



Comparative analysis of the genomic DNA isolation methods on some *Silene* L. (Caryophyllaceae)

Emre SEVİNDİK¹, Fatih COŞKUN², Selami SELVİ^{*3}, Süheyla A. ALKAÇ²

¹ Ardahan Üniversitesi Göle Meslek Yüksek Okulu, Göle- Ardahan, Türkiye

² Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Çağış- Balıkesir, Türkiye

³ Balıkesir Üniversitesi Altınoluk Meslek Yüksekokulu, Altınoluk- Balıkesir, Türkiye

Abstract

In this study, genomic DNA isolation methods on six taxa belonging to two different sections of the aromatic plant genus *Silene* L. (Caryophyllaceae) were investigated. The gDNA isolation methods were investigated on two taxa from the section *Brachypodeae* Boiss. (*S. leptoclada* Boiss. and *Silene balansae* Boiss.) and four taxa from the section *Auriculatae* Boiss. (*S. araratica* Schischk. subsp. *araratica*, *S. lucida* Chowdh. subsp. *lucida*, *S. oligotricha* Hub.-Mor. and *S. caucasica* (Bunge) Boiss.). During the study, Phenol-chloroform-isoamyl alcohol isolation procedure and Sigma DNA isolation commercial kit protocol were used. Purity and the amount of obtained gDNAs were determined via gel electrophoresis and spectrophotometry (A_{260}/A_{280}). Based on the results of the taxa studied, Phenol-chloroform-isoamyl alcohol isolation procedure was found as the method yielding the highest amount of the DNA as ng in 1 stock.

Key words: Genomic DNA isolation, *Silene*, Phenol-chloroform-isoamyl alcohol, commercial kit.

----- * -----

Genomik DNA izolasyon metotlarının bazı *Silene* L. (Caryophyllaceae) taksonları üzerinde karşılaştırmalı analizi

Özet

Bu çalışmada aromatik bitkilerden *Silene* L. (Caryophyllaceae) cinsinin iki farklı seksiyonuna ait altı taksonu üzerinde genomik DNA izolasyon metotları araştırılmıştır. *Brachypodeae* Boiss. seksiyonundan 2 takson (*S. leptoclada* Boiss. ve *S. balansae* Boiss.) ve *Auriculatae* Boiss. seksiyonundan ise 4 takson üzerinde (*S. araratica* Schischk subsp. *araratica*, *S. lucida* Chowdh. subsp. *lucida*, *S. oligotricha* Hub.-Mor. ve *S. caucasica* (Bunge) Boiss.) genomik DNA izolasyon metotları araştırılmıştır. Çalışma süresince, Fenol-kloroform-izoamilalkol izolasyon protokolü ve ticarî DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Elde edilen genomik DNA örneklerinin miktarları ve saflık dereceleri jel elektroforezi ve spektrofotometre (A_{260} / A_{280}) ölçümleriyle belirlenmiştir. Taksonlar üzerinde yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, 1 µl stokda ng cinsinden en çok genomik DNA elde edilmesini sağlayan yöntemin Fenol-kloroform-izoamilalkol olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Genomik DNA izolasyonu, *Silene*, fenol-kloroform-izoamilalkol, ticari kit.

1. Giriş

Silene L., yaklaşık 750 tür ile, dünyanın en geniş çiçekli bitkilerinden birisidir. Aynı zamanda, Caryophyllaceae familyasının da en büyük cinsini oluşturmaktadır (Melzhemier, 1988; Kandemir vd., 2009). Bu cinsin üyeleri; Afrika, Güney Amerika ve Avrasya da yayılış göstermektedir (Desfeux et al., 1996; Korkmaz 2012). Türkiye’de *Silene* cinsi 31 seksiyona ayrılmış 165 taksonla temsil edilmekte olup bu taksonların %45’i Türkiye için endemiktir (Yıldız ve Çırpıcı, 2013).

