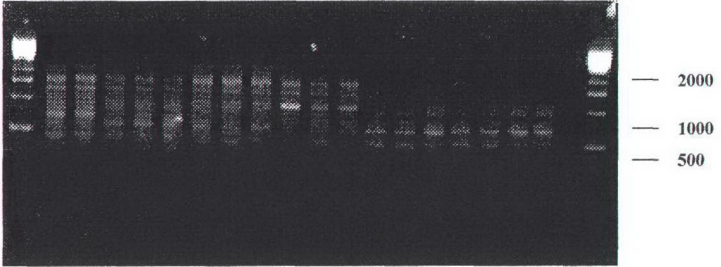
**Hat 10-11-12.** Kuşadası popülasyonu

**Hat 13-14-15.** Nusret popülasyonu

**Hat 16-17-18.** Keçidere popülasyonu

**K.** Negatif Kontrol

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 K M



**Şekil 3.6** OPC 02 Primeri ile Elde Edilen RAPD Profili

**M.** 1 kb marker

**Hat 1-2-3.** Kaşıkçı populasyonu

**Hat 4-5-6.** Şabla populasyonu

**Hat 7-8-9.** Karakuz populasyonu

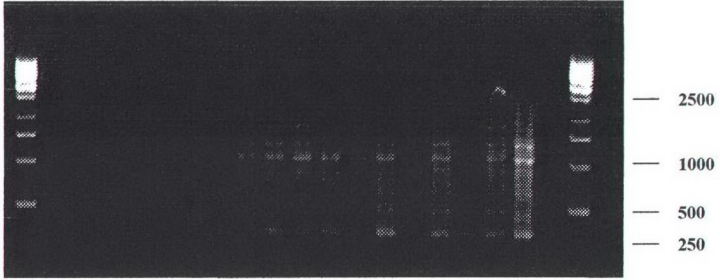
**Hat 10-11-12.** Kuşadası populasyonu

**Hat 13-14-15.** Nusret populasyonu

**Hat 16-17-18.** Keçidere populasyonu

**K.** Negatif Kontrol

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 K M



Şekil 3.7 OPB 12 Primeri ile Elde Edilen RAPD Profili

M. 1 kb marker

Hat 1-2-3. Kaşıkçı populasyonu

Hat 4-5-6. Şabla populasyonu

Hat 7-8-9. Karakuz populasyonu

Hat 10-11-12. Kuşadası populasyonu

Hat 13-14-15. Nusret populasyonu

Hat 16-17-18. Keçidere populasyonu

K. Negatif Kontrol

### 3.3 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi

RAPD-PCR sonuçlarının analizinde, sonuçların değerlendirilmesi çekilen fotoğraflar üzerinden yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda oluşan bantların okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirmeye alınmıştır. Veriler toplanırken, bantların varlığı (1), yokluğu ise (0) ile belirtilmiştir. Elde edilen verilerden oluşturulan veri matrisleri Şekil 3.8’de görülmektedir. Veri matrisi bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra POPGENE Version 1.31 programı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Analiz için toplam 6 primer değerlendirilmiş ve 47 karakter elde edilmiştir. Bunlardan 35 tanesinin yani % 74,47’sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Değerlendirmeye alınan primerlere ait ortalama bant sayıları ve polimorfik bant sayıları Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1** Primerlere Göre Oluşan Bant Sayıları ve Polimorfizm Değerleri

	<b>Primer</b>	<b>Bant Sayısı</b>	<b>Polimorfik Bant Sayısı</b>
1	OPA 13	7	5
2	OPA 10	11	7
3	OPA 12	7	5
4	OPC 11	7	4
5	OPC 02	6	6
6	OPB 12	9	8
	<b>Toplam</b>	<b>47</b>	<b>35</b>

### **Kaşıkcı**

1101010 11011011110 1100000 1111100 111011 100000000  
1101110 10111001100 1100000 1111101 111011 100010000 ✓  
1111110 11111011110 1100000 1111101 110111 100000000

### **Şabla**

1111110 10011011110 1100000 1111101 110111 100010000 ✓  
1101010 10111011110 1100000 1110100 110111 100010100  
1101010 10111011110 1100000 1011100 110011 100000000

### **Karakuz**

0101011 10011111111 1100000 1111101 110011 100010100  
0101011 10011011111 1100100 1111101 110111 100011111  
0101011 10011011111 1100000 1110111 000111 100011111

### **Kuşadası**

0101000 10101011111 1111111 1111101 110111 100111111  
0101110 10001011111 1111111 1111101 110111 100110100  
0101110 10001011111 1111111 1111111 111100 100010100

### **Nusret**

0101110 10111111110 1100000 1111100 110100 111010110  
0111110 10111111110 1100000 1111111 110100 110000000  
0101110 10111111110 1100000 1111111 110100 111111010

### **Keçidere**

0111110 10111111111 1100000 1111111 110100 100010000  
0111111 10111111111 1100000 1010101 110100 111111111  
0111111 10111111110 1100000 1111111 110100 111111111

**Şekil 3.8** RAPD-PCR Analizinde Kullanılan Veri Matrisi

*L. candidum* için incelenen altı farklı populasyonun polimorfizm oranları Tablo 3.2'de görülmektedir.

**Tablo 3.2** *L. candidum* Populasyonlarının Polimorfizm Oranları

Populasyon	Polimorfizm Oranı (%)
Karakuz	21,28
Keçidere	25,53
Nusret	19,15
Kaşıkcı	21,28
Şabla	19,15
Kuşadası	23,40

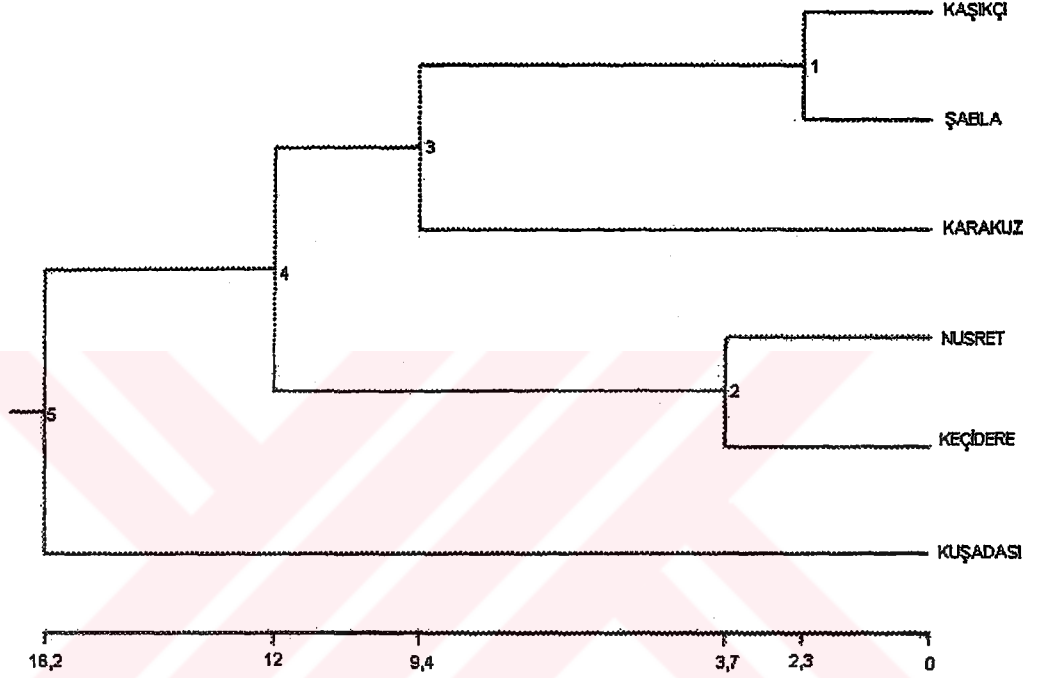
Analiz sonucunda Nei, 1972 [156]'ye göre hesaplanan populasyonlar arasındaki benzerlik indeksi Tablo 3.3'de görülmektedir. Bu tabloda diagonalin üst tarafı genetik benzerliği, alt tarafı ise genetik benzemezliği ifade etmektedir.

