T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ISATIS FLORIBUNDA BOISS. EX BORNM. (BRASSICACEAE) BİTKİSİNDE RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayna DOVLETOVA

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet KARACA

AKSARAY, 2019

T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ISATIS FLORIBUNDA BOISS. EX BORNM. (BRASSICACEAE) BİTKİSİNDE RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayna DOVLETOVA

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet KARACA

AKSARAY, 2019

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve gerek deney aşamasında gerekse tez yazımı aşamasında bilgi, tecrübe ve anlayışlarıyla bana daima yol gösteren ve destek olan, kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan sayın danışman hocam Doç. Dr. Mehmet KARACA'ya tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Yine önemli deneyimleri ile her zaman yardımcı olan Doç. Dr. Mehtap TEKŞEN'e ve Doç. Dr. Seher KARAMAN ERKUL'a, çalışmalarımı yapmama olanak sağlayan Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (ASÜBTAM) ve yöneticilerine,

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Nazente ATÇEKEN'e, desteklerini benden esirgemeyen anneme ve kardeşime teşekkür ederim.

Ayna DOVLETOVA

AKSARAY, 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iii
ABSTRACT iv
ŞEKİLLER DİZİNİ v
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
1. GİRİŞ.. 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ 2
2.1 Bitki Biyoçeşitliliği ve Türkiye 2
2.1.1 Türkiye'de endemizm 5
2.2 *Isatis* Cinsinin Sistematiği 8
2.3 *Isatis floribunda* Boiss. ex Bornm. Sistematiği 11
2.3.1 Sistematik bilgi 12
2.3.2 Morfoloji 12
2.4 Bitki Genetiği ve Moleküler Markır Teknolojisi 13
2.4.1 Fenotipik (morfolojik) markır 14
2.4.2 Biyokimyasal markır 14
2.4.3 Moleküler markır 15
2.4.3.1 Hibridizasyon temelli moleküler markır 16
2.4.3.2 PCR temelli moleküler markır 17
2.4.3.3 Sekansa özgü PCR temelli markırlar 21
3. MALZEME ve YÖNTEM 28
3.1 Örnek Lokalitesi 28
3.2 Genomik DNA İzolasyonu 28
3.3 DNA Miktar Tayini 31
3.4 RAPD-PCR Döngüsü ve Reaksiyon Koşulları 32
3.4.1 RAPD-PCR reksiyon karışımı 32
3.4.2 RAPD-PCR reaksiyon koşulları 32
3.5 RAPD-PCR Primerleri 32
3.6 Agaroz Jel Elektroforezi 33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 35
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR 46
KAYNAKLAR 49
EKLER 58
EK A. 58
EK B. 59
EK C. 63
ÖZGEÇMİŞ 64

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ISATIS FLORIBUNDA BOISS. EX BORNM. (BRASSICACEAE) BİTKİSİNDE RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

Ayna DOVLETOVA

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Mehmet KARACA

ÖZET

Türkiye, bitki biyoçeşitliliği ve endemizmi açısından dünyadaki zengin ve ilginç ülkelerden biridir. *Isatis* cinsi 32 türü ve 22'si endemik 47 taksonu ile ükemiz sınırları içinde dağılım göstermektedir. Literatür taramalarında endemik *Isatis floribunda* Boiss. ex Bornm. (deliızgın) bitkisinde genetik çeşitliliği gösteren moleküler genetik bir çalışmanın henüz yapılmadığı görülmüştür. Bu tez çalışmasının amacı, genetik çeşitliliği duyarlılık ve etkinlikle saptamaya olanak veren RAPD-PCR yöntemini kullanarak *Isatis floribunda*'da RAPD markırlarını oluşturmak ve moleküler genetik analiz sonuçlarını literature kazandırmaktır. PCR reaksiyonları sonucunda toplamda 114 adet bant gözlemlenmiştir. Bu bantların 95'i polimorfik, 19'u ise monomorfik bant olarak değerlendirilmiştir. Total polimorfizm oranı %83.3 olarak tespit edilmiştir. Kullanılan 15 adet primerinden sadece OPA-14 ile istenilen polimorfik RAPD bantları amplifiye edilememiştir. Geri kalan 14 primerin altısında (MM, OPA-08, OPA-12, OPA-13, OPA-15 ve OPA-18) %100 polimorfizm oranına ulaşılırken, sekiz primerde ise %25-90.9 arasında değişen polimorfizm değerleri bulunmuştur. Toplam 95 adet olan polimorfik bandın 31'i populasyona spesifiktir. Bu sonuç, yayılım alanları arasında Aksaray'ın da olduğu belirtilen *Isatis floribunda* endemik türünün aslında kendi gen merkezi sınırları içinde de genetik çeşitliğini devam ettirebildiğini, populasyonlar arasında genetik varyasyon düzeyinin yüksek olduğunu göstermesi açısından da önemli bir veridir. Tez çalışması bu konuda yapılan ilk bilimsel araştırma özelliği taşıması nedeniyle; *Isatis floribunda* türüyle yapılacak sonraki moleküler genetik çalışmalarda kullanılabilecek faydalı literatur bilgileri sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: *Isatis floribunda*, RAPD-PCR, Genetik Çeşitlilik, DNA Polimorfizmi.

Aralık, 2019; 64 sayfa

M.Sc. THESIS

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS WITH RAPD-PCR METHOD AT *ISATIS FLORIBUNDA* BOISS. EX BORNM. (BRASSICACEAE)

Ayna DOVLETOVA

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KARACA

ABSTRACT

Turkey is one of the richest bio-geographic regions in the world in terms of plant biodiversity, plant genetic resources and endemism. *Isatis* genus is distributed within the borders of our country with its 32 species and 47 taxa of which 22 are endemic. In the literature reviews, it has been observed that a molecular genetic study showing genetic diversity in the *Isatis floribunda* Boiss. ex Bornm. (deliızgın) has not been performed yet. The purpose of this thesis is to create RAPD markers in *Isatis floribunda* by using RAPD-PCR method which enables detection of genetic diversity with sensivity and efficiency and to bring molecular genetic analysis results into literature. As a result of PCR reactions, a total of 114 bands were observed. 95 of these bands were evaluated as polymorphic and 19 of them monomorphic bands. Total polymorphism rate was detected as 83.3%. Of the 15 primers used, only OPA-14 desired polymorphic RAPD products could not be amplified. Six of the remaining 14 primers (MM, OPA-08, OPA-12, OPA-13, OPA-15 ve OPA-18) achieved 100% polymorphism while eight primers had polymorphism values ranging from 25-90.9%. 31 of the 95 polymorphic bands are population spesific. This result is an important finding in terms of showing that the endemic species of *Isatis floribunda* which is located in Aksaray, can maintain genetic diversity within its own gene center boundaries and that the level of genetic variation among population is high. This thesis is the first scientific research on this subject; it will provide useful literature information that can be used in subsequent molecular genetic studies on *Isatis floribunda* species.

Keywords: *Isatis floribunda*, RAPD-PCR, Genetic Diversity, DNA Polymorphism.

December 2019, 64 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünya üzerindeki bitki coğrafik bölgelerinin dağılımı 3
Şekil 2.2. Türkiye'deki fitocoğrafik bölgeler ve dağılımı 4
Şekil 2.3. Türkiye'de sıcaklığın dağılışı 4
Şekil 2.4. Türkiye'de yağışın dağılışı 5
Şekil 2.5. Ülkelere göre endemizm oranları 6
Şekil 2.6. Türkiye'deki ve dünyadaki endemik bitki sayısı 7
Şekil 2.7. Türkiye'de endemik bitki sayılarının dağılışı 8
Şekil 2.8. *Isatis* cinsinin dünya üzerindeki dağılım alanları 10
Şekil 2.9. *Isatis floribunda* türünün ülkemizdeki yayılış alanları 11
Şekil 2.10. Isatis floribunda (Aksaray İli, Gücünkaya köyü girişi) 13
Şekil 2.11. RFLP teknolojisinin şematik gösterimi 17
Şekil 2.12. PCR döngüsünün basamakları 18
Şekil 2.13. RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi 19
Şekil 2.14. AFLP tekniğinin şematik gösterimi 21
Şekil 2.15. Mikrosatellit tekrar sayısını belirlemede PCR reaksiyonu 22
Şekil 2.16. CAPS tekniğinin uygulanışı 24
Şekil 2.17. RAMP tekniği 25
Şekil 2.18. SRAP markır tekniği 26
Şekil 2.19. SSCP markırları 27
Şekil 3.1. Yaş yaprak örneklerini DNA izolasyonu için sıvı azot ile ezme işlemi. 30
Şekil 3.2. Farklı populasyonlara ait (1-8) *Isatis floribunda* örneklerinin ve PK= pozitif kontrol örneğinin genomik DNA agaroz jel elektroforezin görüntüsü 31
Şekil 4.1. CRA-22 primerinin agaroz jel görüntüsü. 38
Şekil 4.2. CRA-23 primerinin agaroz jel görüntüsü. 38
Şekil 4.3. CRA-25 primerinin agaroz jel görüntüsü. 39
Şekil 4.4. CRA-26 primerinin agaroz jel görüntüsü. 39
Şekil 4.5. Hip-CA primerinin agaroz jel görüntüsü. 40
Şekil 4.6. Hip-GC primerinin agaroz jel görüntüsü. 40
Şekil 4.7. Hip-TG primerinin agaroz jel görüntüsü. 41
Şekil 4.8. MM primerinin agaroz jel görüntüsü. 41
Şekil 4.9. OPA-08 primerinin agaroz jel görüntüsü 42
Şekil 4.10. OPA-11 primerinin agaroz jel görüntüsü. 42
Şekil 4.11. OPA-12 primerinin agaroz jel görüntüsü. 43
Şekil 4.12. OPA-13 primerinin agaroz jel görüntüsü. 43
Şekil 4.13. OPA-14 primerinin agaroz jel görüntüsü. 44
Şekil 4.14. OPA-15 primerinin agaroz jel görüntüsü. 44
Şekil 4.15. OPA-18 primerinin agaroz jel görüntüsü. 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. *Isatis floribunda* örneklerin lokaliteleri 28
Çizelge 3.2. Genomik DNA nanodrop ölçümleri 31
Çizelge 3.3. RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin özellikleri 33
Çizelge 4.1. *Isatis floribunda* populasyonlarından elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin genel değerlendirilmesi 35
Çizelge 4.2. RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri ve polimorfizmyüzdeleri.....36

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (Amplified fragment lenght polymorphism)
AP-PCR	Arbitrarily primed-PCR
ASO	SNP farklılıklarını belirlemede allele spesifik hibridizasyon tekniği
bç	Baz çifti (Base pair)
C	Sitozin
CAPS	Çoğaltılmış kesilmiş polimorfik dizi (Cleaved amplified polymorphic sequence)
cm	Santimetre
CTAB	Hexadecyltrimethylamonium bromide
DAF	DNA çoğaltımlı parmakizi (DNA amplification fingerprinting)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleozit trifosfat
dk	Dakika
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EST	İfade edilen dizi etiketi (Expresse sequence tags)
G	Guanin
gr	Gram
ISSR	Basit dizi tekrarları arası (Inter simple sequence repeats)
M	Molar
mA	Miliamper
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
ORF	Açık okuma çerçevesinin (Open reading frame)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PK	Proteinaz K
pmol	Pikomol
PVP-40	Polivinil pirolidon-40
RAMP	Rastgele çoğaltılmış mikrosatellit polimorfizmler (Randomly amplified microsatellite polymorphisms)
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Random amplified polymorphic DNA)
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Restriction fragment lenght polymorphism)
rpm	Dakikadaki devir (revolution per minute)
RNA	Ribonükleik asit
rDNA	Ribozomal deoksiribonükleik asit
SAMPL	Selektif güçlendirilmiş mikrosatellit polimorfik lokus (Selective amplified microsatellite polymorphic locus)
SCAR	Dizisi karakterize edilmiş çoğaltılmış bölgeler (Sequence characterized amplified region)
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)

SSCP	Tek iplik konformasyon polimorfizmi (Single strand conformational polymorphism)
SSR	Basit dizi tekrarı (Simple sequences repeats)
SRAP	Dizi ilişkili çoğaltılmış polimorfizm (Sequence related amplified polymorphism)
T	Timin
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı (melting temparature)
U	Enzim ünitesi (Enzyme unit)
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
V	Volt
%	Yüzde
%GC	% guanin-sitozin
°C	Derece santigrat
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

1.GİRİŞ

Türkiye, sahip olduğu bitki biyoçeşitliği açısından dünyadaki birçok ülkeden daha farklı ve zengindir. Türkiye'de Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz flora bölgeleri olmak üzere üç fitocoğrafik bölge bulunmaktadır. Aksaray İli, İran-Turan bölgesi sınırları içinde kalmakta olup, özellikle otsu ve endemik bitki türleri açısından zengindir. Özellikle Tuz gölü çevresi de tuz içeriğinin çeşitli olmasından dolayı bitki biyoçeşitliliği açısından önemli bir alan olarak kabul edilmektedir.

Ülkemizde değişik endemik bitkiler üzerinde moleküler genetik analizlerin ve çalışmaların oldukça sınırlı yapıldığı görülmektedir. Bu tez çalışması ile yayılım sınırları içinde Aksaray İlinin de bulunduğu endemik *Isatis floribunda* bitkisi üzerinde ilk kez moleküler genetik bir analiz gerçekleştirilmiştir. Oldukça önemli tıbbi ve biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu değişik birçok çalışmayla ortaya konan bu bitkinin genetik analizinin hızlı ve etkili bir yöntem olan RAPD-PCR ile yapılması literatürdeki önemli bir açığı kapatacak, bu alanda yapılacak olan ilk çalışma niteliğinde olacak ve sonraki çalışmalar için de temel veriler sunacaktır.