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905302212679; Fax.: +902663961509; E-mail: sselvi2000@yahoo.com

Silene cinsine ait bazı türler, içeriğinde bulunan saponin maddesinden dolayı ekonomik ve tıbbi amaçlarla değerlendirilmektedir. Özellikle *Silene vulgaris* (Moench) Garcke türünün saponin içeriği bakımından yüksek olan çiçekli dallarından yapılan % 5'lik infüzyonlar halk arasında idrar kesesi ve yollarında görülen hastalıkların tedavisinde çay olarak tüketilmektedir (Baytop, 1999). Ayrıca; bazı *Silene* taksonları gösterişli petalleri ve çiçek durumlarının güzel görüntüsünden dolayı park ve bahçelerde süs bitkisi olarak sıklıkla tercih edilmektedir (Hogan, 2004).

Moleküler genetik araştırmaların ilk adımı genomik DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesi ile başlamaktadır. Genomik DNA'nın elde edilmesi hücre zarının eritilmesi, proteinlerin parçalanması, proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması ve DNA'nın çöktürülerek saflaştırılması gibi başlıca adımları içerir (Bozkaya, 2012). Türlerin belirlenmesi için yapılan DNA temelli çalışmalar; RAPD, RFLP, genom haritası, DNA parmak izi gibi çalışmalardır. Bu teknikler için yüksek saflıkta DNA'ya ihtiyaç vardır. Pek çok bitki türünde başarıyla uygulanan DNA izolasyon protokolleri mevcuttur. Ancak bitkiler arasında biyokimyasal açıdan oldukça farklı kompozisyonlar bulunmaktadır. DNA izolasyonu, yapılarında yüksek oranda fenoller, ketonlar, aldehitler, polisakkaritler gibi sekonder metabolitleri içeren bitkilerde problemler olabilir (Aydın ve Köçkar, 2008).

Farklı gDNA izolasyon yöntemlerinin belirlenmesi üzerine gerçekleştirilmiş çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmüştür (Aydın ve Köçkar, 2008; Şimşek vd., 2008; Kabilan vd., 2009; Bozkaya 2012). Aydın ve Köçkar (2008), *Satureja* (Labiatae) taksonları üzerinde 3 farklı DNA izolasyon yöntemi uygulamıştır. Bu yöntemle elde edilen gDNA'da, proteinler, RNA, polisakkaritler, uçucu yağlar, fenoller ve diğer kirleticiler minimal düzeyde olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca elde edilen bu DNA'ların saflığı ve miktarı jel elektroforezi ve UV (A260 /A280 ve A260 /A230) spektroskopik ölçümlerle tespit edilmiştir.

Şimşek vd. (2008), yapmış oldukları araştırmalarında, fındık, avokado, trabzon hurması, mandarin ve portakal türlerinden, MiniPrep DNA izolasyon yöntemi ve bu yöntemin modifiye edilmiş versiyonlarını kullanarak DNA elde etmişlerdir. Test edilen yöntemlerde ekstraksiyon tampon çözeltileri içinde; yalnızca CTAB, CTAB ve PVP beraber (CTAB+PVP), CTAB ve SDS (CTAB+SDS) beraber ve yalnızca SDS olacak şekilde hazırlamışlardır. Bu izolasyon yöntemleri sonrasında elde ettikleri DNA'ların konsantrasyon ve kalitelerini karşılaştırma yaparak yorumlamışlardır. Bozkaya (2012) ise; Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemlerinde kullanılmak üzere kandan gDNA izolasyonu amacıyla fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi yerine potasyum asetat çözeltisi kullanımının elde edilen DNA miktarı ve kalitesi üzerine etkisini araştırmıştır. Sonuç olarak DNA izolasyonunda proteinleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla potasyum asetat kullanıldığında fenol-kloroform-izoamil alkol grubuna göre daha düşük düzeyde DNA elde edilmiş olsa da yeterli miktar ve kalitede DNA elde edilebildiği sonucuna ulaşmıştır. Kabilan vd. (2009) yenilebilir funguslar üzerinde gDNA izolasyon yöntemleri uygulamışlardır. Çalışmalarında CTAB ve potasyum asetat/SDS metodlarını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda her iki metodun da gDNA izolasyonu için başarılı bir biçimde kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada iki farklı seksiyona ait 6 takson üzerinde gDNA izolasyon metodları araştırılmıştır. Bu çalışma ile; taksonların moleküler yapılarına dayalı sistematizinin aydınlatılması için gerekli olan uygun moleküler yöntemlerin tespit edilmesi amaçlanmış ve ileride bu taksonlarla yapılacak moleküler çalışmalara katkı sağlaması hedeflenmiştir.