**Tablo 3.3** *L. candidum* Populasyonları Arasındaki Benzerlik İndeksi

	Kaşıkcı	Şabla	Karakuz	Kuşadası	Nusret	Keçidere
Kaşıkcı	****	0.9546 ✓	0.8100	0.6963	0.8129	0.7502
Şabla	0.0464	****	0.8478	0.7176	0.8233	0.7952
Karakuz	0.2107 ✓	0.1651	****	0.7746	0.7465	0.7943
Kuşadası	0.3619 ✓	0.3319	0.2554	****	0.7103	0.7183
Nusret	0.2072 ✓	0.1944	0.2923	0.3421 ✓	****	0.9284
Keçidere	0.2875 ✓	0.2292	0.2303	0.3308	0.0743	****



Nei 1972'ye göre hesaplanan, *L. candidum*'un yayılış gösterdiği altı farklı lokalitedeki populasyonlar arasındaki genetik mesafe, Şekil 3.9'da UPGMA metoduna göre çizilen dendrogram şeklinde, Tablo 3.4'te ise tablo halinde verilmektedir.



Şekil 3.9 Populasyonlar Arasındaki Genetik Mesafeyi Gösteren Dendrogram

Tablo 3.4 Populasyonlar Arası Genetik Mesafe

1. Nokta	2. Nokta	Uzaklık
5	4	4,21404
4	3	2,61128
3	1	7,07386
1	Pop 1 (Kaşıkçı)	2,32135
1	Pop 2 (Şabla)	2,32135
3	Pop 3 (Karakuz)	9,39521
4	2	8,28927
2	Pop 5 (Nusret)	3,71721
2	Pop 6 (Keçidere)	3,71721
5	Pop 4 (Kuşadası)	16,22053

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yeryüzünde Lübnan, Suriye, Filistin, Yunan Adaları, Balkanlar ve Türkiye’de doğal yayılış gösteren *Lilium candidum*, süs bitkisi olarak, modern tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde, parfümeri sanayinde ve bazı ülkelerde beslenme amacıyla yararlanılan, ekonomik öneme sahip bir bitkidir. Bütün bu özelliklerinden dolayı insanoğlu tarafından yüzyıllardır yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Taksonun istenen ölçekte kültürü yapılamadığından ve kırsal kesimdeki halk tarafından doğadan soğanları sökülerek toplandığı için, doğal populasyonları giderek daha da dar alanlarda yetişmek zorunda bırakılmıştır.

*L. candidum*, Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı’na göre “Zarar Görebilir (VU-vulnerable)” tehlike kategorisinde yer almaktadır [8]. VU kategorisi, son 10 yıl veya 3 nesil içinde popülasyonda % 20 oranında bir azalma olacağı düşünülen; yayılış alanı 10 lokasyondan fazla olmayan, yayılış alanı toplam 20000 km<sup>2</sup>, olgun birey sayısı 10000’den az veya arazi çalışmaları sırasında 100 yıl içinde popülasyonunda % 10 azalma olabileceği düşünülen, doğada orta vadeli gelecekte yüksek tehdit altında olan taksonları bulunduran gruptur [14]. Buradan da anlaşılacağı gibi, bitkinin korunması ile ilgili yeterli tedbirlerin alınmaması durumunda, doğadaki yayılış alanları ve bu alanlardaki popülasyon yoğunlukları giderek daha da azalacak ve bitki tükenme tehdidi ile karşı karşıya kalacaktır. Bundan dolayı, *L. candidum*’un korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi acil bir ihtiyaç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Biyolojik çeşitlilik, karasal, denizel ve diğer tüm sucul ekosistemlerde bulunan canlılardaki tür zenginliği olarak tanımlanabilir. Biyolojik çeşitlilik kavramı, genetik çeşitlilik kavramı ile yakından ilişkilidir. Genetik çeşitlilik, bir popülasyonda bulunması mümkün olan tüm gen havuzlarındaki genetik değişkenliğin derecesi olarak tanımlanabilir.

Yaşanan gelişmeler, içinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli doğal kaynağının genetik kaynaklar olduğunu göstermektedir. Genetik kaynaklar, ekosistemlerin dengede bulunması için vazgeçilmez bir unsur olduklarından, yenilenebilir doğal kaynaklar içinde oldukça önemli bir yere sahiptirler. Burada insanoğlunun yapması gereken, doğal kaynaklara sahip çıkmak olmalıdır. Bu kaynaklara sahip çıkmak, yalnızca onları bugünkü gibi korumak ya da hiç kimseye kullandırmamak olarak algılanmamalıdır. Tam tersine, bu kaynakların ülkelere fayda sağlayacak şekilde kullanılmasını sağlamak gerekmektedir. Bunun sağlanması ise ancak gelecek dikkate alınarak yapılacak çalışmalarla gerçekleştirilebilir. Söz konusu çalışmalar ise çeşitliliğin belirlenmesi, korunması, değerlendirilmesi, kullanılabilir hale getirilmesi ve verimli bir biçimde kullanılması olarak sıralanabilir.

Biyolojik koruma çalışmalarında yapılması gereken ilk şey, genetik çeşitliliğin belirlenmesidir. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde genetik (moleküler) markırlardan sıklıkla yararlanılmaktadır. Bir popülasyonda polimorfik olan özellik ya da karakterler genetik markırlar olarak bilinir. Polimorfizm ise bir lokusta belirlenebilen kalıtsal varyasyon olarak tanımlanır. Popülasyonlar arasındaki genetik varyasyonların belirlenmesinde kullanılan dört tip markır sistemi vardır. Bunlar; morfolojik markırlar, sitogenetik markırlar, protein markırlar ve DNA'ya dayalı markırlardır.

Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde morfolojik karakterlerin kullanımının oldukça uzun bir geçmişi vardır. Bu teknikte, fenotipik karakterlerin analizi ile genotipler belirlenmeye çalışılmaktadır. Morfolojik verilerin kolay elde edilebilir olması bu yöntemin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Morfolojik karakterler yani fenotipler genlerle kontrol edildiği için, spesifik genler için güvenilir göstergelerdir. Ancak, genotipin fenotipte ortaya çıkma oranı, bireylerin değişken çevre koşullarında bulunması gibi faktörlerle değişebilmekte, bu da morfolojik karakterlerin güvenilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir.

Sitogenetik markırlarla, kromozom düzeyinde tür içi ya da çok yakın akraba türler arasında karşılaştırmalı analiz yapılabilmektedir. Bu sistemde, kromozom bant teknikleri ve spesifik boyama teknikleri kullanılır. Kromozomda elde edilen

bantların çoğu, büyük tekrarlı dizilerle bağlantılıdır. Ancak, bant varyasyonunun düşük olması sebebiyle sınırlı bir tekniktir.