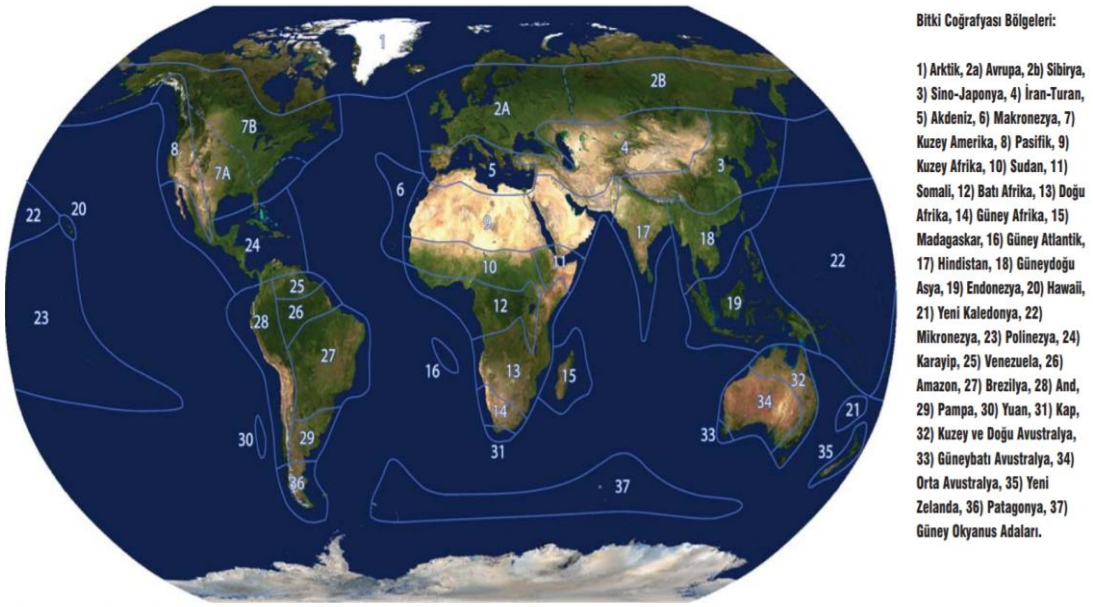
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Bitki Biyoçeşitliliği ve Türkiye

Joseph Pitton de Tournefort tarafından 17. yüzyılda Türkiye'deki bitkilerin sistemli bir şekilde toplanması, incelenmesi ve araştırılması ilk kez yapılmıştır (Burtt, 2001; 2002). Ancak, Peter Hadland Davis'in 1965-1988 yılları arasında oluşturduğu, 9 cilt ve 2 ek ciltten oluşan Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Flora of Turkey and the East Aegean Islands) eserinde Türkiye'nin bitki çeşitliliği ve zenginliği hakkında daha ayrıntılı, kapsamlı ve tanımlayıcı araştırmalar yapılmıştır (Davis, 1965; 1985; Davis vd., 1988; Güner vd., 2000). Günümüzde Türkiye'de 11707 bitki taksonunun bulunduğu ve bunların da yaklaşık 1/3'nin endemik olduğu bilinmektedir (Şenkul ve Kaya, 2017; Güner vd., 2012; 2014). Ülkemizin Asya, Avrupa ve Afrika arasında köprü konumunda bulunması, farklı bitki flora bölgelerinin kesişim alanında bulunması, çok çeşitli yeryüzü şekillerine sahip olması gibi çok değişik nedenler mevcut bitki örtüsünün ortaya çıkmasına zemin hazırlamış ve bitki çeşitliliğini artırmıştır.

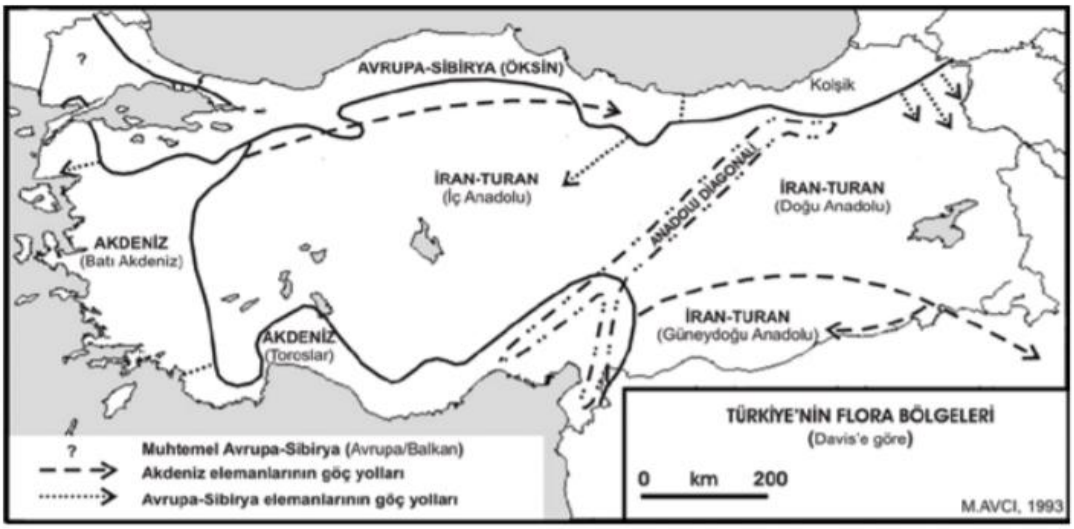
Kuaterner dönemindeki iklim değişimleri Türkiye'deki bitki biyoçeşitliliğinde yüksek seviyede değişimlere neden olmuştur. İklim değişimleri ve farklılıkları sonucunda, Anadolu'nun bazı alanlarında, dağlık yüksek tepelerinde bazı bitki türlerinin dağılımı daralırken, bazı bitki türlerinin ise yayılış alanları bütünüyle yok olmuştur (Öztürk vd., 2002; Aras vd., 2003; Güner vd., 2014).

Dünya üzerinde 37 farklı fitocoğrafik flora bölgesinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2.1) (Eken vd., 2006). Bu bölgelerden İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa-Sibirya fitocoğrafik flora bölgeleri ise ülkemizde bulunmakta (Şekil 2.2) ve Türkiye'yi bitki florası açısından önemli bir konuma getirmektedir (Avcı, 1993; Güner vd., 2014).



Şekil 2.1. Dünya üzerindeki bitki coğrafik bölgelerinin dağılımı (Eken vd., 2006).

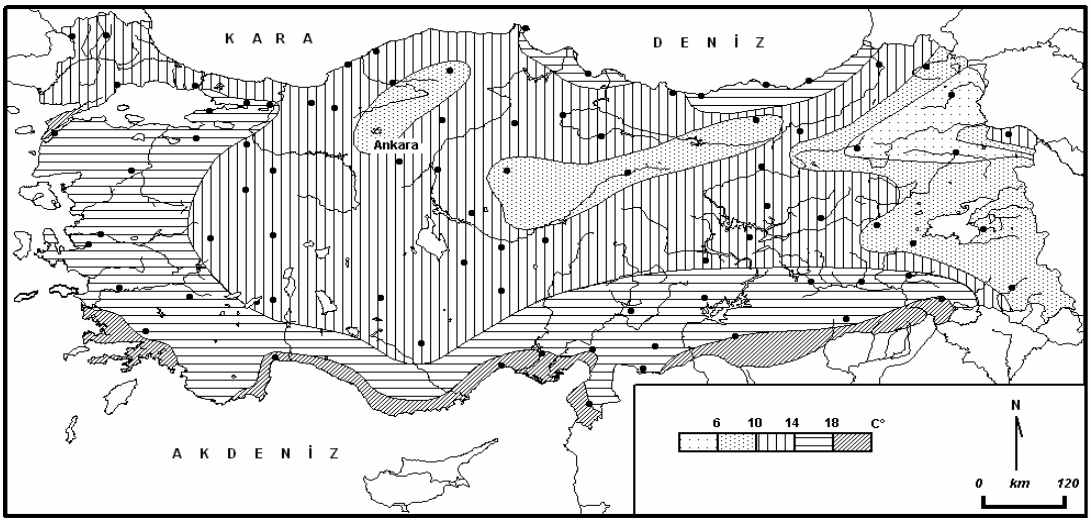
Ülkemizdeki üç fitocoğrafik bölgeden, Avrupa-Sibirya flora bölgesi Öksin ve Hırkaniyen olmak üzere iki ayrı flora bölgesine ayrılır. Türkiye Öksin alanı içersindedir. Öksin, Karadeniz'e yakın olan batıdaki sahaları kapsamaktadır. Hırkaniyen ise İran'ın kuzey kısımlarını ve Taliş dağlarının sınırlarını içine almaktadır. Kafkas dağları Öksin ve Hırkaniyen sahalarını birbirinden ayırır, böyle bir durum ise bu sahalarda yetişen bitki türlerinde önemli farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Avcı, 2004; Güner vd., 2014). Akdeniz flora bölgesi, Anadolu'nun tüm güney kıyılarını, Batı Anadolu kıyılarını ve Trakya'nın güneyinde Gelibolu yarımadasını içine almaktadır. İran-Turan flora bölgesi, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerini içine almasından dolayı, İran ve merkezi Asya'nın yarıkurak bölgelerinin özelliklerini taşımaktadır. İran-Turan flora bölgesi, Avrupa-Sibirya ve Akdeniz flora bölgeleri ile bazı bölgelerde birbirine karışmaktadır (Behçet ve Ünal, 1999; Özgökçe, 1999; Güner vd., 2014).



Şekil 2.2. Türkiye'deki fitocoğrafik bölgeler ve dağılımı (Avcı, 1993).

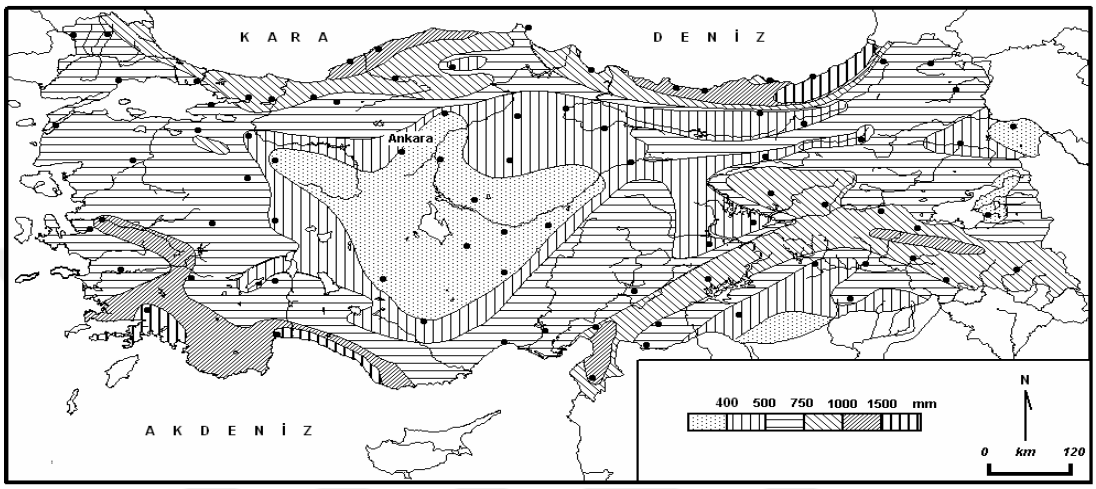
Üç flora bölgesinin özellikleri Türkiye'deki bitki çeşitliliği açısından son derece önem taşımaktadır. Bu flora bölgelerine ait bitki türlerinin bazıları endemik türler olup, bazı türlerin yayılış alanları ise ülkemiz sınırlarını aşmaktadır.

Türkiye'nin iklim özellikleri bitki çeşitliliği için önemli faktörlerden birisidir. Türkiye'de sıcaklığın yıllık ortalama dağılışı bölgelere göre farklılıklar göstermektedir (Şekil 2.3). Sıcaklık değeri ortalama en yüksek 20°C civarında iken, bazı yerlerde 6°C'nin altına inmektedir. Ülkemizin bitki florasının vejetasyon süresi 260 günden fazla olup, bitkilerin yetişme süresinin en uzun olduğu yerler güney kıyı bölgeleridir. İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgelerine doğru yetişme süresi azalmaktadır (Atalay, 1994).



Şekil 2.3. Türkiye'de sıcaklığın dağılışı (Avcı, 2005).

Türkiye’de yıllık ortalama yağışın dağılışı bakımından da bölgeler arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Avcı, 2005). Bazı bölgelerde yıllık yağış miktarının 2500 mm’ye ulaştığı görülmesine rağmen (Rize 2346.3 mm), bazı bölgelerde yıllık yağış miktarı 300 mm’nin altına inebilmektedir (Iğdır 258.8 mm). Türkiye'deki yıllık ortalama yağışın dağılışındaki bu farklılıklarında bitki örtüsü üzerinde önemli etkisi olmaktadır.