2. Materyal ve yöntem

2.1 Bitki Örnekleri:

DNA izolasyonu için toplanan *Silene* cinsine ait taksonlar ve toplanma lokaliteleri tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Silene* taksonlarının toplandığı lokaliteler

Table 1. Collection localities of the *Silene* taxa.

Taksonlar	Lokaliteler
<i>S. leptoclada</i>	C3 Isparta: Dedegül dağı, Pınarözü mesireliği üzeri, alpinik step, 2400-2800m, 20.08.1995 Özçelik 7294.
<i>S. balansae</i>	B6 Kayseri: Sarız, Binboğa dağları ziyaret tepesi mevki üst kesimleri, kayalık yerler, 1950-2300m 14.07.2005. Kılıç & Özçelik 679.
<i>S. araratica</i> subsp. <i>araratica</i>	B9 Van: Çaldıran, Soğuksu-Doğubeyazıt karayolu, 2200-2500 m, 03.07.2006, Özçelik 12534.
<i>S. lucida</i> subsp. <i>lucida</i>	B5 Kayseri: Develi, Bakır Dağı etekleri, kayalıklar, 1500-1530 m, 09.07.2005, Kılıç & Özçelik 658.
<i>S. oligotricha</i>	B7 Tunceli: Pülümür-Mutu arası, zirve karakol civarı, 1700-2000m, 08.07.2006, Özçelik 12447.
<i>S. caucasica</i>	B9 Van: Gevas-Tatvan arası, Pelli dağı 2600-2775m 13.07.2006, Özçelik 12498.

Toplanan taksonlara ait yaprak örnekleri, gDNA izolasyonu yapılana kadar -80 °C’ de derin dondurucuda muhafaza edilerek, çözünmesine fırsat verilmeden izolasyonu yapılmıştır.

2.2 DNA izolasyonları

2.2.1 Fenol-cloroform-izoamilalkol protokolü ile izolasyon

Bu yöntemde Dellaporta ve ark. (1983)’nın izolasyon yönteminin modifiye edilmiş şekli kullanılmıştır. Bu yöntemde; 1 gr yaprak dokuları sıvı azot ile ezilir, ezilen örnekler eppendorf tüplere alınır ve üzerine 600 µl izolasyon tamponu eklenir ve çözünür. Üzerine 500 µl fenol-cloroform-izoamilalkol eklenir ve santrifüj yapılır. Böylece proteinler çöker DNA üstte kalır. Oluşan süpernatant yeni tüpe aktarılır ve üzerine süpernatant hacminin %10 u kadar 3M NaAc, pH=5.2 eklenir. Üzerine 500 µl izopropanol eklenir. Bu aşamada DNA çıplak gözle görülür. Santrifüj yaptırılarak DNA çöktürülür ve dipte pellet oluşur. Üstteki çözelti atık şişeye konulur. Oluşan pellete 500 µl TE (10mM, pH=8) eklenir. (Pellete dokunulmadan pipetajla çözülmesi gerekir.) 5 µl RNaz A eklenir ve alt üst edilir. Pipetaj yapılır yağsı tabaka homojen hale getirilir. 30 dk 37°C de inkübe edilerek RNA nın uzaklaştırılması sağlanır. Sonra tekrar 50 µl NaAc (3M) eklenir ve alt üst edilir. Daha sonra 1 ml %90 lık ETOH eklenip alt üst edilir. -80°C de 10 dk bekletilir ve bekleme süresi sona erince santrifüj yapılarak çökeltme sağlanır. Etanol boşaltılır. Üstteki süpernatant çöpe atılır, altta pellet kalır. Kalan çökelti %70 lik ETOH ile yıkanır(pipetaj yapılarak) santrifüj yapılır. Santrifüjden sonra üstteki etanol alınır ve dipte pellet kalır. Oluşan pellet %90’ lık ETOH ile yıkanır ve santrifüj yapılır. Santrifüjden sonra üstteki etanol atılır. Dipte kalan pellet kurutma kağıdına yatırılarak etanolün iyice uçurulması sağlanır. Son olarak dipte kalan pellet 50 µl TE eklenerek iyice çözülür ve kullanıma hazır hale getirilir.