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

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

Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde markırlardan yararlanılması, pratiklik açısından uygulama kolaylığı ve hızlı sonuç elde edilmesini, ekonomik açıdan ise ucuz bir çalışma yapılmasını sağlamaktadır. Biyokimyasal ve morfolojik karakterlere dayanılarak yapılan genetik çeşitlilik çalışmaları, protein ve DNA markırlarının yanında güvenilirliği ve doğruluğu az olan çalışmalardır. Protein markırlar grubunda yer alan izozimlerle de genetik anlamda kesin sonuçlara ulaşılması her zaman mümkün olmamaktadır. Protein markırların yetersizliğine karşın DNA markırlar, değişik hücresel koşullardan etkilenmeme ve tekrarlanabilme gibi özellikleri nedeni ile genetik çeşitliliğin belirlenmesi gibi çalışmalarda daha ön plana çıkmıştır. Bunlardan, RFLP tekniği, birçok bitki cinsinde yapılan parmak izi çalışmalarında önde gelen uygulamalardan olmuştur. Ancak, PCR teknolojisindeki gelişmeler, RFLP gibi hibridizasyon temelli yöntemlerin uygulamada uzun zaman

alması ve oldukça fazla laboratuvar imkanı gerektirmesi gibi dezavantajlarını ortadan kaldırarak, DNA'da seçilmiş bölgelerin çoğaltımına dayalı, PCR temelli markırların kullanımını arttırmıştır.

PCR uygulamaları başlangıçta, belirli DNA segmentlerinin selektif çoğaltımı üzerine yönlendirilmiş ve baz dizilişi bilinen bölgelerin primer çiftleri ile amplifikasyonu ön plana çıkmıştır. Ancak, ilgili dizilerin belirlenmesinde karşılaşılan zorluklar ve genomda yalnız kısıtlı bölgelerdeki taramalardan doğan yetersizlikler, uygulamaya daha kolay ve etkili yöntemlerin sunulmasını gerektirmiştir. Rastgele primerler kullanılarak, PCR ile çoğaltılan DNA uzunluklarının ortaya çıkardığı farklılıkları esas alan RAPD tekniği, bu gibi birçok avantajı ile PCR markırları içinde hızla benimsenmiş ve bu konuda çalışan laboratuvarlarda tercih edilen bir yöntem olagelmıştır. Bir primerdeki tek bir nükleotidin süstitüsüyonu, RAPD'de tamamen bir değişiklikle sonuçlanır. Bu da sistemin duyarlılığının bir göstergesidir. Bütün bu özelliklerinden dolayı, bu çalışmada *L. candidum*'un genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde RAPD tekniği tercih edilmiştir.

Canlı yaşamın devamlılığı bakımından biyolojik çeşitliliği korumanın önemi yadsınamaz bir gerçektir. Biyolojik çeşitliliğin bir unsuru olan bitki türlerinin korunması, doğanın primer üreticileri olmaları ve doğaya sürekli oksijen sağlamaları nedeniyle daha da özel bir yere sahiptir. Bir türün korunması ile ilgili stratejiler geliştirilmeden önce, o türe ait populasyon büyüklüğünün zamana bağlı olarak sabit mi kaldığı, artış eğiliminde mi olduğu, yoksa belli bir azalma mı gösterdiği tespit edilmelidir. Canlıların korunmasında en ideal koruma yolu ekosferin bir bütün olarak korunmasıdır. Ancak günümüz koşullarında ekosferin tamamını korumak olanaksızdır. Bu nedenle ekosistemlerin korunmasında türlerin ve tür topluluklarının korunması özel bir yer işgal etmektedir.

Türkiye Cumhuriyeti Anayasası'nda bitki genetik kaynaklarının korunmasına doğrudan değinen bir madde bulunmamakla birlikte, 63. madde, hükümetin tarihi, kültürel ve doğal değerleri ve kaynakların korunması ile bu konuda halkın bu değerleri koruması yönündeki çabalarının desteklenmesini öngörmektedir. Öte

yandan 1995 yılında çıkarılıp 2004 yılında güncellenen “Doğal Çiçek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik”, yumrulu bitkilerin doğadan sürdürülebilir biçimde toplanmasını düzenleyen önemli bir yasal düzenleme olmuştur. 1992 yılında çıkarılan “Bitki Genetik Kaynaklarının Toplanması, Muhafazası ve Kullanılması Hakkında Yönetmelik” ise bitki genetik kaynakları ile ilgili değişik konularda düzenlemeler getirmektedir. Bu yasal çerçeveler dahilinde, *L. candidum*'un soğanlarının doğadan sökülerek ihraç edilmesi yasaklanmış, ancak kültüre alınarak üretildiğinde ve Tarım Bakanlığı'na ait İl Müdürlüklerince verilecek özel izinle ihraç edilmesi mümkün olabilmektedir [157].

Bitki genetik kaynaklarının korunması genel olarak *ex situ* koruma (gen bankaları ve botanik bahçeleri), tarlada koruma (agroekosistemler) ve *in situ* koruma (doğal ekosistemler) olmak üzere 3 strateji ile gerçekleştirilebilir.

*Ex situ* koruma, genetik çeşitlilik unsurlarının doğal habitatları dışında korunmasıdır. *Ex situ* koruma programları, dünyanın her yanında geçmişten bugüne uygulanmaktadır. Bu sistem oldukça etkin olmakla birlikte, bazı sakıncalı yönleri de vardır. Burada en önemli sorun, yeri dışında yapılan koruma çalışmaları sırasında bitki popülasyonlarında devam eden evrimleşme sürecinin durmasıdır. Evrimleşme bitki ile çevre arasındaki etkileşimin sonucu olarak ortaya çıkmakta ve nesiller boyunca ortaya çıkan genetik farklılaşmalar şeklinde kendini göstermektedir. Yapay ortamlarda gerçekleştirilen koruma süresince bu etkileşim olmayacağından, evrimleşme süreci durmaktadır. Ayrıca bu tip koruma sisteminde mevcut çeşitliliğin ancak küçük bir bölümü kontrol altına alınabilmektedir.

*In situ* koruma, doğal kaynakların kendi doğal yaşam alanlarında korunmaları anlamına gelmektedir. Bu tür koruma sisteminde, doğal yaşam alanlarında popülasyonlar çeşitliliğini devam ettirerek sistemdeki bitkiler evrimlerini sürdürülebilmekte ve yeni özellikler taşıyan bitkilerin ortaya çıkmasına olanak sağlanmaktadır. Ancak unutulmamalıdır ki evrim, yalnızca yeni karakterlerin ortaya çıkmasına neden olmaz, aynı zamanda çok kullanışlı olan bazı eski karakterlerin yitirilmesine de neden olur. İklimdeki ani değişimler, çevre kirliliğinin artması ve her türlü doğal ve insan kaynaklı karmaşalar bu yönden tehlikelidir.



Tarlada koruma, populasyonların agroekosistemlerde kültüre alınması yoluyla yapılan korumadır. Agroekosistemler, insanlar tarafından ihtiyaç duyulan besin, lif, yakıt ve diğer ürünlerin üretilmesi için değiştirilen, fiziksel ve kimyasal çevre ile etkileşim içinde olan bitki ve hayvan komünitelerinin bulunduğu sistemlerdir.

Biyolojik korumanın öncelikle *in situ* olacak şekilde gerçekleştirilmesi ideal olanıdır. Yukarıda da bahsedildiği gibi çeşitli nedenlerle *in situ* koruma çoğu zaman çok kolay sağlanamadığı için, bu koruma yöntemi ile birlikte *ex situ* koruma ve tarlada koruma yöntemleri birlikte değerlendirilmektedir.

Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı [14] verilerine göre *L. candidum*'un Türkiye'de doğal olarak yetiştiği habitatlarındaki populasyon büyüklüğü azalma eğiliminde olduğu için "zarar görebilir" tehlike kategorisinde değerlendirilmektedir. "Balıkesir çevresinde doğal yayılış gösteren *Lilium candidum*'un korunmasında, yukarıda belirtilen koruma stratejilerinden hangisi veya hangileri tercih edilmelidir?" sorusunun cevabı tartışmaya açık bir konudur.