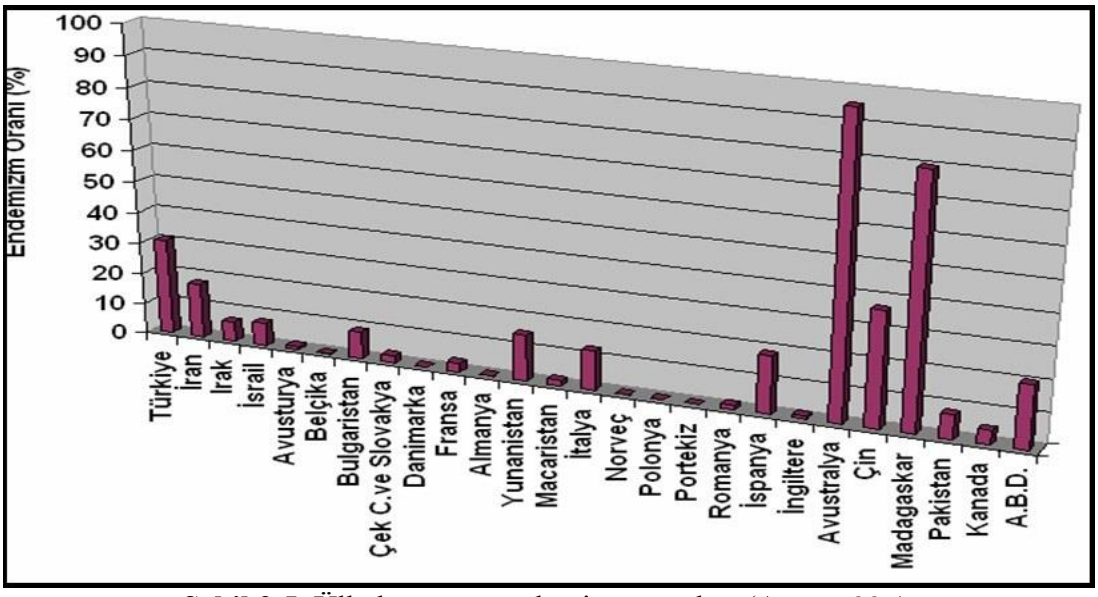


Şekil 2.4. Türkiye’de yağışın dağılışı (Avcı, 2005).

Bitki çeşitliliğindeki farklılıkların en önemli nedenlerinde birisi de toprak özellikleridir. Türkiye’de kahverengi, kireçsiz ve kahverengi orman toprakları en yaygın görülen toprak çeşitleridir (Atalay, 1989; Dizdar, 2003). Topraktaki bazı farklılıklar, üzerinde gelişmekte olan bitki topluluklarının çeşitliliğinde ve yayılış alanlarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

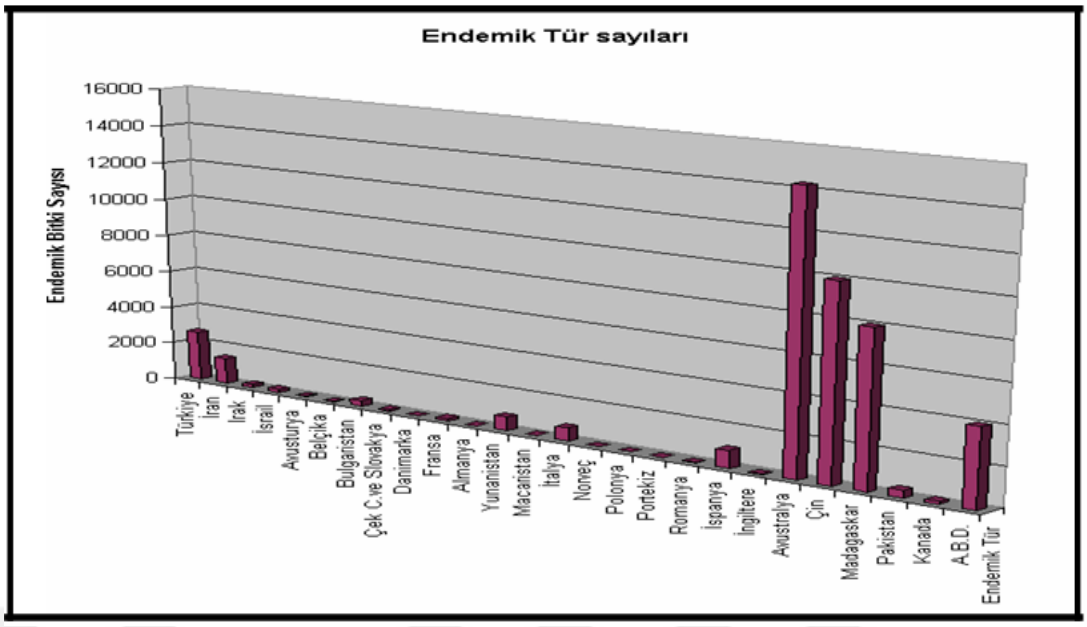
2.1.1 Türkiye’de endemizm

Avrupa kıtasının tamamı ile kıyaslandığında Türkiye’deki zengin bitki biyoçeşitliliği ve yüksek derecedeki endemizm oranı, bütünüyle coğrafi şartların bitki florası üzerine etkisinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ülkelere göre endemizm oranları (Avcı, 2005).

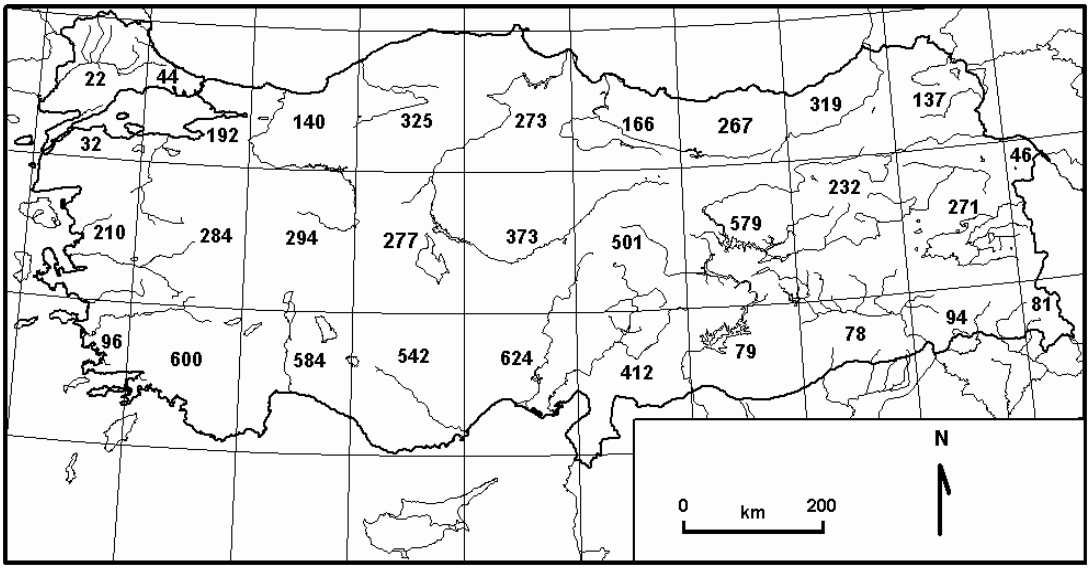
Türkiye endemizm açısından da büyük öneme sahiptir. Yeryüzünde belirli bir alanda varlığını sürdüren ve başka bölgelerde varlığına rastlanmayan bitki ve hayvan türlerine "endemik", bu olaya da "endemizm" denmektedir. Endemik bir türün yayılış alanı dar veya geniş olabilir, fakat önemli olan, söz konusu olan türün yayılışının belirli bir bölgeyi ilgilendirmesidir. Parçalanan yaşam alanları sonucunda türlerin gen yapıları değişerek yeni türler oluşur. Türkiye'de endemik bitki türü sayısı 3000 üzerindedir ve endemizm oranı %34.4 olarak bilinmektedir (Şekil 2.6) (Özhatay vd., 2005; Güner vd., 2014). Endemik bitkiler arasında, cins ve daha alt sistematik kategorilerde endemik bitkilerin varlığı bitki biyoçeşitliliği açısından önemli bir göstergedir (Erik ve Tarıkahya, 2004). Türkiye florasının yaklaşık üçte biri kadarının da endemik bitkilerden oluşması, bu çeşitliliğin korunması ve devam ettirilmesinin önemini daha da artırmaktadır.



Şekil 2.6. Türkiye'deki ve dünyadaki endemik bitki sayısı (Avcı, 2005).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre (WHO), insanların %60'ın genel sağlığının bitkilere dayalı olduğunu tahmin edilmektedir (Walker, 2001). Yaklaşık 500 kadar bitki türü de ülkemizde tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Ertuğ, 2004; Şimşek vd., 2004). Aromatik bitki olarak sınıflandırılan türler özellikle tıbbi bitki olarak ihraç edilmektedir. Koruma amaçlı ayrılan değişik alanlarda bile çok çeşitli tehditler söz konusu olabilmektedir (Arançlı, 2002; Somuncu, 2003). Bitki zenginliği ile özel niteliklere sahip olan Anadolu'ya zamanla bilimsel çalışmalar ışığı altında yeni bitki taksonları eklenmektedir (Avcı, 2005). Türkiye'nin, bu çeşitliliğinin korunması ve devam ettirilmesi de kuşkusuz büyük önem taşımaktadır.

Türkiye'de endemizm bakımından en zengin alanlarından biri de Toros dağlarının batı ve orta kesimleri (özellikle Taşeli platosu), İç Anadolu ile Doğu Anadolu arasındaki geçiş alanlarıdır. İç Anadolu bölgesi İran-Turan flora bölgesini temsil eden geniş bozkır alanlarına sahiptir (Şekik 2.7) (Kutluk ve Aytuğ, 2001). Özellikle Tuz Gölü Havzasındaki tuzcul bozkırlar ayrı bir öneme sahiptir. Bu tuzcul bozkırlarda varlıklarını sürdüren türler anatomik ve fizyolojik açıdan diğer türlerden önemli farklılıklar göstermektedirler. Aksaray İli İran-Turan flora bölgesinde bulunmasından dolayı, endemik tür açısından önemli bitki çeşitliliğine sahiptir (Kutluk ve Aytuğ, 2001).



Şekil 2.7. Türkiye'de endemik bitki sayılarının dağılışı (Kutluk ve Aytuğ, 2001).

2.2. *Isatis* Cinsinin Sistematiği

Isatis (çivitotu) cinsinin sistematiği konusunda dünyada ve Türkiye'de değişik bilimsel çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, sınıflandırılması oldukça problemli olan bir grup olarak görünmektedir.

Isatis, Brassicaceae (Cruciferae) familyasına dahil tek, iki veya çok yıllık otsu bir gruptur. Habitat ya da büyüme alanları olarak bozkırları ya da nadasa bırakılmış arazileri, yol ve tarla kıyıları gibi alanları tercih eder. Ülkemizde 0-3000 m yükseklikte *Isatis* türlerine rastlanabilir. Ülkemiz sınırları içinde *Isatis* cinsine ait 47 takson ve 32 tür bulunmaktadır. Bunların da 22 taksonu endemiktir (Güner vd., 2012).

Boisser (1867), "Flora orientalis" adlı kitabında Türkiye sınırları içinde de bulunan çok sayıda *Isatis* cinsi ve türü hakkında tanımlamalarda bulunmuştur.

Hayek (1911), ilk kez Isatideae tribine ait 8 cinsi tanımlamış ve bunları Arabideae alt tribine dahil etmiştir.

Schulz (1936), Arabideae tribini Lepideieae tribi olarak yeniden revize etmiştir.

Davis (1965), 'Flora of Turkey' adlı eserinde *Isatis* cinsine ait 26 türün Türkiye'deki coğrafik dağılımını (bölge, şehir, yükseklik gibi), türün karakteristik tanımını, türün

meyve şekli ve yapısı, yaprak durumu gibi türü tanımlamaya yarayacak olan karakteristik özelliklerini detaylı şekilde anlatmıştır.

Yıldırımlı (1988), Türkiye'nin batı ve kuzey bölgelerinde yetişen *Isatis* cinslerinin revizyonunu yapmıştır. Çalışmada 16 tür ve 7 alttür teşhis edilmiştir.

Yıldırımlı (2001), *Isatis* cinsinin Türkiye'de 32 tür, 11 alttür, 21 endemik tür ve 3 endemik alttür ile temsil edildiğini söylemiştir.

Gilbert vd. (2002), Almanya, İngiltere ve İsviçreden topladıkları *Isatis indigotica*, *Isatis tinctoria* ve *Isatis glauca* populasyonlarını AFLP (çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi) yöntemi ile analiz ettiler.

Koch (2003), Isatideae tribini morfolojisini temel alarak monofiletik bir grup olarak değerlendirmiştir.

Belistein (2006), Brassicaceae familyasından *Isatis tinctoria* türünün de dahil olduğu 113 bitki türüne ait kloroplast *ndhF* geninden elde edilen DNA (Deoksiribonükleik asit) sekans bilgisini temel alarak filogenetik sınıflandırma yapmaya çalışmıştır.

Al-Shehbaz vd. (2006), *Isatis* cinsinin dahil edildiği Brassicaceae familyasından 338 cinsin ve 3709 türün dünya genelinde dağılıma sahip olduğunu ortaya çıkarmış ve çalışılan sistematik kategorileri 25 tribe yerleştirmiştir.

Spataro vd. (2007), Avrupa ve Orta Asya'dan gelen doğal *Isatis tinctoria* populasyonları arasındaki genetik çeşitliliği ve benzerlikleri değerlendirmek amacıyla AFLP ve SAMPL (Selective amplified microsatellite polymorphic locus) moleküler işaretleyicilerini kullanarak 50 populasyon üzerinde analizler gerçekleştirmişlerdir.

Spataro ve Negri (2008), AFLP ve SAMPL işaretleyici kullanarak *Isatis tinctoria* örneklerin genetik özelliklerini karakterize etmiştir.