2.2.2 Ticari DNA izolasyon kiti ile izolasyonlar

1 gr’lık bitki örnekleri sıvı azot ile havanda toz haline getirilir. Üzerine 350 µl lysis solution (Part A) eklenir. Daha sonra 50 µl lysis solution (Part B) eklenir ve vortex yapılır. Bu karışımın üzerine 4 µl RNaz A pipetaj yapılarak eklenir. 65 °C de 10 dk inkübasyona bırakılır. Örnekler su banyosundan alınır ve 130 µl precipitation solution eklenir. 5 dk buzda bekletilir ve akabinde santrifüj yapılır. Sıvı kısım alınır mavi filtreli tüpe aktarılır, çökelti atılır. Santrifüj yapılır ve kolon çöpe atılır collection tüp kalır. 700 µl binding solution eklenir ve toplamda 1000 µl civarında bir hacim oluşur. Daha sonra binding kolonu hazırlanır. Bunun için kırmızı kolonlu tüplere 500 µl column preparation solution eklenir ve santrifüj yapılır. Collection tüpleri atılır kırmızı filtreli kolonlar alınır. Böylece binding kolonu hazır hale gelir. Daha önceki basamaktaki collection tüplerdeki çözeltini 700 µl si kırmızı kolonlu yeni tüplere aktarılır santrifüj yapılır, sıvı atılır ve collection tüp kalır. Kırmızı kolonlar collection tüplere yeniden konulur. Geriye kalan 300 µl lik karışım kolondan geçirilir ve santrifüj yapılır. Sıvı ve kolon atılır. Kolon, yıkanması için yeni bir collection tüpe yerleştirilir. 500 µl wash solution eklenir ve santrifüj yapılır. Sıvı atılır collection tüp kalır. Tekrar wash solution eklenir ve santrifüj yapılır. Sıvı kolona tema ettirilmeden atılır. Kolon yeni collection tüplere yerleştirilir. Üzerine 100 µl elution solution eklenir ve santrifüj yapılır. Kolon sıvıya temas ettirilmeden alınır ve collection tüplere yerleştirilir. 100 µl elution solution tekrar eklenir ve santrifüj yapılır. Kolon atılır ve DNA’lar kullanıma hazır hale gelir.

3. DNA örneklerinin saflık ve miktar tayini

Tüm yöntemlerle izole edilen DNA örnekleri jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Bunun için %0,8 lik jel elektroforezi kullanılmıştır. Genomik DNA’nın saflığını sayısal değerlerle ifade edebilmek için spektrofotometre ile absorbans değerleri (A260/A280) ölçülmüş, saflığı ve miktarı hesaplanmıştır(Sambrook ve ark. 1989).

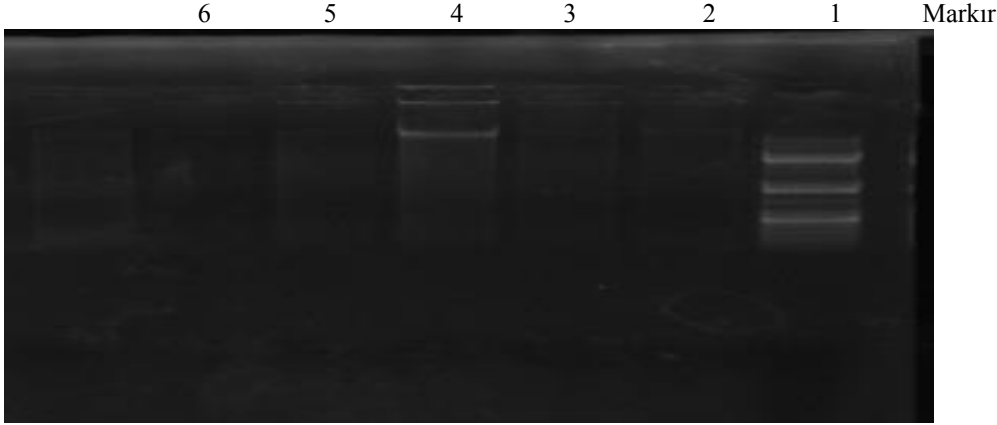
Tablo 2.*Silene* türlerine ait gDNA’ların Spektrofotometrik Ölçümleri, Saflık Miktarı ve DNA’ların Miktar Tayinleri (F=Fenol-cloroform-izoamilalkol, K= Ticari kit).