Bu çalışmada, bu türün Balıkesir çevresindeki farklı populasyonlarının genetik yapısı araştırılmış ve *in situ* koruma yapılması gereken öncelikli lokaliteler belirlenmeye çalışılmıştır. Bilindiği gibi, genetik çeşitliliği en fazla olan populasyonların korunma önceliği olmalıdır. Çünkü bu populasyonlar o türe ait tüm varyasyonları bünyelerinde barındırmaktadırlar. Genetik çeşitliliği az olan bir populasyon kaybolsa bile, genetik çeşitliliğin fazla olduğu populasyon o türün devamlılığına ve evrimsel sürecini devam ettirmesine en büyük desteği sağlayacaktır.

Yaptığımız çalışmada, RAPD-PCR reaksiyonunda 21 farklı primer kullanılmıştır. Bunlar arasında tekrarlanabilir bant veren 6 primer tespit edilmiştir. Bu primerlere ait amplifikasyon ürünleri Şekil 3.2-Şekil 3.7'de verilmektedir. Şekillerden de görüldüğü gibi, kullanılan primerler *L. candidum*'un incelenen altı farklı populasyonu arasındaki bireylerde ortak bantlar verdiği gibi, polimorfik bantlar da vermiştir. Elde edilen bantlardan parlak ve tekrarlanabilirliği olan amplifikasyon ürünleri değerlendirmeye alınmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde, var olan bantlar (1), olmayan bantlar (0) olarak belirtilmiş ve Şekil 3.8'de görülen veri matrisi



oluşturulmuştur. Bu matris bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra, POPGENE Version 1.31 programı kullanılarak verilerin analizi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda, değerlendirilen 6 primerden elde edilen 47 karakterden 35 tanesinin yani % 74,47'sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.1). Populasyonlar arasındaki polimorfizm oranlarına bakıldığında, % 25,53'lük oranla Keçidere populasyonunun genetik çeşitliliğinin en fazla olduğu görülmektedir. Bu populasyonu % 23,40'lık polimorfizm oranıyla Kuşadası populasyonu takip etmektedir. Karakuz ve Kaşıkçı populasyonları % 21,28'lik, Şabla ve Nusret populasyonları ise %19,15'lik polimorfizm oranlarına sahiptirler (Tablo 3.2).

Nei, 1972'ye göre [156] hesaplanan populasyonlar arasındaki genetik mesafeye dayalı olarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) metodu ile populasyonlar arasındaki genetik ilişkiyi gösteren bir dendrogram elde edilmiştir (Şekil 3.9). Bu dendrogram incelendiğinde, başlıca 2 dala ayrıldığı görülmektedir. Bu dallardan birinde, dış grup olarak seçtiğimiz Kuşadası populasyonu diğer beş populasyondan ayrılarak tek başına bulunmaktadır. Diğer dal ise, iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birinde genetik benzerlikleri % 92,84 olan Nusret ve Keçidere populasyonları bulunmaktadır. Diğer dal ise yine iki gruba ayrılmakta ve dallardan birinde yalnız başına Karakuz populasyonu, diğerinde ise genetik olarak % 95,46 benzerlik oranıyla birbirine en yakın populasyonlar olan Kaşıkçı ve Şabla populasyonları beraber bulunmaktadır.

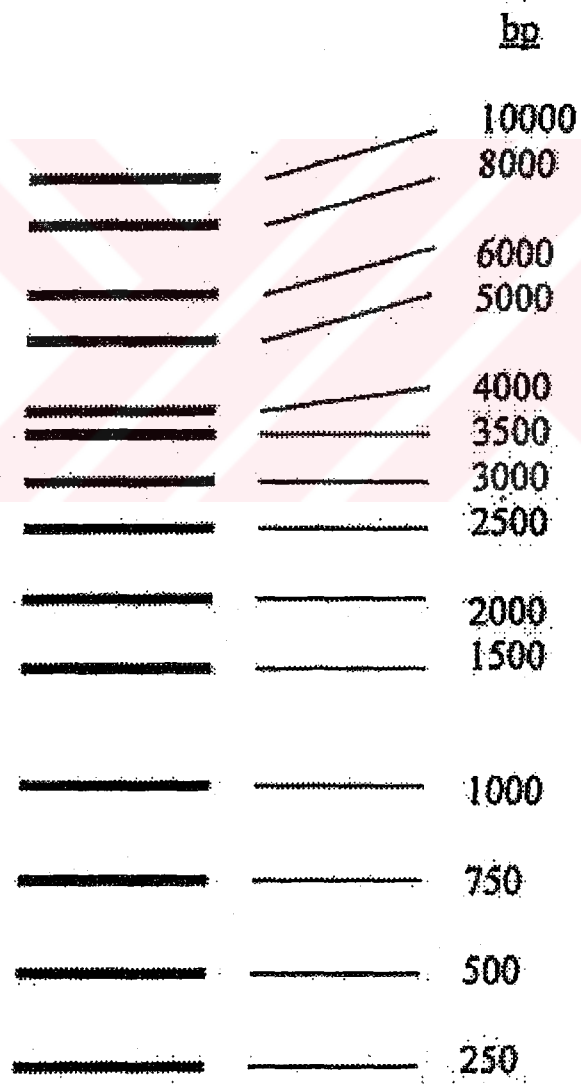
*Lilium candidum*'da tespit edilen 74,47'lik polimorfik bant yüzdesinin, *Lactoris fernandeziana* (% 24,5) [158], *Cathaya argyrophylla* (% 32) [159], *Paeonia suffruticosa* (% 22,5), *Paeonia rockii* (% 27,6) [160] ve *Dacydium pierrei* (% 33,3) [161] gibi tükenme tehlikesindeki diğer türlere göre daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Bu sonuç, beyaz zambakta genetik çeşitliliğin düşük olmadığına ve bu türün çevresel varyasyonlara kolaylıkla uyum gösterme yeteneğine sahip olduğuna işaret etmektedir. Buna göre, *Lilium candidum*'da populasyon büyüklüklerinin azalmasının ve habitatlarının "ada benzeri" dağılım göstermesinin temel sebebi, insan aktivitelerinin hem türün habitatlarına, hem de doğadan aşırı derecede sökmek yoluyla populasyonlarına verdikleri zarardır.

Elde edilen bulguların ışığında Keçidere popülasyonunun diğere popülasyonlara göre daha yüksek polimorfizm oranı gösterdiği dikkati çekmektedir (Tablo 3.3). Bu nedenle *L. candidum*'un öncelikle bu popülasyonunun korunması yerinde olacaktır. *In situ* korumanın yanısıra, bu türün agroekosistemlerde kültürünün yapılmasında yarar görülmektedir. Ancak burada da dikkate alınması gereken konu, yine *in situ* korumadakine benzerdir; doğru olanı, agroekosistemlerde kültüre alınacak bitkilerden genetik çeşitliliği en fazla olan Keçidere popülasyonunun temsilcilerinin kullanılmasıdır. Ayrıca, yetiştirme yapılacak alanların belirlenmesinde bitkinin ekolojik ihtiyaçlarına cevap verecek doğru habitatlar tercih edilmelidir. Diğere bir yöntem olan *ex situ* koruma ile bitkinin tohum örneklerinin gen bankalarında saklanması ya da botanik bahçelerinde yetiştirilmesi bu iki yöntemle destek olabilecek bir koruma yöntemidir. Ancak bunun uygulanması ile ilgili birçok problem bulunmaktadır. Bu nedenle, Balıkesir çevresinde doğal olarak yetişen *Lilium candidum* popülasyonlarının korunması için *ex situ* koruma yöntemi önerilmemektedir.

Ayrıca, bu araştırmanın arazi çalışmaları sonucunda, *L. candidum*'un daha önce Balıkesir'in Kepsut ilçesi çevresinden bilinen yayılış alanlarına bazı ilaveler yapılmıştır. Yine bu çalışma ile taksonun Edremit çevresinde de doğal yayılış gösterdiği ilk defa rapor edilmektedir.