Moazzeni vd. (2010), İran coğrafyasına ait 28 Isitadae taksonunun filogenisini rDNA-ITS dizi analizi ile analiz etmiştir.

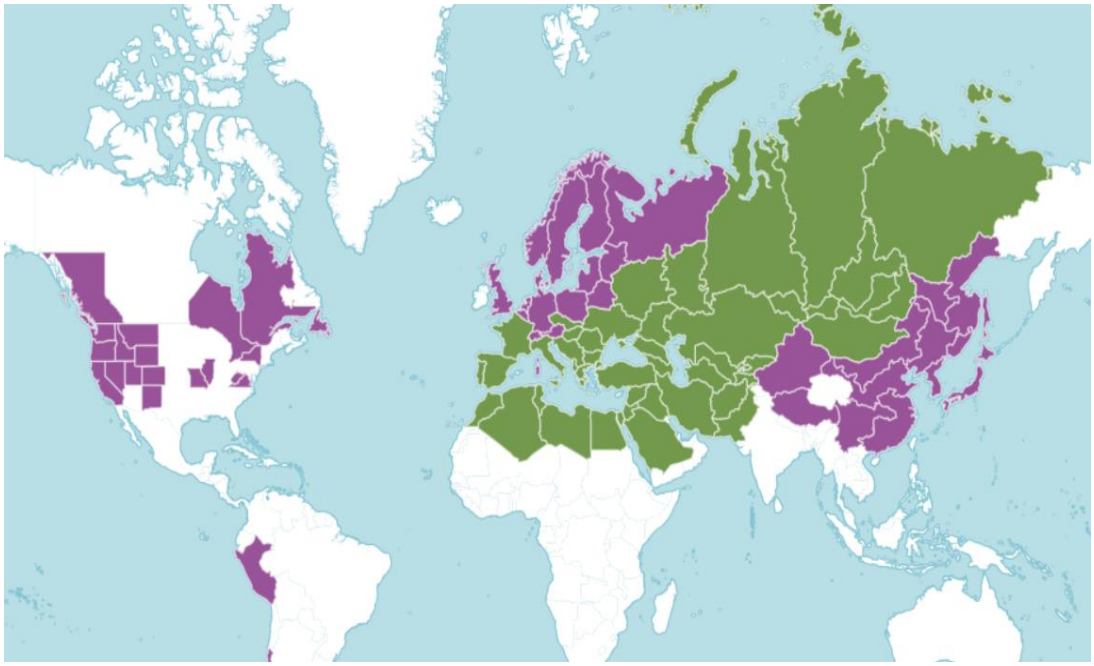
Rocha vd. (2011), ISSR (Basit dizi tekrarları arası) markır sistemini kullanarak *Isatis tinctoria* örneklerin genetik çeşitliliğini analiz etmiştir.

Güner vd. (2012), *Isatis* cinsine ait 47 taksonun (31 tür ve bu türlere ait 16 alttürün) Türkiye'deki mevcut coğrafik dağılımını ayrıntılı bir şekilde vermiştir.

Özbek vd. (2013), Sivas, Konya, Eskişehir, Polatlı/Ankara, Beytepe/Ankara, Ayaş/Ankara, Gölbaşı/Ankara ve İncek/Ankara lokasyonlarından toplanan 9 *Isatis glauca* populasyonu üzerinde AFLP yöntemi kullanılarak genetik karakterizasyon yapmıştır. Bu çalışmada türün orjin bölgesinin Ankara olduğu işaret edilmektedir.

Günümüzde *Isatis* cinsinin dünya genelinde 89 tür ile temsil edildiği bilinmektedir (URL-1).

Cinsin doğal yayılış alanları arasında Türkiye, Türkmenistan, Afganistan, Arnavutluk, Cezayir, Bulgaristan, Orta Rusya, Çekya, Doğu Ege adaları, Rusya'nın doğusu, Mısır, Fransa, Yunanistan, Macaristan, Irak, İtalya, Kazakistan, Kırgızistan, Libya, Suriye, İran, Pakistan, Filistin, Portekiz, Polonya, Sicilya, Rusya'nın güneyi, İspanya, Tacikistan, Tunus, Ukrayna, Özbekistan ve Yugoslovya yer almaktadır (Şekil 2.8).

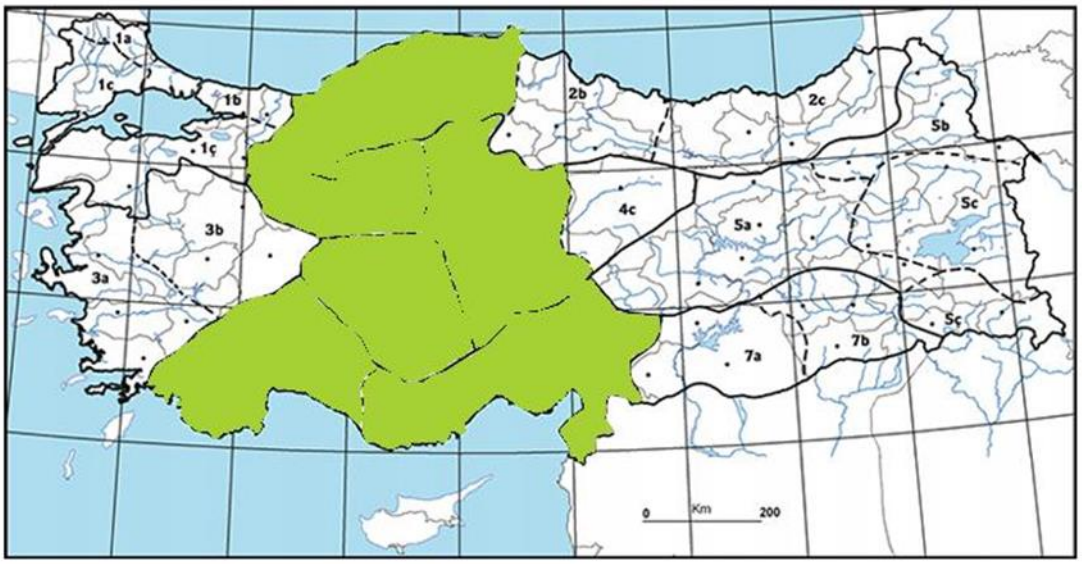


Şekil 2.8. *Isatis* cinsinin dünya üzerindeki dağılım alanları (URL-1). (*Cinsinin doğal yayılış alanı yeşil renk ile, yetiştirildiği ve sonradan doğallaştığı alanlar ise mor renk ile görülmektedir).

Isatis cinsinin değişik türleri ile yapılan değişik bilimsel çalışmalarda elde edilen bitki özütlerinin antidiyabetik, antibakteriyal (Radwan vd., 2008; Karakoca vd., 2013), antikanser, antifungal (Vango, 1995), antiromatizmal (Kirtikau ve Basu, 1984), antiviral ve kanamayı durdurucu etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, menengitis, ensefalit, kabakulak, grip, yılancık ve isilik gibi hastalıkların tedavisinde de kullanıldığı rapor edilmiştir (Bown, 1995). *Isatis* cinsi özellikle boyama sanayinde mavi renk eldesinde çok kullanılan özel bir bitkidir. *Isatis* türleri yapraklarında indoksil formunda indigo (mavi rengin) öncülü olan üç madde ihtiva eder. Bunlar indikan, isatan A ve isatan B şeklindedir (Gilbert ve Cooke, 2001; Oberthurr vd., 2004; Ercivan, 2018).

2.3 *Isatis floribunda* Boiss. ex Bornm. Sistematiği

Sinonimi *Isatis floribunda* var. *rhynohocarpa* Bornm. olarak bilinen tür, halk arasında deliızgın ya da gıvışayak şeklinde isimlendirilmektedir. Tür, İran-Turan fitocoğrafik bölge elementidir. İç Anadolu endemiği olarak tanımlanan tür (Yıldırımlı, 1988), muhtemelen insan etkisiyle diğer bölgelere de dağılmıştır. Ülkemizde Karadeniz Bölgesi, Yukarı Sakarya, Orta Kızılırmak ve Konya Bölümleri ve Akdeniz Bölgesinde doğal yayılım gösteren endemik bir tür olarak bilinmektedir (Şekil 2.9) (Güner vd., 2012; URL-2).



Şekil 2.9. *Isatis floribunda* türünün ülkemizdeki yayılış alanları (URL-2).

2.3.1 Sistematik bilgi

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobeionta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnolioppsida

Altsınıf: Dilleniidae

Takım: Capparales

Familya: Brassicaceae

Cins: *Isatis* L.

Tür: *Isatis floribunda* Boiss. ex Bornm.

2.3.2 Morfoloji

Çiçeklenme dönemi: Bahar sonu (Mayıs), yaz başı (Haziran)

Çiçek süresi: Birkaç ay

Rakım (en düşük): 900 m

Rakım (en yüksek): 1500 m

Bitki bozkırlık alanlarda, tarla kenarlarında, nadasa bırakılmış tarlalarda, yol kıyılarında, nehir ve göl kıyılarında, kıyı kumullarında yetişebilmektedir. IUCN 2017-Ver.13-Kırmızı kategoresinde düşük riskli (LC) (least concern), geniş yayılışlı ve nüfusu yüksek bir tür olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2.10) (IUCN 2017, URL-3).



Şekil 2.10. *Isatis floribunda* (Aksaray İli, Gücünkaya köyü girişi).

2.4 Bitki Genetiği ve Moleküler Markır Teknolojisi

Organizmalar arasında akrabalık ilişkilerinin kurulmasında ve genetik çeşitliliğin aydınlatılmasında çok değişik moleküler markır (belirteç) sistemleri kullanılarak DNA temelli araştırmalar yapılabilmektedir. Bitki ve hayvanların genetik profilinin aydınlatılmasında, türlerin taksonomik, evrimsel, ekolojik araştırmalarında oldukça çeşitli moleküler markır tekniklerinden yararlanılmaktadır. Her bir moleküler markır tekniği farklı prensiplere dayanmaktadır ve uygulanması ile genom çapındaki değişkenler ortaya çıkarabilmektedir. Hedefe yönelik olarak sayısız markır teknolojisinin arasından en uygun DNA markırının seçimi oldukça önemlidir. Genel olarak, moleküler markır tekniğinin seçiminde, güvenilirlik, analiz kolaylığı, istatistiksel güç, polimorfizmleri belirlemedeki hassasiyet dikkat edilmesi gereken ana unsurlardır. Moleküler genetik yöntemler, organizmaların DNA düzeyindeki genetik benzerliklerinin ve farklılıklarının ortaya çıkartılması ve bunlardan yararlanılmasına olanak sağlamaktadır. Moleküler genetik çalışmalarda belirli bir türün sistematik açıdan benzerlikleri, farklılıkları ve taksonomik açıdan araştırılması için o türe ait markırın ya da gen bölgesinin seçimi en önemli adımı oluşturmaktadır (Dabert, 2006).

Markırlar organizmanın türüne ve markır tipine göre değişkenlik göstermektedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Bir organizmanın morfolojisi, biyokimyası ve DNA'sındaki genetik özellikleri hakkında dolaylı bilgi verebilen karakterlere 'genetik markırlar' denir. Genetik markırlar:

* Fenotipik markırlar
* Biyokimyasal markırlar
* Moleküler markırlar olarak üç'e ayrılmaktadırlar (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

2.4.1 Fenotipik (morfolojik) markır

Morfolojik markırlar (kök, yaprak ve gövde yapıları, çiçeklenme durumu, tohum ve meyve yapısı gibi), bir bitki populasyondaki türü diğer bitki türlerinden belirgin şekilde ayırt edebilen özellikler olarak bilinir. Morfolojik ya da fenotipik markırlar, uzak akraba türlerinin genotipik analizlerinde kolaylık sağlasa da yakın akraba türler az sayıda polimorfizm gösterdiklerinden dolayı genetik tanı amaçlı yapılan çalışmalarda çok fazla tercih edilmemektedir. Morfolojik markırlar sınırlı sayıda olmalarına rağmen, tarımda ıslah çalışmalarında bazen kullanılmaktadırlar (Gülsen ve Mutlu, 2005).

2.4.2 Biyokimyasal markır

Biyokimyasal markır bitki populasyonlarının moleküler analizlerinde ve sistematik çalışmalarında bilim insanları tarafından çok uzun zamandır kullanılmaktadır. Fenotipik markırların sayılarının sınırlı ve az olması sonucu biyokimyasal markır teknikleri ortaya çıkmıştır. Biyokimyasal markır, depo proteinleri ve enzim proteinleri (izozim ya da izoenzim) olmak üzere kendi içerisinde iki alt başlıkta sınıflandırılabilir:

***** Depo proteinleri jel üzerinde yürütülüp boyandıktan sonra üzerinde çalışılan genotipler arasındaki farklılıkları ortaya çıkarabilir. Protein markırları moleküler analizlerde tekrarlanabilir ve güvenilirlikleri açısından avantajlı olmalarına rağmen, sayılarının az olması dezavantajlarıdır (Yıldırım ve Kandemir, 2001). DNA

yapısındaki baz değişimleri, kromozomlardaki inversiyon ve insersiyon olayları sonucunda oluşan tohum depo proteinlerindeki polimorfizm türler arası ve tür içi genetik farklılıkların analizinde, bitkilerin geliştirilmesinde ve ıslah çalışmalarında genetik markır olarak kullanılmaktadır (Ghafoor vd., 2000). Tohum depo proteinlerinin mevsim değişimlerinden bağımsız olarak hızlı ve tekrar tekrar analiz edilebilmesi, çalışılacak örnek sayısının az olması ve kolay saklanabilir olması nedeni ile fenotipik markırlara göre daha fazla avantaj sağlamaktadır (Dinelli, 1999).