Table 2. Spectrophotometric Measurements, Purity Amounts, and DNA Amounts of the gDNAs belonging to the *Silene* species.

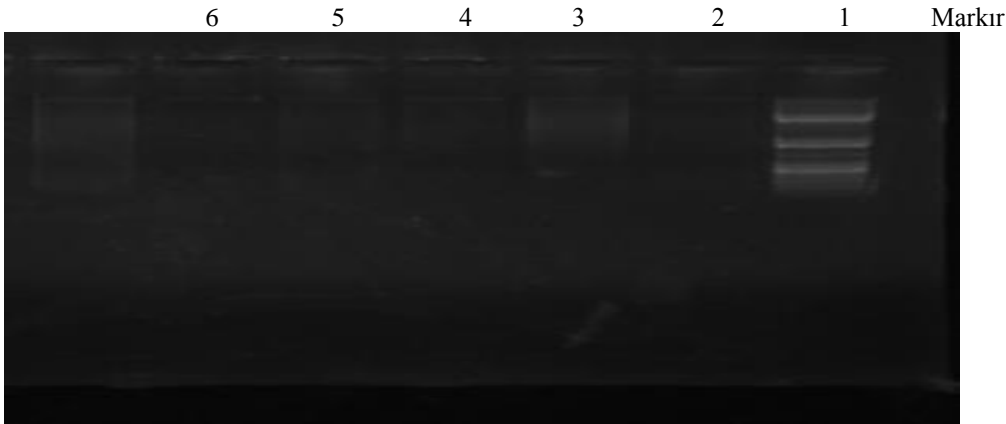
Taksonlar	A260	A280	Saflık aralığı	DNA miktarı
<i>S. leptoclada</i>	0,136 (F)	0,087 (F)	1,56 (F)	273 (F)
	0,044 (K)	0,047 (K)	0,93 (K)	21 (K)
<i>S. balansae</i>	0,049 (F)	0,027 (F)	1,81 (F)	98 (F)
	0,018 (K)	0,010 (K)	1,8 (K)	37 (K)
<i>S. araratica</i> subsp. <i>araratica</i>	0,133 (F)	0,082 (F)	1,62 (F)	266 (F)
	0,023 (K)	0,017 (K)	1,35 (K)	46 (K)
<i>S. lucida</i> subsp. <i>lucida</i>	0,067 (F)	0,043 (F)	1,55 (F)	133 (F)
	0,027 (K)	0,017 (K)	1,58 (K)	55 (K)
<i>S. oligotricha</i>	0,102 (F)	0,068 (F)	1,50 (F)	203 (F)
	0,013 (K)	0,008(K)	1,62 (K)	25 (K)
<i>S. caucasica</i>	0,092 (F)	0,055 (F)	1,67 (F)	184 (F)
	0,004 (K)	0,005 (K)	0,8 (K)	7 (K)

4. Sonuçlar ve tartışma

“İzolasyon metotlarından sonra DNA örnekleri %0.8 agaroz jel de 100V da 40 dakika yürütülmüş ve jel fotoğrafları çekilmiştir. *Silene* örneklerinin gDNA jel fotoğrafı Şekil 1’de gösterilmiştir,



Şekil 1. Fenol-kloroform izoamil alkol izolasyon protokolü ile elde edilen *Silene* örneklerinin gDNA Jel fotoğrafı. 1. *S. leptoclada*, 2. *S. balansae*, 3. *S. lucida* subsp. *lucida*, 4. *S. oligotricha*, 5. *S. caucasica*, 6. *S. araratica* subsp. *araratica*.
Figure 1. gDNA gel image of *Silene* samples obtained by phenol-chloroform isoamyl alcohol isolation protocols. 1. *S. leptoclada*, 2. *S. balansae*, 3. *S. lucida* subsp. *lucida*, 4. *S. oligotricha*, 5. *S. caucasica*, 6. *S. araratica* subsp. *araratica*.