**EK**

**1 kb DNA Standardı**



## 5. KAYNAKLAR

- [1] Wilson, H.F., Mathew, B., Bulbs – The Bulbous Plants of Europe and Their Allies, William Collins Sons & Co. Ltd., 329-550 (1980-1981).
- [2] Uzun, G., Zambak Yetiştiriciliği, Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı, Yalova, (1984).
- [3] Uzun, G., Çukurova Bölgesi'nde Mis Zambak (*Lilium candidum* L.) Yetiştiriciliği ve Sorunları Üzerine Bir Araştırma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, Yıl:12, Sayı: 1-4, (1981).
- [4] Genders, R., Hale, R., Bulbs, - A complete Handbook -, Roy Genders, Robert Hale & Company, London, (1973).
- [5] Koyuncu, M., Bilim ve Teknik Dergisi, 338: 86-87, (Ocak 1996).
- [6] Temeltaş, H., Balıkesir Yöresinde Doğal Yayılış Gösteren *Lilium candidum* L. (Beyaz Zambak)'un İç Morfolojisi, Dış Morfolojisi ve Ekolojisi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Balıkesir, (1999).
- [7] Cronquist, A., The Evolution and Classification of Flowering Plants, Thomas Nelson Ltd., London and Edinburgh, Great Britain, p:396, (1968).
- [8] Davis, P.H., Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg University Press, Edinburg, Vol. 8 (1984).
- [9] Bown, D., Encyclopaedia of Herbs and their Uses, Dorling Kindersley, London, (1995).
- [10] Grieve, M., A Modern Herbal, Penguin (1984).
- [11] Chopra, R. N., Nayar. S. L., Chopra. I. C., Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement), Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi (1986).
- [12] Usher, G., A Dictionary of Plants Used by Man., Constable (1974).
- [13] Baytop, T., Mathew, B., The Bulbous Plant of Turkey, Bastford Ltd., London, (1984).

- [14] Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncü Yıl Üniv. Yayını, Barışcan Ofset, Ankara, (2000).*
- [15] Erdoğan, İ., Şener, B., Rahman, A., "Alkaloids from the Bulbs of *Lilium candidum* L. of Turkish Origin", *GUEDE- J. Fac. Pharm. Gazi*, 17(1), 25-8 (2000).
- [16] Karamanoğlu, K., "Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen *Lilium* (Zambak) Türleri (The Species of *Lilium* from Turkey)", *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 2(1), 31-36, (1972).
- [17] Eisenreichova, E., Vachalkova, A., Haladova, M., Mueaji, B., Jozova, B., Novotny, L., "Potential carcinogenic and inhibitory activity of compounds isolated from *Lilium candidum* L.", *Ceska Slov Farm.*, 51(6): 297-300, (November, 2002).
- [18] Mucaji, P., Hudecova, D., Haladova, M., Eisenreichova, E., "Anti yeast activity of ethanol extracts of *Lilium candidum* L.", *Ceska Slov Farm.*, 49(1): 29-31, (2000).
- [19] Mucaji, P., Haladova, M., Eisenreichova, E., Budesinsky, M., Ubik, K., "Sterols in *Lilium candidum* L.", *Pharmazie*, 55 (7): 549-550, (July, 2000).
- [20] Eisenreichova, E., Haladova, M., Buskova, A., Tomko, J., Uhrin, D., Ubik, K., "Lilaline-a flavonoid alkaloid from *Lilium candidum*", *Phytochemistry*, 26(6): 1844-1845, (1987).
- [21] Eisenreichova, E., Haladova, M., Buskova, A., Tomko, J., Uhrin, D., Ubik, K., "A new acylated kaempferol derivative from *Lilium candidum*", *Phytochemistry*, 27(6): 1914-1915, (1988).
- [22] Mucaji, P., Haladova, M., Eisenreichova, E., Budesinsky, M., Ubik, K., "Jatrophan 5-o-β-d-Glucopyranoside from *Lilium candidum* L.", *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61: 1662-1664, (1996).
- [23] Eisenreichova, E., Haladova, M., Buskova, A., Tomko, J., Uhrin, D., Ubik, K., "A Pyrolin - Pyrolidine Alkaloid from *Lilium candidum*", *Bulbs, Phytochemistry*, 31(3): 1084, (1992).
- [24] Eisenreichova, E., Haladova, M., "Is White Lily Medicinal Plant?" (in Slovak), *Nase Liecive Rastliny* 3: 84-85, (1995).
- [25] Eisenreichova, E., Haladova, M., "White Lily and Its Healing Effects" (in Slovak), *Pharma J.* 8: 45, (1998).
- [26] Eisenreichova, E., Masterova, I., Buckova, A., Haladova, M., Tomko, J., "Constituents of *Lilium candidum* L." (in Slovak), *Ceskoslov Farm.*, 34: 408-409, (1985).

- [27] Eisenreichova, E., Haladova, M., Buckova, A., Uhrin, D., Tomko, J., "Derivatives of Pyroline in *Lilium candidum* L.", *Chem. Papers* 45: 709-711, (1991).
- [28] Rossetti, V., Suria, M., "Sigma- methyleneglutamic acid from *Lilium candidum* bulbs", *Phytochemistry* 11: 859-860, (1972).
- [29] Satou, T., Kuroda, M., Sashida, Y., Hatakeyama, Y., "Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium candidum*", *Phytochemistry*, 51(4): 567- 573, (June,1999).
- [30] Mimaki, Y., Satou, T., Kuroda, M., Sashida, Y., Hatakeyama, Y., "New steroidal constituents from the bulbs of *Lilium candidum*", *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 46(11): 1829-32, (November, 1998).
- [31] Reznikova, S.A., "Interrelations of anther tissues of *Lilium candidum* L. during microsporogenesis", *Sov. J. Dev. Biol.*, 4(1):64-72, (Jan-Feb, 1973).
- [32] Sauerland, H., "Quantitative studies on the effects of roentgen rays after irradiation of various meiosis stages in *Lilium candidum* L.", *Chromosoma*, 7(8): 627-54, (1956).
- [33] Avramov, N.R., "Considerations on diuretic effects of *Lilium candidum* bulbs", *Suvr. Med.* (Soffia), 6(10): 12-9 (1955).
- [34] Reznikova, S.A., Bugara A.M., Erokhina A.I., "Cytochemical study of the DNA and histone in the tissues of the lily anther in the course of microsporo- and gametogenesis", *Ontogenez*, 10(3) 276-84, (1979).
- [35] Pieroni, A., "Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy", *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3): 235-273, (July, 2000).
- [36] Lipp, J., "Detection of ABA and Proline in Polen", *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 187(3): 211, (1991).
- [37] Van Tuyl, J.M., Van Creijl, M.G.M., Van Dien, M.P., Saniewski, M., (ed.), Beijersbergen, J.C.M., (ed.), Bogotka, W., "In vitro Pollination and Ovary Culture as a Breeding Tool In Wide Hybridization of *Lilium* and *Nerine*", *Sixth International Symposium of Flower Bulbs*, 2, Skierniewicw, Poland, (12-15 May 1992), *Acta Horticulture*, 325: 461,(1992).
- [38] Van Tuyl, J.M., Van Holsteinjn, K.M.C., Kwakkenloos A.A.M., "Research on Polyploidy in Interspecific Hybridization of Lily", *Acta Horticulture*, 266:323-329, (1990), in Fifth International Symposium on Flower Bulbs, Seattle, Washington, USA., (10-14 July 1989).