****** İzoenzimler, organizmada farklı genler tarafından ifade edilmesine rağmen, birbirine benzeyen enzimleri üretmektedir ve protein markır sisteminde fazlaca kullanılmaktadır. İzoenzimlerin çalışma mekanizmalarının iyi bilinmesi, yöntemin ucuz ve hızlı olması izoenzim markır sistemine avantaj sağlamaktadır. Dezavantajı ise, izoenzimlerin bazı dokulardaki gelişme dönemlerinde ifade edilememesi, translokasyon sonrası değişimlere uğraması izoenzim markırların kullanımını sınırlamaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

2.4.3 Moleküler markır

Genom üzerinde belli bir bölgeyi tanımlamak için kullanılan genetik işaretlerdir. Bu belirteçler DNA'nın geniş bir bölgesini veya tek bir spesifik nükleotidi içine alabilmektedir. Moleküler markırlar, çalışılması istenilen bitkilerin genotipik benzerlikleri ve farklılıklarının tanımlanmasında %100'lük güvenilir sonuçlar vermektedir (Karp vd., 1998; Gülşen ve Mutlu, 2005).

Moleküler markır, bir özelliğin fenotipik ifadesiyle ilişkili olabilir ya da olmayabilir. Moleküler markırlar, hücrenin büyümesi, farklılaşması, gelişimi veya savunma durumu ne olursa olsun çevre, pleiotropik ve epistatik etkilerden bağımsız olarak, bütün dokularda stabil ve saptanabilir olduklarından, geleneksel fenotip bazlı alternatiflere göre sayısız avantajlar sunmaktadır.

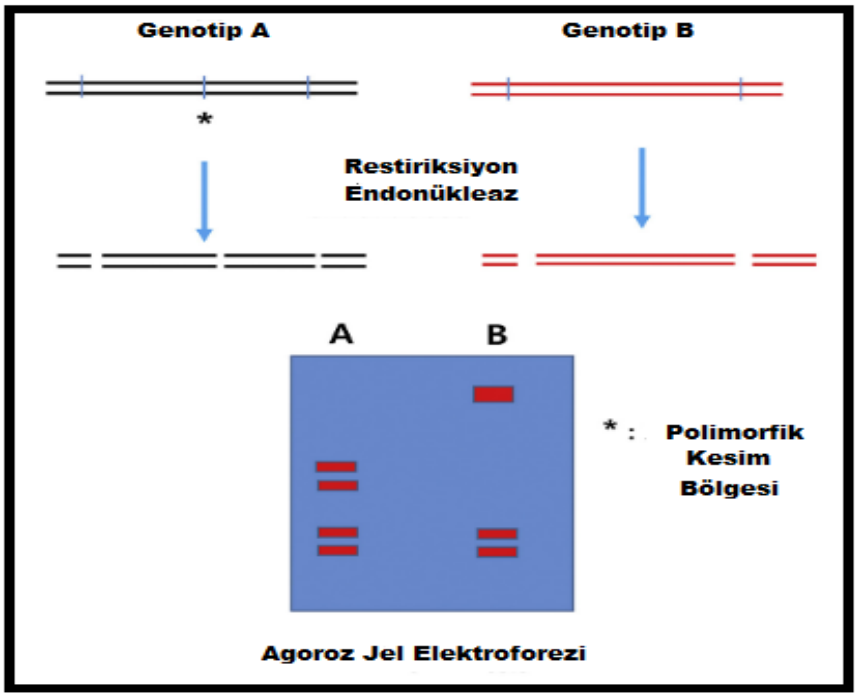
İdeal bir moleküler markır, polimorfik özellikte ve genom boyunca dağılmış olmalı, genetik farklılıkların yeterli bir şekilde belirlemeli, basit-hızlı-ucuz olmalı, az miktarda DNA örneği ile çalışabilmelidir.

Genomik büyüklük; tespit edilen polimorfizm düzeyi, lokus özgüllüğü, tekrarlanabilirlik, teknik gereksinimler ve maliyet gibi önemli özellikler her bir moleküler markır tekniğini birbirinden farklı kılmakta, avantajlar ve dezavantajlar sağlamaktadır. Günümüze kadar çok değişik moleküler markır tekniği geliştirilmiş ve bitki genetik analizlerinde kullanılmıştır.

2.4.3.1 Hibridizasyon temelli moleküler markır

* Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism, RFLP).

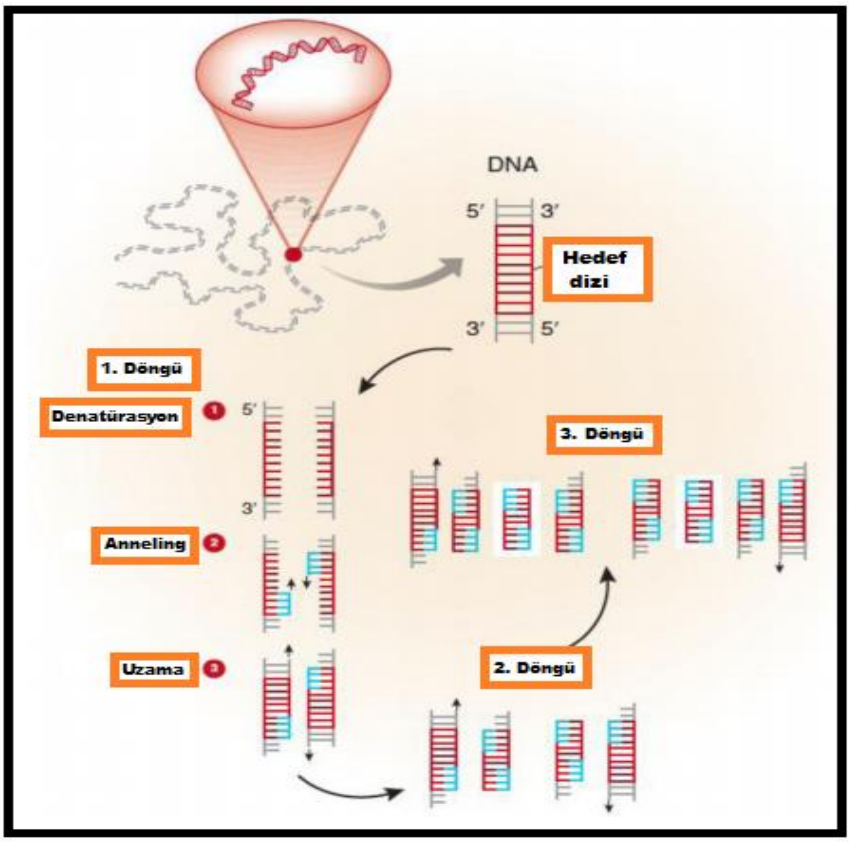
Botstein vd. (1980), DNA polimorfizminin tespit edilmesinde hibridizasyon temelli bir moleküler markır teknolojisi olan RFLP'yi kullanmışlardır. RFLP teknolojisinde, farklı boyutlarda DNA fragmenti oluşturacak şekilde restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilen DNA örneği, kimyasal olarak işaretlenmiş bir DNA probuyla, Southern blot yöntemi kullanılarak hibridize edilir. Böylelikle farklı büyüklüklerde DNA fragment profili ortaya çıkar (Şekil 2.11) (Jo vd., 2017). Bu farklı fragment profili, insersiyon, delesyon ve tek nükleotid polimorfizmleri gibi DNA dizisindeki yeniden düzenlenmeler ve farklılıklar nedeniyle oluşur. RFLP markırları oldukça polimorfik özelliktedir, kodominant kalıtılır ve tekrarlanabilir niteliktedir. Bitki genomu boyunca varlıkları, yüksek kalıtım derecesi ve lokus özgüllüğü nedeniyle RFLP markırlarının üstün olduğu kabul edilir. Bu yöntem aynı zamanda birçok örneği aynı anda taramak için olanak sağlar. Zaman alıcı olması, pahalı ve radyoaktif /toksik reaktiflerin kullanılması, fazla miktarda yüksek kaliteli genomik DNA gerektirmesi tekniğin kullanımını sınırlandırmaktadır. Ayrıca prob üretimi için önceden sekans bilgisi gerekliliği metodolojinin karmaşıklığını arttırır.



Şekil 2.11. RFLP teknolojisinin şematik gösterimi (Jo vd., 2017).

2.4.3.2 PCR temelli moleküler markır

Polimeraz zincir reaksiyonu ya da PCR, genomda belirlenen ya da hedeflenen bir ya da birden fazla DNA bölgesinin, *in vitro* koşullar altında Taq DNA polimeraz enzimi ve oligonükleotid primer çiftleri kullanılarak çoğaltılma işlemidir. Yöntemle hızlı, basit, ucuz, çok fazla sayıda örneğin çalışılabilir olması tekniğe büyük avantaj sağlamaktadır (Bricker, 2002). Teknik, amplifiye edilecek DNA örneğinin denatürasyonu, primerlerin bağlanması (annealing) ve DNA sentezi (extention) olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.12) (Garibyan ve Avashia, 2013). Teknoloji, moleküler taksonomik çalışmalarda tür içi/türler arası DNA polimorfizminin saptanmasında, tohum saflığının analizinde, evrim çalışmalarında, genetik haritalama çalışmalarında, adli tıpta, mutasyon analizinde, rekombinant DNA teknolojisinde ve birçok önemli alanda çok yaygın şekilde kullanılmaktadır.

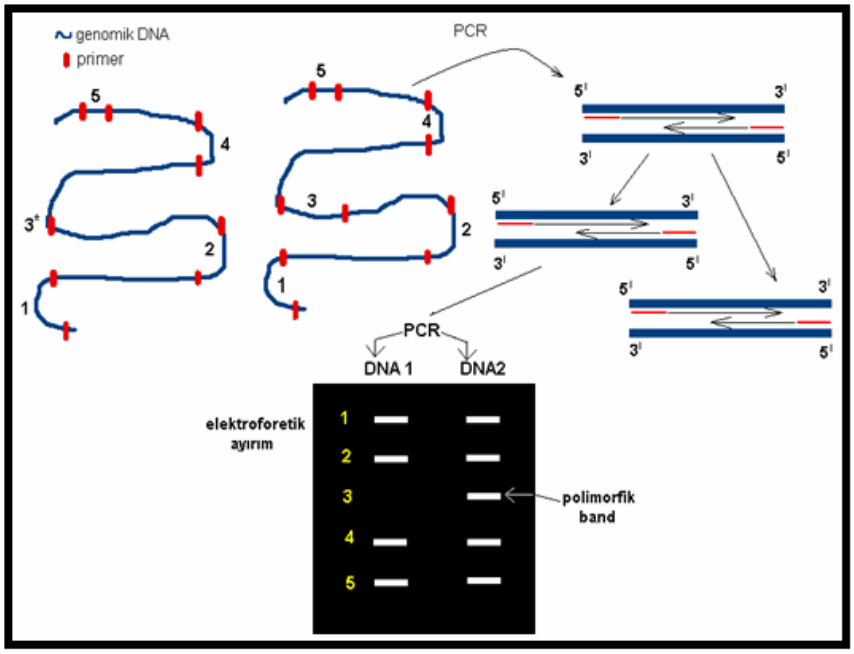


Şekil 2.12. PCR döngüsünün basamakları (Garibyan ve Avashia, 2013).

* Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-PCR (Randomly amplified polymorphic DNA-PCR, RAPD-PCR).

RAPD tekniği, genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş 10 baz uzunluğunda tek bir oligonükleotid primerinin kullanılmasına dayanmaktadır (Şekil 2.13) (Williams vd., 1990; Karcicio, 2006). Bu teknikte kullanılacak olan primerlerin GC/AT oranlarının %50 veya daha fazla olmasına dikkat edilmektedir (Gregor vd., 1994). Bu yöntemde kullanılan tek primer DNA molekülünü her iki yönde de sentezleyebilmektedir (Kumar, 1999). Aynı teknik aşamaları kullanan, ancak farklı primer uzunlukları ve farklı amplifikasyon şartlarına gereksinimi bulunan DAF (DNA amplification fingerprinting) ve AP-PCR (arbitrary primer-PCR) olmak üzere iki farklı metod daha vardır (Welsh ve McClelland, 1990). DAF tekniğinde genelde 8 bazlık primerler kullanılmaktadır. Amplifikasyon ürünleri, üre içeren poliakrilamid jelde yürütülür, ardından polimorfik ve monomorfik bantların sayısını iki veya üçe katlayan gümüş boyama ile belirlenir. AP-PCR tekniğinde ise genelde 18-24 bazlık primerler kullanılmaktadır ve amplifikasyon ürünleri agaroz jelde belirlenir (Caetano-Anolles

ve Gresshoff, 1994; Bassam ve Bentley, 1995). RAPD tekniği; çalışılacak DNA dizisinin önceden bilinmesine ihtiyaç duymaması, kısa sürede hızlı sonuç verebilmesi, teknik kolaylık, maliyetinin düşük olması, fazla kaliteli olmayan DNA örneğinin az miktarı ile de çalışılabilir olması ve bazı tekniklere kıyasla polimorfizm oranının oldukça yüksek olması gibi avantajlara sahiptir (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Karaca vd., 2002; Temizkan ve Arda, 2004). Dominant özellikte kalıtılması, tekrarlanabilirliğinin düşük olması (Dos Santos vd., 1994; Harris, 1999), karışık DNA örnekleri arasından istenilen örneğin net bir şekilde PCR'ının yapılamaması (Majer vd., 1996; Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008) gibi bazı dezavantajları da vardır. RAPD-PCR verilerinin tekrarlanabilirligi için amplifikasyon reaksiyonlarının her bir basamağının dikkatli bir şekilde optimize edilmesi gerekir (Michelia ve Bova, 1997). Günümüz koşullarında daha hassas PCR cihazlarının üretilmesi, daha saf kimyasalların kullanılması ve oldukça dayanıklı DNA polimeraz enzimlerinin kullanıma sunulmasıyla yukarıda bahsedilen teknik sıkıntıların büyük bir bölümü aşılmıştır.