Şekil 2. Ticari Kit izolasyon protokolü ile elde edilen *Silene* örneklerinin gDNA Jel fotoğrafı. 1. *S. leptoclada*, 2. *S. balansae*, 3. *S. lucida* subsp. *lucida*, 4. *S. oligotricha*, 5. *S. caucasica*, 6. *S. araratica* subsp. *araratica*.
Figure 2. gDNA gel image of *Silene* samples obtained by Commercial Kit isolation protocols. 1. *S. leptoclada*, 2. *S. balansae*, 3. *S. lucida* subsp. *lucida*, 4. *S. oligotricha*, 5. *S. caucasica*, 6. *S. araratica* subsp. *araratica*

Yapılan çalışmada *Silene* cinsine ait 6 taksona 2 farklı gDNA izolasyon protokolü uygulanmış ve saflık, miktarları karşılaştırılmıştır. Fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi ile elde edilen DNA’ların saflık değeri diğer yönteme kıyasla bazı türlerde yüksek olup A_{260}/A_{280} oranı ortalama 1.61 değerindedir. Ticari kit ile uygulanan izolasyon sonucu A_{260}/A_{280} oranı ortalama 1.34 olup diğer yöntemden düşük olduğudur. Bu durumda beklenen aksine ticari kit ile yapılan DNA izolasyonunun, fenol-kloroform-izoamil alkol metodundan daha düşük saflıkta bir izolasyon gerçekleştirdiği görülmektedir. Genelde fenol-kloroform-izoamil alkol metodu (fenolün kirli bir madde olmasından dolayı) dezavantajına rağmen miktar ve saflık olarak daha yüksek izolasyon sonucu vermiştir. Aslında ticari kitlerde genelde daha yüksek bir miktar ve saflık oranı haklı olarak beklenmektedir. Ancak bu çalışmada ilginç bir şekilde durum farklı çıkmıştır. Bu izolasyonlar sonrasında yapılan PZR reaksiyonlarında (burada gösterilmemiştir), fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemiyle elde edilen örneklerin (fenol kirliliğinden dolayı) birkaç kez seyreltilmiş (10^{-1} , 10^{-2} , veya 10^{-3}) olanlarının kalıp DNA olarak kullanıldığı PZR’lerde, sonuçların daha iyi çıktığı. Bu PZR’lerden yapılan DNA dizilemelerinin daha başarılı olduğu görülmüştür. Kitlerle genelde daha az miktarda yaprak örneği kullanılması-ki bu bir avantajdır ve bunun sonucu daha az miktarda DNA elde edildiği görülmektedir. Az miktarda gDNA elde edilmesi sonucu da yapılan PZR’lerde (farklı izolasyon metotları karşılaştırıldığında) başarının zaman zaman fenol örneklerinde zaman zaman ise Ticari Kiti’nde daha yüksek olduğu görülmüştür. Tabii ki bunda en

büyük etkenin araştırılan/kullanılan bitkilerin yaprak içeriğinde sekonder metabolit çeşitlerinin ve miktarlarının etkisinin çok büyük olduğu söylenebilir.

Silene cinsine ait taksonlar üzerinde yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, 1 µl stokda ng cinsinden en çok DNA elde etmemizi sağlayan yöntem Fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemidir. Bu yöntem kullanılarak yapılan DNA izolasyonlarından ortalama 192.8 ng / µl DNA elde edilmiştir. Bu oranı diğer protokol olan Ticari kit ile kıyasladığımızda Fenol ile yapılan izolasyon sonucu elde edilen miktarın fazla olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma *Silene* cinsine ait bazı taksonlar için etkili DNA izolasyon protokollerini tanımlamıştır. Farklı türler veya farklı cinsler için farklı izolasyon protokolleri gerekebilir. Fenol-kloroform-izoamilalkol yöntemi uygulanması kolay ve ucuz bir yöntemdir. Ticari kitin ise kullanımı kolay, az miktarda yaprak örneği gerektiren, zamandan tasarruf ettiren, fakat pahalı bir metottur. Fenol-kloroform-izoamil alkol ve ticari kitler alternatif olarak kullanılabilir. Laboratuvarımızdaki tecrübelerimize göre problemlerli bitki türlerinin izolasyonunda bir metoda bağlı kalmaksızın alternatif metodların (Fenol-kloroform-izoamil alkol, CTAB veya 2X CTAB, SDS, veya CTAB+Fenol-kloroform-izoamil alkol gibi) ayrı ayrı veya zaman zaman birleştirilerek denemesi/kullanılması daha isabetli sonuçların elde edilmesine yol açacaktır.