- [39] Van Tuyl, J.M., Van Dijk, A.J., Van Raamsdok, L.W.D., "Identification of Interspecific Hybrids and Determination of Relationship Between Species in The Genus *Lilium* by Isoelectric focusing", *Acta Horticulture*, 177(2): 601, (1986).
- [40] Van Tuyl, J.M., Van Creijl, M.G.M., Van Dien, M.P., "The Use of Oryzalin as an Alternative for Colchicine in In vitro Chromosome Doubling of *Lilium*", *Lily Yearbook of North American Lily Society*, 43: 19, (1990).
- [41] Kvedynich, O.A., Karavets, E.A., "Fertilization of The Sinergids in Species of The Genus *Lilium* (Liliaceae)", *Botanicheskii Zhurnal*, 76(2): 236, (1991).
- [42] Haladova, M., Eisenrichova, E., Buckova, A., Tomko, J., Uhhrin, D., Ubbik, K., "Dimeric Pyrroline Alkaloids from *Lilium candidum* L.", *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 56(2): 436, (1991).
- [43] Haladova, M., Eisenreichova, E., Mucaji, P., Budesinsky, M., Ubik, K., "Steroidal saponins from *L. candidum* L.", *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 63: 205-210, (1998).
- [44] Haladova, M., Eisenreichova, E., Buckova, A., Tomko, J., Uhrin, D., "New Nitrogen Containing Compounds in *Lilium candidum* L.", *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 53: 157-160, (1988).
- [45] Haladova, M., Eisenreichova, E., Mucaji, P., Budesinsky, M., Ubik, K., "Steroidal Saponins from the Petals of *Lilium candidum* L.", *Pharmazie* 54: 159-160, (1999).
- [46] Kruczkowska, H., "The Micropropagation of Several Lily Cultivars and Species Cultures", *Prace Institute Sadownictwa, Kwiaciarstwa Skierniewicach, Seria, B., Rosliny, Ozdobb*, 11: 125 (1986).
- [47] Semerikhina, S.E., Bugara, A.M., "Physical and Characteristics of DNA in Microspore Tetrads of Beet and Lily", *Doklady Akademii Nauk., BSSR.*, 34(3): 264, (1990).
- [48] Erdoğan, İ., Şener, B., Rahman, Atta.-ur, "Etioline, a steroidal alkaloid from *Lilium candidum* L.", *Biochem. Syst. Ecol.*, 29(5): 535-536, (May, 2001).
- [49] Eisenreichova, E., Haladova, M., Mucaji, P., Budesinsky, M., Ubik, K., "A new steroidal saponin from the bulbs of *Lilium candidum* L.", *Pharmazie*, 55(7): 549-550, (July, 2000).
- [50] Marasek, A., Orlikowska, T., "Karyology of nine Lily Genotypes", *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45(2): 159-168, (2003).
- [51] Rosetti, V., "Free Aminoacids in the Pollen of *Lilium candidum* L.", *Ann. Chim.*, 56: 935-945, (1966).



- [52] Lisa, M., Leifertova, I., Haladova, M., Buckova, A., Eisenreichova, E., "Antifungal Effect of *Lilium candidum* L." (in Slovak), *Farm. Obzor*, 59: 49-56, (1990).
- [53] Lombard, A., "Ribonucleic Acid (RNA) Components of the Pollen *Lilium candidum* L.", *Ann. Chim.*, 53: 668-676, (1963).
- [54] Masterova, I., Buckova, A., Eisenreichova, E., Tomko, J., "Dicarboxylic Acids from *Lilium candidum* L." (in Slovak), *Ceskoslov. Farm.*, 34: 410-411, (1985).
- [55] Nagy, E., Seres, J., Verzar-Petri, G., Neszmelyi, A., "Kaempferol-3-O-[ $\beta$ -D--glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranoside) a new flavonoid from *Lilium candidum* L.", *Anorg. Chem. Org. Chem.*, 36: 1813-1815, (1984).
- [56] Nagy, E., Verzar-Petri, G., Neszmelyi, A., "Characterisation flavonoids of *Lilium candidum* L. and their distribution in different plant parts", *Stud. Org. Chem.*, 23: 265-271, (1986).
- [57] Uhrin, D., Buckova, A., Eisenreichova, E., Haladova, M., Tomko, J., "Constituents of *Lilium candidum* L.", *Chem. Papers*, 43: 793-796, (1989).
- [58] Kışlalıoğlu, M., Berkes, F., Biyolojik Çeşitlilik, Türkiye Çevre Sorunları Vakfı Yayınları, Önder Matbaası, (1987).
- [59] [www.ortohum.gov.tr/Tekbul/biotek.doc](http://www.ortohum.gov.tr/Tekbul/biotek.doc).
- [60] Öztürk, M.A., Seçmen, Ö., Bitki Ekolojisi, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1992).
- [61] Özgen, M., Adak, M.S., Karagöz, A., Ulukan, H., Bitki Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımı, Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi Kitapçığı, 28(2): 309-344, Ankara, (1995).
- [62] Hammer, K., Diederichsen, A., Spahillari, M., "Basic Studies Towards Strategies for Conservation of Plant Genetic Resources, Proceedings of the Technical Meeting on the Methodology of the FAO World Information and Early Warning System on Plant Genetic Resources", *Research Institute of Crop Production*, Prague, Czech Republic, (21-23 June, 1999).
- [63] Kaya, Z., Kün, E., Güner, A., National Plan for in-situ Conservation of Plant Genetic Diversity in Turkey, Milli Eğitim Basımevi, İstanbul, (1997).
- [64] Weissing, K., DNA Fingerprinting Plants and Fungi, CRC Press, USA, (1995).

- [65] Ergül, A., Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) Genomik DNA Parmakizi Analizi ve Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, (2000).
- [66] McComb, J.D., "The Development of Dual Primer RAPD and the Application the Study of Anthropological to Genetics", University of Kansas, (1999).
- [67] Tingey, S., Rafalski, J.A., Williams, J.G.K., "Genetic Analysis with RAPD Markers", *Joint Plant Breeding Symposia Series, Application of RAPD Technology to Plant Breeding*, 3-8, Minnesota, (November, 1992).
- [68] Southern, E.M., "Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis", *J. Mol. Biol.*, 98: 503-550 (1975).
- [69] Hillis, D.M., Mortiz, C., *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA, (1990).
- [70] Brown, J.R., Beckenbach, A.T., Smith, M.J., "Intraspecific DNA Variation of the Mitochondrial Control Reigon of the White Sturgeon", *Mol. Biol. Evol.*, 10: 326-341 (1993).
- [71] Passarge, E., *Color Atlas of Genetics*, Theime, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, (Ocak, 2000).
- [72] Nicese, F.P., Hormoza, J.I., McGranahan, G.H., "Molecular Characterization and Genetic Reltedness Among Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes Based on RAPD Markers", *Euphytica*, 101: 199-206, (1998).
- [73] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., "DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers", *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535 (1990).
- [74] Langridge, P., Weining, S., "Identification and Mapping of Polymorphisms in Cereals Based on the Polymerase Chain Reaction", *Theor. Appl. Genet.*, 82: 209-216, (1991).
- [75] Rafalski, J.A., Tingey, S., Williams, J.G.K., "RAPD Markers-A New Technology for Genetic Mapping and Plant Breeding", *AgBiotech News and Information*, 3: 645-648, (1991).
- [76] Zabeau, M., Vos, P., *Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method for DNA Fingerprinting European Patent Application EP 534858A1* (1993).
- [77] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Homes, M., Frijeters, A., Pot, J., Kulper, M., Zabeau, M., "AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting", *Nucl. Acids Res.*, 23: 4407-4414 (1995).