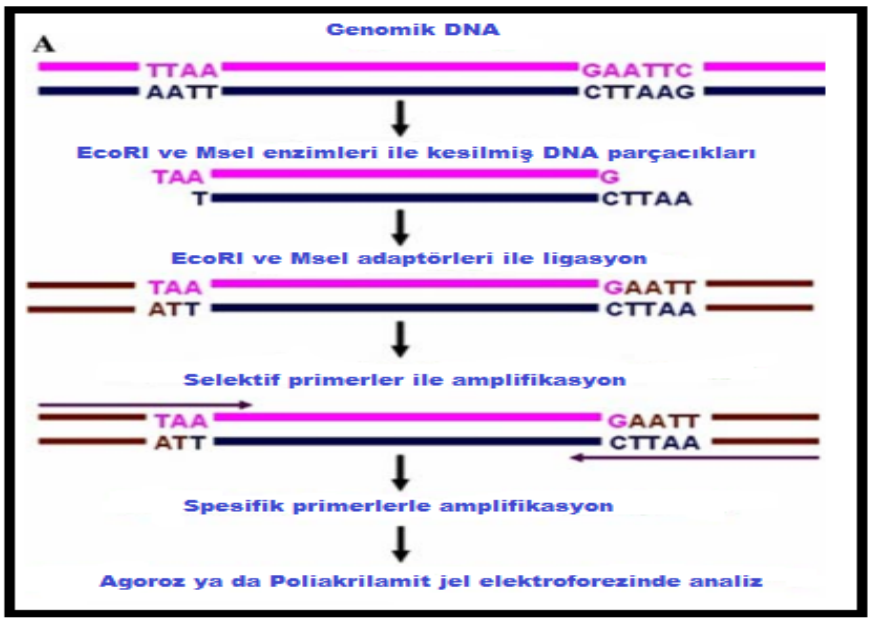
Şekil 2.13. RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi (Karcicio, 2006).

* * Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (amplified fragment length polymorphism, AFLP).

Günümüzde RAPD, RFLP ve AFLP teknikleri genellikle 'DNA fingerprinting' olarak bilinen 'DNA parmak izi analizleri' adı altında toplanırlar. Bu parmak izi teknikleri

DNA'ya bakarak örneğin kimlik tanımlamasında veya örnekleri birbirleriyle kıyaslayabilme imkanı sunarak akrabalık derecelerini tespit etme işleminde kullanılırlar. AFLP (Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi) tekniği, RAPD ve RFLP tekniklerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiş alternatif bir yöntemdir ve bu iki teknikten türetilmiştir (Vos vd., 1995). Bu teknik işgücü, maliyet ve güvenilirliği bakımından RAPD ve RFLP arasında yer alırken çok sayıda genomik bölgeyi aynı anda tarayabilmesi açısından daha etkili bir yöntemdir. Zaman açısından RAPD'den daha uzun RFLP'den ise daha kısa süre de uygulanabilen bir tekniktir. Moleküler markır olarak AFLP genetik karakterizasyonun tanımlanmasında, türler arasında ve tür içinde benzerlik-farklılıkların belirlenmesinde, ebeveynlerin tespit edilmesinde, bilinmeyen çeşitliliğin ve genotiplerin tanımlanmasında, evrimsel farklılıklar ile gelişmelerin aydınlatılmasında, kromozomlarda meydana gelen yapısal değişimlerin saptanmasında, genetik lokusların kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılmaktadır.

Bu teknikte, genomik DNA biri altı nükleotidi diğeri 4 nükleotidi tanıyacak şekilde iki farklı restriksiyon enzimi ile kesilmektedir. Enzimle kesilen DNA parçacıklarının uç bölgelerindeki nükleotid dizilimi ile eşleşebilecek sentetik adaptörler bağlanmaktadır. Adaptörlerin nükleotid dizilimi ile eşleşebilecek primerler kullanılmaktadır ve primer sayesinde seçicilik sağlanmaktadır. PCR ile amplifikasyon işlemi ön amplifikasyon ve seçici amplifikasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilir. Ön amplifikasyon da DNA parçalarına bağlanan adaptörden bir bazlık uzunluğa sahip primer bağlanır ve birer baz ilave edilmek suretiyle ön PCR yapılmaktadır. Seçici amplifikasyonda ise elde edilen PCR ürününe 2-3 baz ilave edilecek sekilde uç kısımları radyoaktif ya da floresan işaretli primer kullanılarak seçici PCR reaksiyonu gerçekleştirilir (Şekil 2.14) (Vost vd., 1995; Semblat vd., 1998; Tzortzakakis vd., 1999; Agarwal vd., 2008). Aynı anda 30 ile 150 arasında gen bölgesi analiz etme imkanı sunmaktadır. DNA polimorfizmlerinin belirlenmesinde ve genomik haritalama da kullanılmış etkin yöntemlerden bir tanesidir.



Şekil 2.14. AFLP tekniğinin şematik gösterimi (Agarwal vd., 2008).

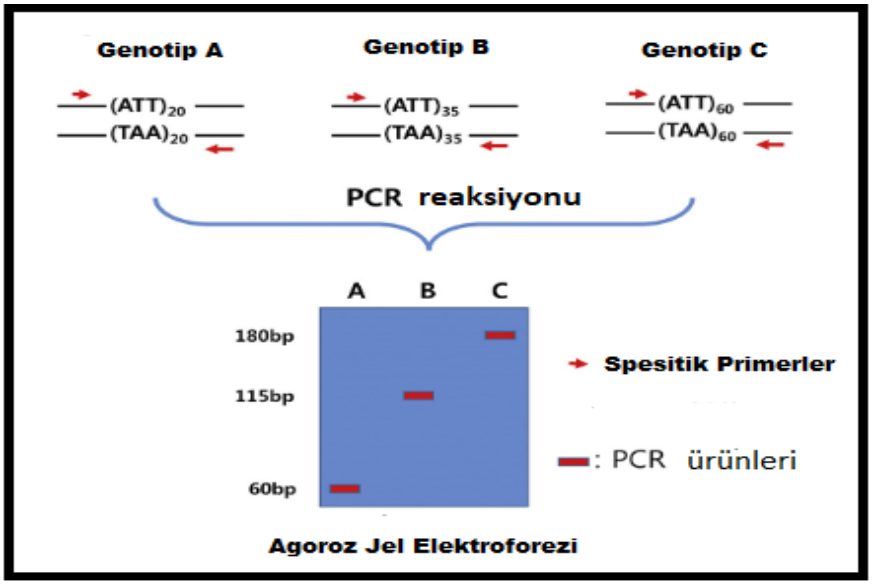
2.4.3.3 Sekansa özgü PCR temelli markırlar

Yüksek verimli dizileme teknolojilerinin geliştirilmesini takiben, DNA dizileri hakkında bol miktarda bilgi sahibi olma imkanı ortaya çıkmıştır ve birçok bitki türünün genomu bu şekilde aydınlatılmıştır (Goff vd., 2002; Yu vd., 2002). Bu sayede birçok fonksiyonel genin belirlenmesine, DNA dizi bilgisi ile genotip-fenotip ilişkisi kurulabilmesine ve diziye özgü moleküler markır tekniklerin dizayn edilebilmesine olanak sağlanmıştır.

* Basit dizi tekrarı (Simple sequence repeat, SSR).

Kısa ardışık tekrarlar veya basit dizi tekrarları olarak da bilinen mikrosatellitler, tüm ökaryotik genomlarda dağınık şekilde bulunan ardışık 2-5 nükleotit uzunluğunda dizi tekrarları olarak tanımlanırlar (Tautz ve Renz, 1984). Bu tekrar sayıları ve konumları türler arasında ya da tür içinde değişkenlik göstermektedir. Ardışık tekrarların sayısındaki değişimler DNA replikasyonu sırasında tekrarların eksizyonu veya tekrarların eklenmesi şeklinde oluşabilmektedir (Schlotterer ve Tautz, 1992). Aynı zamanda ardışık tekrarların yüksek oranda farklılığına çerçeve kayması mutasyonları ve nokta mutasyonları da neden olabilmektedir. Tekrar sayısının bireyden bireye farklılık göstermesinden faydalanarak mikrosatellit analizlerinde tekrarların etrafındaki DNA dizisine uygun primerler tasarlanır ve PCR reaksiyonu

gerçekleştirilir (Şekil 2.15) (Jo vd., 2017). Agaroz jel görüntüsünde amplifikon büyüklüğüne bakarak tekrar sayısındaki farklılık rahatlıkla görülebilmektedir. Bu şekilde birey tanımlamada ve biyoçeşitlilik araştırmalarında, akrabalık ilişkisi kurulmasında kullanılabilen moleküler markır sistemlerinden bir tanesidir. Dezavantajı dizi bilgisi gerektirmesidir. Teknolojiyi takiben moleküler yöntemlerin gelişimi ile mikrosatellit analizlerinde floresan işaretlenmiş primerler rahatlıkla uygulanabilmektedir (Wenz vd., 1998; Schuelke, 2000).



Şekil 2.15. Mikrosatellit tekrar sayısını belirlemede PCR reaksiyonu (Jo vd., 2017).

* * Tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism, SNP).

Bir populasyonu oluşturan bireylerin genom dizisinde tek nükleotit farklılıkları ya da SNP olarak adlandırılan varyasyonlar mevcuttur. SNP'ler türler arasında ve tür içinde bireyler arasında farklılık gösteren genom boyunca en bol bulunan moleküler markırlardır. Mısırda her 60-120 bazda 1 görülebilmekte (Ching vd., 2002), insanda ise ortalama 1000 bazda bir rastlanmaktadır (Sachidanandam vd., 2001). Tek nükleotit polimorfizmler kodlanmayan DNA bölgelerinde oldukça yaygın bulunmakta ve bunların evrimsel süreç açısından önemli oldukları bilinmektedir. Kodlanan bölgelerde ise nükleotit dizilimi farklı ancak aynı amino asidi kodlayan birçok SNP'de rastlanabilir. Bu genetik varyasyonlar aynı zamanda amino asit değişimine neden olabilirler ve fenotipik farklılıklara sebebiyet verebilmektedirler (Sunyaev vd., 1999). Diğer yandan intronik bölgelerde yer alıp RNA splicing mekanizmasına etki ederek benzer şekilde fenotipik farklılıklara neden olabilmektedirler (Richard ve Beckman,

1995). SNP farklılıklarını belirlemede allele spesifik hibridizasyon tekniği (ASO), DNA dizilenme analizleri ve genom boyunca 1000'lerce SNP'i aynı anda analiz edebilme imkanı sunan Mikroarray sistemleri günümüzde rahatlıkla kullanılabilmektedir (Sobrino vd., 2005). Moleküler markır olarak SNP'ler yoğun genetik haritaların oluşturulması imkanı sunarak türler arasında ve tür içinde benzerliklerin/farklılıkların aydınlatılmasında önemlidirler. Aynı zamanda populasyon içi ve populasyonlar arasındaki benzerlikleri/farklılıkları tespit edebilme açısından da değerlidir. Ancak dezavantajı uygulanan teknik yöntemlerin maliyetli olmasıdır.

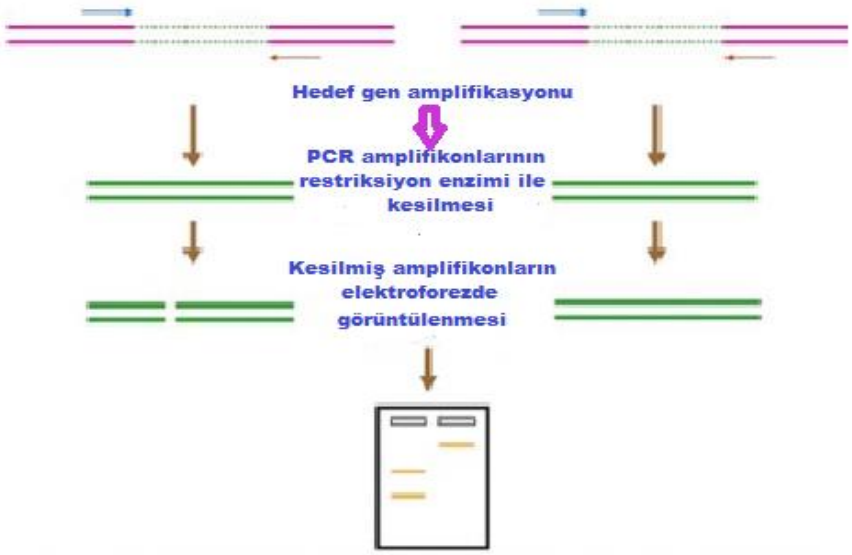
* * * Dizisi karakterize edilmiş çoğaltılmış bölgeler (Sequence characterized amplified regions, SCAR).