Teşekkür

Çalışma süresince kullandığımız bitki materyallerinin bize temin eden ve teşhislerini gerçekleştiren Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZÇELİK'e teşekkür ederiz

Kaynaklar

- Aydın, S.Ö., Köçkar, F. 2008. Farklı genomik dna izolasyon yöntemlerinin *Satureja (labiatae)* türlerinde uygulanması. BAÜ FBE Dergisi. 1:52-60.
- Baytop, T. 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, s:209-210.
- Bozkaya, F. 2012. DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktarı ve Kalitesi Üzerine Etkisi. Harran Üniv Vet Fak Derg, 1(2):92-96.
- Desfeux, C., S. Maurice, J.-P. Henry, B. Lejeune, and P.-H. Gouyon. (1996) Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proceedings. Biological Sciences/ The Royal Society* 263: 409-414.
- Hogan, S. 2004. Flora, A Gardener's Encyclopedia, Volume 2, Gordon Cheers publishing, Sayfa:1340-1341.
- Kabilan M., Arun, B., Saraswathy, N., Ramalingam, P. 2009. Comparative study on efficiency of genomic DNA Extraction methods in edible mushrooms. *Advanced Bio Tech*, 8:23-24.
- Korkmaz, M., Özçelik, H. 2012. Habitat properties of annual *Gypsophila* L. (Caryophyllaceae) taxa of Turkey. *Biodicon*. 5/1 (2012) 11-22.
- Kandemir, A., Genç, GE, Genç, İ. 2009. *Silene dumanii* (Caryophyllaceae), a new species from East Anatolia, Turkey. *Ann. Bot. Fennici* 46:71-74.
- Melzheimer V (1988). *Silene* L. In: Rechinger KH (ed.), *Flora Iranica*, Vol. 163, pp. 341-508, Austria: Graz.
- Bittrich V (1993). Caryophyllaceae. In: Kubitzki K, Rohrer J & Bittrich V (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 2, Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families, p. 233. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Budak, Ü. & Koç, M. (2010). *Silene hamzaoglu* (Caryophyllaceae), a new species from Çekerek (Yozgat, Turkey). *Turk J Bot*. 35: 285-289.
- Kılıç, S. & Özçelik, H. (2008). Taxonomic Revision of *Silene* L. Sect. *Brachypodeae* (Boiss.) Chowdhuri (Caryophyllaceae). *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 2 (2): 59-63.
- Havey, M.J. 1991. Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of chloroplast genome", *Theor. Appl. Genet.* 81:752.
- Yang, X., Quiros, C. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86:205.
- Aydın, S.Ö., Köçkar, F. 2008. Farklı genomik dna izolasyon yöntemlerinin *Satureja (labiatae)* türlerinde uygulanması. BAÜ FBE Dergisi. 1:52-60.
- Şimşek, Ö., Karaat, F.E., Serçe, S., Kaçar, Y.A. 2008. Bazı Meyve Türlerinde Dna İzolasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 25(1):59-69.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., "A Plant DNA Minipreparation: Version II". *Plant Molecular Biology Reporter*, 1/4, (1983) 19-21.
- Sambrook, J., Russell, D.W., Maniatis, T, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, N. Y. (1989).
- Yıldız, K., Çırpıcı, A.H. 2013. Taxonomic revision of *Silene* (Caryophyllaceae) sections *Siphonomorpha*, *Lasiostemon*, *Sclerocalycinae*, *Chloranthae*, *Tataricae*, and *Orites* in Turkey. *Turkish Journal of Botany* 37:191-218.

(Received for publication 23 March 2013; The date of publication 15 December 2013)