- [78] Staub, J.E., Serquen, F.C., Gupta, M., "Genetic Markers, Map Construction and their Application in Plant Breeding", *Hort. Science*, 31(5): 729-741, (September, 1996).
- [79] Liscum, M., Oeller, P., "AFLP: Not only for Fingerprinting, but also for Positional Cloning", [www.biosci.missouri.edu/liscum/LiscumLabPage.html](http://www.biosci.missouri.edu/liscum/LiscumLabPage.html).
- [80] İncirli, A., Bilgiç, H., Akaya, M.S., "Assesment of Polymorphic AFLP Markers in *Triticum durum* and *Aegilop* sp.", *Turk J. Biol.*, 25: 291-299 (2001).
- [81] Saliba-Colombani, V., Causse, M., Gervais, L., Philouze, J., "Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP Markers for the Construction of an Intraspecific Map of the Tomato Genome", *Genome*, 43: 29-40 (2000).
- [82] Ranamukhaarachchi, D.G., Kane, M.E., Guy, C.L., Li, Q.B., "Modified AFLP Technique for Rapid Genetic Characterization in Plants", *Bio Techniques*, 29: 858-866 (2000).
- [83] Knorr, C., Cheng, H.H., Dodgson, J.B., "Application of AFLP Markers to Genome Mapping in Poultry", *Animal Genetics*, 30: 28-35, (1999).
- [84] Payne, S.J., *Microsatellite Analysis: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*, ed. Taylor, G.R., CRS Pres, Boca Raton, New York, (1997).
- [85] Hui Lui, B., *Statiscal Genomics Linkage, Mapping and QTL Analyses*, CRC Pres, Boca Raton, New York, (1998).
- [86] [http:// www.science.siu.edu/plant biology](http://www.science.siu.edu/plant%20biology)
- [87] Welsh, J., McClelland, M., "Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers", *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218 (1990).
- [88] Caetano-Annoles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M., "High Resolution DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers", *Biotechnology*, 9: 553-557 (1991).
- [89] Başibüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D. L. J., *Phylogenetic systematics, "A practical guide to theory and practice"*, Önder Matbaa, Sivas, Turkey (2000).
- [90] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., "Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction", *Cold Spring Harbor Symp.*, 51: 263-273, (1986).
- [91] Mullis, K., Faloona, F., "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Methods in Enzymology*, 155: 335-350, (1987).

- [92] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A., "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, 239: 487-491, (1988).
- [93] White, T. J., Arnheim, N. and Erlich, H. A., "The polymerase chain reaction", *Trends in Genetics*, 5(6): 185-189, (1989).
- [94] Arnheim ve Erlich, "Polymerase chain reaction strategy", *Assoc. Rev. Biochem.*, 61: 132-156, (1992).
- [95] Avise, J. C., *Molecular markers, natural history and evolution*, New York, (1994).
- [96] <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9E.htm>.
- [97] <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>
- [98] Erlich, H. A., *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*, Stockton Press, 1-246, USA, (1989).
- [99] Caner, V., Çarlı, K. T., "Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve bazı tavuk infeksiyonlarındaki yeri", *J. Fac. Vet. Med.* 20: 137-145, (2001).
- [100] Rafalski, A., Tingey, S.V., Williams, J.G.K., "RADP Markers" *Plant Molecular Biology Manual*, 114: 1-8 (1994).
- [101] Welsh, J., Petersen, C., "Polymorphisms Generated by Arbitrarily Primed PCR in the Mouse: Application to Strain Identification and Genetic Mapping", *Nucleic Acids Research*, 19: 303-306 (1991).
- [102] Mathieu-Daude, F., Ralph, D., McClelland, M., "Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA", ed. Taylor, G.R., CRS Pres, Boca Raton, New York (1997).
- [103] Bardakçı, F., "Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers", *Turk J. Biol.*, 25: 185-196 (2001).
- [104] Tingey, S.V., Del Tufa, J.P., "Genetic Analyses with Random Amplified Polymorphic DNA Markers", *Plant Physiol.*, 101: 349-352 (1993).
- [105] Halden, C., *Characterization and Use of a Multiplex PCR-Based System: Random Amplified Polymorphic DNA*, Ph.D. Thesis, Department of Genetics Lund University, Lund (1998).
- [106] Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Sava, D., Depledge, M., "Optimized RAPD Analysis Generates High-Quality genomic DNA Profiles at High Annealing Temperature", *BioTechniques*, 28: 52-54 (2000).

- [107] Aljanabi, S.M., Forget, L., Dookun, A., "An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide and Poyphenol-Free Sugarcane", *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 1-8 (1999).
- [108] Muralidharan, K., wakeland, E.K., "Concentration of Primer and Template Qualitatively Affects Product in Random Amplified Polymorphic DNA PCR", *Biotechniques*, 14: 362-364 (1993).
- [109] Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., Honeycutt, R.L., "Artifactual Variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA in Banding Patterns", *BioTechniques*, 14: 214-217 (1993).
- [110] Park, Y.H., Kohel, R.J., "Effect of Concentration of MgCl<sub>2</sub> on Random Amplified DNA Polymorphisms", *BioTechniques*, 16: 652-655 (1994).
- [111] Khadanka, D.K., Tuna, M., Tal, M., Nejidat, A., Goldrish, A.G., "Variability in the Pattern of Random Amplified Polymorphic DNA", *Electrophoresis*, 18: 2852-2856 (1997).
- [112] Schweder, M.E., Shatters, R.G., West, S.H., Smith, R.L., "Effect of Transition Interval Between Melting and Annealing Temperatures on RAPD Analyses", *BioTechniques*, 19: 38-42 (1995).
- [113] Bielawski, J.P., Noack, K., Pumo, D.E., "Reproducible Amplification of RAPD Markers from Vertebrate DNA", *BioTechniques*, 18: 856-860 (1995).
- [114] Başıbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D.L.J., *Phylogenetic Systematics*, Önder Matbaa, Sivas (2000).
- [115] Yu, K., Deynze, A.V., Pauls, K.P., *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis*, Glick, B.R., Thompson, J.E., "Methods in Plant Molecular Biotechnology and Biotechnology, CRS Press, 287-299, Florida, USA, (1993).
- [116] Glick, B.R., Pasternak, J.J., *Molecular Biotechnology (Principles and Applications of Recombinant DNA)*, ASM Pres, Washington D.C., (1998).
- [117] Waugh, R., Poweil, W., "Using RAPD Markers for Crop Improvement", *Focus*, 10: 186-191, (June, 1992).
- [118] Grattapaglia, D., et. al., "Mapping in Woody Plants with RAPD Markers: Application to Breeding in Forestry and Horticulture", *Joint Plant Breeding Symposium Series, Application of RAPD Technology and Plant Breeding*, 37-40, Minnesota, (November, 1992).
- [119] Rafalski, J.A., Tingey, S., "Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites and Machines", *Trend Genet.*, 93(8): 275-280, (August, 1993).