RAPD, AFLP gibi rastgele oluşturulan moleküler markırlardan ziyade harita temelli genomdaki belli bir bölgeye ait bilgi edinilmesi gerekliliğinde SCAR tekniği geliştirilmiş ve uygulanmıştır. SCAR tekniği belli bir lokusun dizisine bakarak diziye özgü 15-30 bç primerler dizayn ederek PCR reaksiyonu ile amplifikon oluşturma temeline dayanır (Paran ve Michelmore, 1993; McDermott vd., 1994). Bu yöntemde amplifikon oluşup oluşmamasına bakarak genomdaki o bölgenin polimorfik olup olmadığı tespit etme imkanı sunar. SCAR'lar harita temelli klonlama olarak bilinen markır sistemlerindendir ve genomik kütüphanelerin oluşturulmasında kullanılmıştır (Chelkowski ve Stephen, 2001). Lokus spesifik olarak kullanılan SCAR'lar bitki türlerinde genetik haritaların kıyaslamasında ve homoloji çalışmalarında kullanılan moleküler markırlardandır (Paran ve Michelmore, 1993; Guo vd., 2003).

* * * * Çoğaltılmış kesilmiş polimorfik dizi (Cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS).

CAPS tekniği, harita temelli ve DNA blotlamadaki başarısızlığı ortadan kaldırmak amacıyla RFLP tekniğinden türetilmiştir (Komori ve Nitta, 2005). CAPS, genomda belli bir bölgedeki farklılığı tespit etmek için kullanılan bir markır tekniğidir ve PCR-RFLP olarak da bilinmektedir (Konieczny ve Ausubel, 1993). Genomda hedeflenen gen bölgesine uygun primer dizayn edilir ve PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir. Daha sonra RFLP'deki gibi restriksiyon enzimleri kullanılarak amplifikonda kesim

yapılarak elektroforezde görüntüleme işlemi gerçekleştirilir (Konieczny ve Ausubel, 1993; Chelkowski ve Stephen, 2001). Kesilmiş amplifikonların büyüklüğüne ve parça amplifikonların oluşup-oluşmamasına bakılmaktadır (Şekil 2.16) (Agarwal vd., 2008). CAPS moleküler markır sistemi DNA'nın polimorfik olup olmadığını ortaya çıkarmada, SNP, insersiyon, delesyon varlığını tespit etmede ve allellerin homozigot ya da heterozigot olduğunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (Konieczny ve Ausubel, 1993). Bu moleküler markır sisteminin dezavantajı hedeflenen bölgenin restriksiyon enziminin kesimine uygun bir bölge olmasını gerektirmesi ve hedeflenen polimorfizmin restriksiyon enziminin kesim yapacağı dizi ile uyum sağlamasını gerektirmesidir (Neff vd., 1998). Ayrıca bitkilerde farklı populasyonlarda bilinen bir mutasyonun segregasyonun da ve yeni genlerin pozisyonel klonlanmasında kullanılabilmektedir (Haliassos vd., 1989).

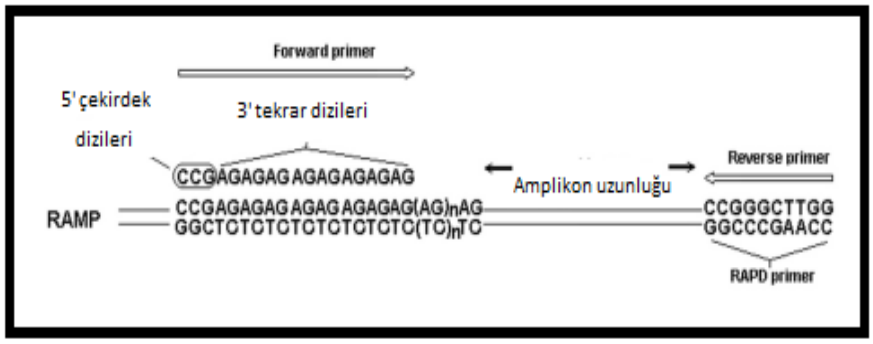


Şekil 2.16. CAPS tekniğinin uygulanışı (Agarwal vd., 2008).

* * * * * Rastgele çoğaltılmış mikrosatellit polimorfizmi (randomly amplified microsatellite polymorphisms, RAMP).

Mikrosatellit temelli markırlar yüksek oranlarda polimorfizmi ortaya çıkarmakla birlikte yoğun bir iş yükünü de beraberinde getirmektedir. RAPD teknolojisi ucuz bir yöntem olmasına rağmen polimorfizm oranı düşük olabilmektedir. Zamanla her iki tekniğin dezavantajına bakarak ikisinin kombinasyonu ile RAMP markır sistemi geliştirilmiştir (Wu vd., 1994). Bu teknikte 5' ucu radyoaktif işaretli 2-3 nükleotit rastgele seçilerek bir çekirdek kısım ve 3' ucu ise tekrar dizilerinden oluşan bir

mikrosatellit primeri ile farklı RAPD primerleri birlikte PCR reaksiyonu yapılarak bant profilleri yorumlanmaktadır (Şekil 2.17) (Min vd., 2008). İki tip primerin PCR Tm'leri farklı olduğu için düşük Tm'de annealing ve yüksek Tm'de annealing olacak şekilde PCR koşulları oluşturulması gerekmektedir. RAMP primeri mikrosatellit dizisine göre tasarlandığı için mikrosatellitin bulunduğu bölgeyi hedeflemektedir ve RADP primerleri ise farklı boyutlarda amplifikonların oluşmasını sağlamaktadır Bu PCR amplifikonları denatüre poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmekte ve oluşan RAMP bantları birbirleri ile kıyaslanmaktadır. Arpa ve şeftali gibi birçok bitkide genetik çeşitlilik araştırmalarında bu markır sistemi kullanılmıştır (Wu vd., 1994; Sanchez de la Hoz vd., 1996; Cheng vd., 2001).

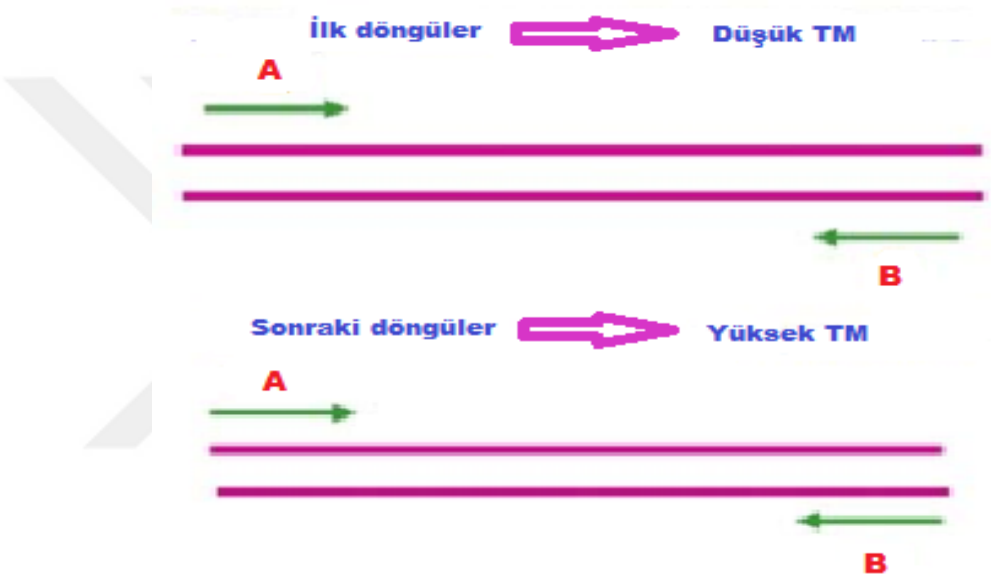


Şekil 2.17. RAMP tekniği (Min vd., 2008).

* * * * * * Dizi ilişkili çoğaltılmış polimorfizm (Sequence related amplified polymorphism, SRAP).

SRAP yöntemi, açık okuma çerçevesinin (ORF) amplifikasyonunu amaçlayan moleküler bir teknolojidir (Li ve Quiros, 2001). Belirli bir gen bölgesindeki dizi hedeflenerek iki farklı şekilde dizayn edilen primerlerle amplifikasyon oluşturma esasına dayanır. 14 bç'lik çekirdek diziler olmak üzere 17 bç uzunluğunda forward primer ve 18 bç uzunluğunda revers primer amplifikasyon amaçlı kullanılmaktadır. AT ve GC'ce zengin primerler dizayn edilir ve Tm'leri farklı PCR döngüleri oluşturmak amaçlanır. Primerlerin 5' ucunda 10-11 bç'lik birbirlerinden farklı rastgele doldurma dizi (filler sequence) oluşturulur ve 3' ucunda forward primere CCGG, revers primere AATT dizileri eklenerek tasarlanmaktadır. CCGG bakımından zengin olan forward primer genellikle ekzonları, AATT açısından zengin olan revers primer ise genellikle intronik ve promotor bölgelerin amplifikasyonu hedeflenmektedir. PCR reaksiyonunun ilk 5 döngüsünde annealing sıcaklığı 35°C ve sonraki 35 döngüsünde

annealing (bağlanma) sıcaklığı 50°C olarak belirlenmektedir (Şekil 2.18) (Agarwal vd., 2008). Oluşan amplifikonlar elektroforezde görüntülenmektedir. SRAP markırları ile genomun kodlanan dizilerini tespit etmeyi amaçlar, amplifikonların bant büyüklüğüne ve oranına bakarak dizi bilgisi elde edinilmeye çalışılır. Ayrıca bu fragment farklılıklarına göre insersiyon/delesyonlar belirlenerek kodominant markırları tespit edilmekte ve nükleoit değişimleri belirlenerek de dominant markırlar saptanmaktadır (Li ve Quiros, 2001). SRAP markırları bitkilerde genetik harita belirlemede, gen hedeflemede ve genetik çeşitlik araştırmalarında kullanılmıştır (Gulsen vd., 2006).



Şekil 2.18. SRAP markır tekniği (Agarwal vd., 2008).

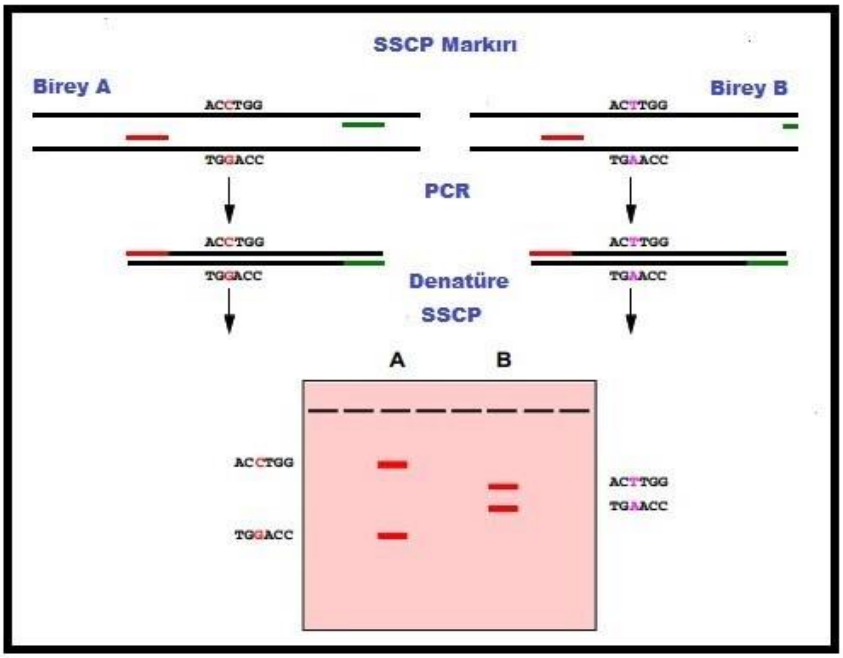
* * * * * * * Hedef bölge çoğaltım polimorfizmi (Target region amplification polymorphism, TRAP).

TRAP tekniği PCR temelli hızlı ve etkin bir yöntemdir (Hu ve Vick, 2003). Bu teknikte hedeflenen aday genin çevresinde yer alan polimorfik markırların oluşturulmasında biyoinformatik teknikler ve dokularda eksprese olan dizi bilgilerinin bulunduğu EST (expressed sequence tag) veritabanı kullanılmaktadır. TRAP tekniğiyle markır oluşturma da 2 farklı tipte primer dizayn edilir. İlk primer EST veri tabanındaki diziye göre tasarlanmaktadır. İkinci primer ise AT veya GC bakımından zengin rastgele tasarlanmaktadır. TRAP genellikle spesifik bir gen dizisi için markır oluşturmak amaçlı kullanılmaktadır. Bitki dünyasında parmakizi analizlerinde, genetik

çeşitlilik araştırmalarında, QTL haritalamasında ve populasyonlarda intervarietal rekombinasyon eşleştirme çalışmalarında kullanılmaktadır (Hu vd., 2005; Liu vd., 2005; Alwala, 2006).

* * * * * * * * Tek iplik konformasyon polimorfizmi (Single strand conformation polymorphism, SSCP).

SSCP markırları belirli bir gen bölgesinin PCR reaksiyonu ile amplifikasyon işlemi sonrasında, poliakrilamit jel elektroforezinde kullanılarak, tek iplikli DNA molekülünün üç boyutlu yapısının görüntüleme işlemidir (Şekil 2.19) (Orita vd., 1989; Anonymous, 2002). Komplementer ipliği olmayan DNA molekülü jel içerisinde kendi üzerinde kıvrım ve katlanmalar oluşturur (Hayashi, 1992). Bu kıvrım ve katlanmalar nükleotid dizine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Orita vd., 1989). Böylece bu tek iplikli DNA molekülünün konformasyonel farklılıklarına bakılarak tek nükleotit değişimlerinin, nokta mutasyonlarının ve insersiyonlar/delesyonların tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Fukuoka vd., 1994). Aynı zamanda allelik homozigot mu yoksa heterozigot mu olduğu da belirlenebilmektedir (Hayashi, 1993). PCR temelli SSCP tekniği hızlı, basit ve hassas bir tekniktir. Bitkilerde kullanılan parmak izi tekniklerinden bir tanesidir (Li vd., 2005).