- [120] Beaumont, V.H., Mantet, J., Rocheford, T.R., Widholm, J.M., "Comparision of RAPD and RFLP Markers for Mapping F<sub>2</sub> Generations in Maize (*Zea mays* L.)", *Theor. Appl. Genet.*, 93: 606-612, (1996).
- [121] Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmet, M., Kneen, B.E., Lodhi, M.A., "Inheritance and Reliability of RAPD Markers", *Joint Plant Breeding Symposia Series, Application of RAPD Technology to Plant Breeding*, 12-17, Minnesota, (November, 1992).
- [122] Satchwell, M.F., DNA Fingerprinting Hybrid Polar (*Populus spp.*) Clones Using RAPD-PCR with Hot Air Temperature Cycling, State University of New York, College of Environmental Science and Forestry, Syracuse, N.Y., USA, (May, 1998).
- [123] Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S., "genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers", *Methods in Enzymology*, 218: 704-741, (1993).
- [124] Açık, L., Kkkaraarslan, A., Çelebi, A., "Klinik *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları, Plazmit Profilleri ve RAPD-PCR Analizleri", *Gazi Üniversitesi Fen Bil. Ens. Dergisi*, 14/1: 163-169 (2001).
- [125] Özhatay, N., Byfield, A, Atay, S., Türkiye'nin Önemli Bitki Alanları, Doğal Hayatı Koruma Vakfı Yayını, Mas Matbaacılık, İstanbul, (2003).
- [126] Rossetto M., Weaver, P.K. & Dixon, K.W., "Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae)", *Molecular Ecology*, 4: 321-329, (1995).
- [127] Graudal, L., E.D. Kjær and S. Canger, "A systematic approach to conservation of genetic resources of trees and shrubs in Denmark", *For. Ecol. Manage.*, 73:117-134 (1995).
- [128] Drummon, R. S. M., Keeling, D.J., Richardson, T.E., Gardner, R.C., Wright, S.D., "Genetic analysis and conservation of 31 surviving individuals of a rare New Zealand tree, *Metrosideros bartlettii* (Myrtaceae)", *Molecular Ecology*, 9: 1149-1157, (2000).
- [129] Godt, M. W., Hamrick, J. L., Bratton, S., "Genetic diversity in a threatened wetland species, *Helonias bullata* (Liliaceae)", *Conservation Biology*, 9: 596-604, (1995).
- [130] Chengxin, F., Yingxiong Q., Hanghui K., "RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant", *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 44: 13-18, (2003).
- [131] Congiu, L., Chicca, M., Cella, R., Rossi, R., Bernacchia, G., « The use of RAPD markers to identify strawberry varieties: a forensic application", *Molecular Ecology*, 9: 229-232, (2000).

- [132] Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B., "Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology", *Molecular Ecology*, 1: 55-63, (1992).
- [133] Wei, W., Wang, H.X., Hu, Z.A., Zhong, M., Yun, R., Qian, Y.Q., "Primary studies on molecular ecology of *Caragana* spp. populations distribution over Mao Wusu Sandy grassland from RAPD data", *Acta Ecol. Sin.*, 19: 17-21, (1999).
- [134] Gibbs, H. L., Prior, K. A., Weatherhead, P J., "Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers", *Molecular Ecology*, 3:329-337, (1994).
- [135] Vilatersana, R., Garnatje, T., Susana, A., Garcia-Jacas, N., "Taxonomic problems in *Carthamus* (Asteraceae): RAPD markers and sectional classification", *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147 (3): 375, (2005).
- [136] Sun, J.M., Irzykowski, W., Jadrzcka, M., Han, F.X., "Analysis of the Genetic Structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary Populations from Different Region and Host Plants by Random Amplified Polymorphic DNA Markers", *Journal of Integrative Plant Biology*, 47 (4): 385-395, (2005).
- [137] Esselman, E.J., Jianqiang, L., Crawford, D.J., Winduss, J.L., and Wolfe, A.D., "Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and RAPD and ISSR markers", *Molecular Ecology*, 8: 443-451, (1999).
- [138] Hess, J., Kadereit, W., Vargas, P., "The colonization history of *Olea europaea* L. in Macronesia based on ITS-1 sequences, RAPD and ISSR", *Molecular Ecology*, 9: 857-868, (2000).
- [139] Dawson, K., Chalmers, K.J., Waugh, R., "Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israwl using RAPD markers", *Mol. Ecol*, 2: 151-159, (1993).
- [140] Esselman, E.J., Crawford, D.J., Brauner, S., Stuessy, T.F., Anderson, G.J., Silva, M.O., "RAPD marker diversity within and divergence among species of *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae)", *Amer. J. Bot.*, 87: 591-596, (2000).
- [141] Pei, Y.L., Zou, Y.P., Yin, Z., Wang, X.Q., Zhang, Z.X., Hong, D.Y., "Preliminary report of RAPD analysis in *Paeonia suffruticosa* subsp. *spontanea* and *P. rockii*", *Acta Phytotaxon. Sin.*, 33: 350-356, (1995).
- [142] Su, Y.J., Wang, T., Huang, C., "RAPD analysis of different population of *Dacydium pierreii*", *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni*, 38: 99-101, (1999).



- [143] Wang, X.Q., Zou, Y.P., Zhang, D.M., Hong, D.Y., "RAPD analysis for genetic polymorphism in *Cathaya argyrophylla*", *Science in China*, (C) 26: 437-441, (1996).
- [144] Sun, M., Wong, K. C., "Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers", *American Journal of Botany*, 88:2180-2188, (2001).
- [145] Torres, E., Iriando, J. M., Pérez, C., "Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis", *American Journal of Botany*, 90:85-92, (2003).
- [146] Sales, E., Nebauer, S. G., Mus, M., Segura, J., "Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers", *American Journal of Botany*, 88:1750-1759, (2001).
- [147] [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&list\\_uids=7774794&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=retrieve&db=pubmed&list_uids=7774794&dopt=Abstract)
- [148] Ren, M.X., Zhang, Q.G., Zhang, D.Y., "Random amplified polymorphic DNA markers reveal low genetic variation and a single dominant genotype in *Eichhornia crassipes* populations throughout China", *Weed Research*, 45 (3): 236-244, (2005).
- [149] Aga, E., Bryngelsson, T., Bekele, E., Salomon, B., "Genetic diversity of forest arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis", *Hereditas*, 138:36-46, (2003).
- [150] Lim, S. H., Peng, P. C. P., Lee, Y.H., Goh, C. J., "RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae)", *Annals of Botany*, 83:193-196, (1999).
- [151] Kaundum, S. S., Park, Y. G., "Genetic structure of six Korean tea populations as revealed by RAPD-PCR markers", *Crop Science*, 42:594-601, (2002).
- [152] MirAli, N., Nabulsi, I., "Genetic diversity of almonds (*Prunus dulcis*) using RAPD technique", *Scientia Horticultura*, 98:461-471, (2003).
- [153] Brewer, R., McCann, M.T., *Laboratory and Field Manual of Ecology*, CBS College Publishing, USA, 36-37, (1982).
- [154] Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., "A plant DNA miniprep: version II", *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1: 19-21, (1983).
- [155] Pich, U., Schubert, I., "Miniprep Method for Isolation DNA from Plants with a High Content of Polyphenols", *Nucleic Acids Research*, 21: 3328, (1993).

- [156] Nei, M., "Genetic Distance Between Populations", *Am. Nat.*, 106: 283-292, (1972).
- [157] [http://www.tarim.gov.tr/arayuz/6/icerik.asp?efl=mevzuat/teblig/teblig.htm&curdir=\5Cmevzuat\5Cteblig&fl=cicek\\_sogani.htm](http://www.tarim.gov.tr/arayuz/6/icerik.asp?efl=mevzuat/teblig/teblig.htm&curdir=\5Cmevzuat\5Cteblig&fl=cicek_sogani.htm)
- [158] Brauner, S., Crawford, D.J., Stuessy, T.F., "Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae", *Amer. J. Bot.*, 79: 1436-1439, (1992).
- [159] Wang, X.Q., Zou, Y.P., Zhang, D.M., Hong, D.Y., "RAPD analysis for genetic polymorphism in *Cathaya argyrophylla*", *Science in China*, 26: 437-441, (1996).
- [160] Pei, Y.L., Zou, Y.P., Yin, Z., Wang, X.O., Zhang, Z.X., Hong, D.Y., "Preliminary report of RAPD analysis in *Paeonia suffruticosa* subsp. *spontanea* and *P. Rockii*", *Acta Phytotaxon. Sin.*, 33: 350-356, (1995).
- [161] Su, Y.J., Wang, T., Huang, C., "RAPD analysis of different population of *Dacydium pierrei*", *Acta Sci. Nat. Univ. Sunyatseni*, 38: 99-101, (1999).