Şekil 2.19. SSCP markırları (Anonymous, 2002).

3. MALZEME ve YÖNTEM

3.1 Örnek Lokalitesi

Aksaray İli sınırları içinde belirlenen 8 farklı lokaliteden (Çizelge 3.1) *Isatis floribunda* populasyonlarına ait yaş yaprak örnekleri toplanmıştır. Mümkün olduğunca birbirine uzak populasyonlar taranıp, deneysel amaçlı kullanılmaya çalışılmıştır.

Çizelge 3.1. *Isatis floribunda* örneklerin lokaliteleri.

Lokalite	Populasyon numarası	Enlem/Boylam	Rakım (yükseklik)	Toplanma zamanı
Aksaray-Ihlara Yolu (Kılıçarslan parkı ilerisi, 4. km)	1	38°38' 25,2" K /34°05' 90,9" D	1014	Mayıs sonu
Aksaray-Ihlara Karayolu (15. km)	2	38°37 ' 21,4" K /34°15 ' 13,8" D	1190	Mayıs sonu
Gücün Kaya köyü	3	38°39 ' 63,2" K /34°12 ' 49,3" D	1130	Mayıs sonu
Aksaray-Nevşehir karayolu Ihlara girişi (500. m)	4	38°42 ' 5,3" K /34°11 ' 12,1" D	1151	Mayıs sonu
Aksaray-Nevşehir karayolu, Çağlayan köyü girişi (30. km)	5	38°48 ' 34,1" K /34°24 ' 46,7" D	1148	Mayıs sonu
Aksaray-Nevşehir karayolu Altuntaş otel karşısı	6	38°40 ' 35,5" K /34°03 ' 37,1" D	1091	Mayıs sonu
Aksaray-Adana karayolu Hamidiye köyü girişi	7	38°28 ' 48" K /33°99 ' 1" D	958	Mayıs sonu
Aksaray-Konya karayolu, Panküp şeker fabrikası yanı (10. km)	8	38°34 ' 93,1" K /33°92 ' 88,3" D	928	Mayıs sonu
Elymus farctus (Viv.) Runemark ex Melderis (Kampüs içi)	Pozitif kontrol örneği	38°32 ' 76,8" K /33°98 ' 17,8" D	950	Mayıs sonu

3.2 Genomik DNA İzolasyonu

Mayıs ayının sonunda çiçeklenme döneminde lokaliteleri belirlenen her bir populasyondan 5 bitkiye ait yaş yaprak dokuları toplanarak, soğuk zincirde laboratuvara getirilmiştir. Yaprak dokuları için aşağıda basamaklar halinde verilmiş olan izolasyon prosedürü uygulanmıştır (Hulbert ve Bennetzen, 1991'den modifiye):

∗ Yaş bitki yaprakları izolasyon öncesi distile su ile yıkanmış ve kurutma havluları ile kurutulmuştur. Her bir populasyona ait toplam 500 mg yaprak dokusu steril porselen

havan içine koyulduktan sonra sıvı azot ile toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Sıvı azot içinde ezme işlemi üç tekrar edilmiştir (Şekil 3.1).

∗ Toz haline getirilen yaprak örnekleri 2 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Üzerlerine 750 µl CTAB'lı mikroekstraksiyon tamponu ve 50 µl 2-merkaptoetanol eklenmiştir. Örnek ile tamponun iyice karışması amacıyla en az 30 sn vorteksleme yapılmıştır.

∗ Tampon ile karıştırılmış örnekler su banyosunda 60°C'de yaklaşık 3 saat inkübe edilmiştir. 15 dk aralıkla tüpleri alt-üst ederek örnekler ile tamponun iyice karışması sağlanmıştır.

∗ Lizis sonrası yaprak örnekleri 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir steril ependorfa alınmıştır.

∗ Süpernatantların üzerine 7 µl RNaz (10 mg/ml) ilave edilerek oda ısısında 90 dk inkübasyon yapılmıştır.

∗ Süre sonunda örneklerin üzerine 10 µl proteinaz K (PK) eklenerek 90 dk oda ısısında ikinci bir inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

∗ İnkübasyon sonrası ependorfların üzerine 750 µl kloroform: izoamil alkol (24:1 oranında) eklenmiş ve karıştırılmıştır.

∗ Örnekler 10.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı yeni bir steril ependorf tüpüne aktarılmıştır.

∗ Süpernatantların üzerine 750 µl soğuk etanol (%100) eklenmiş ve DNA örneklerinin presipitasyonu yapılmıştır.

∗ Görünür hale gelen DNA örnekleri steril Pastör pipetleri kullanılarak steril ependorf tüplerine aktarılmıştır.

∗ Fazla alkol mikropipet yardımıyla alınmış ve her bir DNA örneğinin üzerine %70'lik, 500 µl soğuk etanol eklenmiştir.

∗ Kısa bir santrifügasyon sonrası alkolün fazlalığı uzaklaştırılarak DNA örnekleri kurutulmuş ve 200-300 µl steril saf su ile çözülmüştür.

∗ İzole edilen DNA örnekleri kontrol amaçlı %1 agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.2).

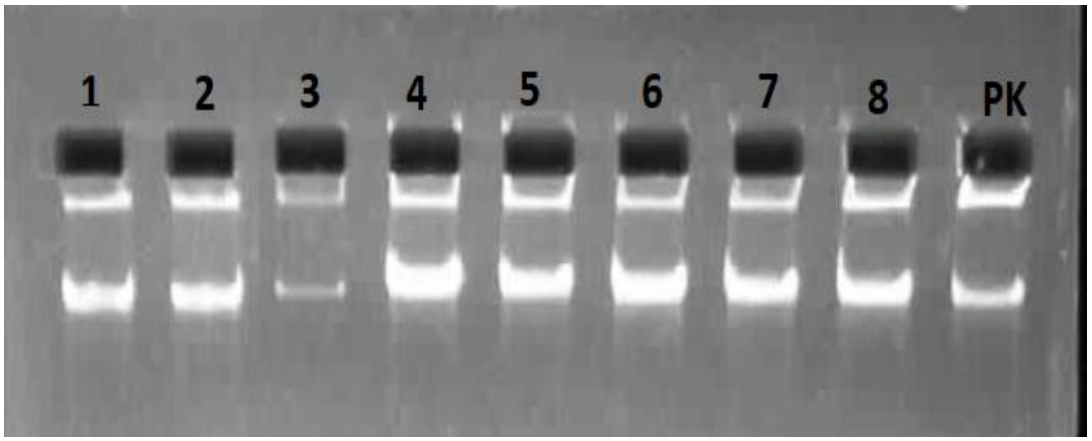
∗ Kalitesi kontrol edilen genomik DNA'lar daha sonra tekrar kullanılmak üzere derin dondurucuda (-20°C'de) saklanmıştır.

2 X CTAB (hexadecyltrimethylamonium bromide) lizis çözeltisi (100 ml, pH 7.5):

Tris (0.1 M)	1.22 gr
EDTA (0.025 M)	0.75 gr
NaCl (2.175 M)	8.7 gr
CTAB	2 gr (%2)
PVP-40	1 gr (%1)



Şekil 3.1. Yaş yaprak örneklerini DNA izolasyonu için sıvı azot ile ezme işlemi.



Şekil 3.2. Farklı populasyonlara ait (1-8) *Isatis floribunda* örneklerinin ve PK= pozitif kontrol örneğinin genomik DNA agaroz jel elektroforezin görüntüsü.

3.3 DNA Miktar Tayini

Bitki DNA örnekleri ThermoScientific Nanodrop 2000 spektrofotometre cihazında miktar tayini için en az üç kez okunmuştur (Çizelge 3.2). RAPD-PCR için her bir örneğe ait genomik DNA'lar son konsantrasyonları 25 ng/µl olacak şekilde sulandırılmış ve PCR başına 75 ng/µl genomik DNA kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Genomik DNA nanodrop ölçümleri.

Populasyon numarası	ng/µl	260/280	260/230
1	75	1.85	1.17
2	175	1.87	1.14
3	115	1.89	0.91
4	95	1.76	0.90
5	152	1.85	1.03
6	280	1.93	1.58
7	198	2.04	1.75
8	162	1.86	1.05
9	131	1.83	1.39

3.4 RAPD-PCR Döngüsü ve Reaksiyon Koşulları

3.4.1 RAPD-PCR reksiyon karışımı

10 X Buffer	3 µl (1 X)
$MgCl_2$ (25 mM)	4 µl (3.3 mM)
dNTPmix (2.5 mM)	6 µl (500 µM)
Primer (100 pmol/µl)	0.4 ul (40 pmol)
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.4 µl (2U)
H_20 (steril)	13.5 µl
Genomik DNA	3 µl
Son hacim	30 µl

3.4.2 RAPD-PCR reaksiyon koşulları

95°C	3 dk	Ön denatürasyon	
95°C	45 sn		
32-36°C (Çizelge 3.3)	45 sn.		45 döngü
72°C	45 sn		
72°C	10 dk	son uzama	

3.5 RAPD-PCR Primerleri

Thermo Fisher Scientific firmasına (Offenbach/Almanya) tarafından gönderilen RAPD primerleri 100 pmol/µl konsantrasyonlarda, steril suda stok şeklinde

sulandırılmıştır (Çizelge 3.3). Kontaminasyonu engellemek amacıyla da küçük aliquatlama şeklinde bölünerek reaksiyonlarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin özellikleri.

Primer	Dizi (5'→3')	%GC	Tm (°C)
1- CRA-22	CCGCAGCCAA	70	34
2- CRA-23	GCGATCCCCA	70	34
3- CRA-25	AACGCGCAAC	60	32
4- CRA-26	GTGGATGCGA	60	32
5- OPA-08	GTGACGTAGG	60	32
6- OPA-11	CAATCGCCGT	60	32
7- OPA-12	TGTCATCCCC	60	32
8- OPA-13	CAGCACCCAC	70	34
9- OPA-14	TGCGTGCTTG	60	32
10- OPA-15	GACGGATCAG	60	32
11- OPA-18	AGGTGACCGT	60	32
12- Hip-CA	GCGATCGCCA	70	34
13- Hip-GC	GCGATCGCGC	80	36
14- Hip-TG	GCGATCGCTG	70	34
15- MM	TCACGGTGCA	60	32

3.6 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jelin hazırlanması ve amplifikasyon ürünlerinin yürütülmesinde 10 x TBE tamponu kullanılmıştır. PCR reaksiyonunun kontrolü, yorumlama ve fotoğraflama için %2'lik agaroz jel, 90 mA (miliamper) sabit akımda, 90 dk süreyle yürütülmüştür. RAPD-PCR ürünleri her bir örnekten 13 µl PCR ürünü ve 7 µl yükleme boyası (bromfenol mavisi) eklenerek toplamda 20 µl yüklenmiştir. PCR ürünlerinin boyutunu belirlemek amacıyla ThermoScientific 100 bç DNA ladder (100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000-1200-1500-2000-3000 bç) 3 µl olacak şekilde jele yüklenmiştir. Yürütme sonrası jel etidyum bromür ile 6-10 dk boyanmıştır. Boyama sonrası jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır.

10 x TBE (1 lt, pH 8.3):

Tris	108 gr
Borik asit	55 gr
EDTA (sodyum tuzlu)	7.5 gr

6 X Bromfenol Mavisi (Yükleme Boyası, pH.7.6):

Tris	10 mM Tris-HCl
Bromfenol mavisi	%0.03
Ksilen siyanol FF	%0.03
Gliserol	%60
EDTA	60 mM

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Isatis floribunda'nın moleküler genetik analizinde kullanılmış olan 15 primerin tamamından güvenilir ve aynı zamanda tekrarlanabilir RAPD-PCR bantları elde edilmiştir. Her primer için deneysel güvenirlik açısından en az iki tekrar olacak şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan primerler ile toplam 114 RAPD-PCR ürünü elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinden en düşük bant ağırlığı Hip-GC primerine ait 175 bç (Şekil 4.6) ve en büyük bant ağırlığı ise OPA-15 primerine ait 2500 bç olarak bulunmuştur (Şekil 4.14). RAPD-PCR primer başına elde edilen ortalama polimorfik bant sayısı 6.78 olarak tespit edilmiştir. Kullanılan primerlerin altısında (MM, OPA-08, OPA-12, OPA-13, OPA-15 ve OPA-18) %100 polimorfizm oranı tespit edilmiştir (Şekil 4.8-9; Şekil 4.11-12; Şekil 4.14-15). Sadece bir primerde (OPA-14) bantlar monomorfik (polimorfizm oranı %0) olarak bulunmuştur (Şekil 4.13). Geriye kalan sekiz primerde ise polimorfizm yüzdesinin %25-90.9 oranları arasında değiştiği görülmektedir. En düşük bant sayısına (2 bant) sahip primerler OPA-08 (Şekil 4.9) ve OPA-14 (Şekil 4.13) olarak bulunurken, en fazla PCR ürünü (18 bant) Hip-CA primerinden (Şekil 4.5) elde edilmiştir. Hip-CA primeri ile aynı zamanda en fazla polimorfik bant sayısına (15 bant) ulaşılmıştır (Şekil 4.5). Kullanılan primerlerden 13 tanesi ile, toplam 31 adet populasyon spesifik RAPD markırı amplifiye edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. *Isatis floribunda* populasyonlarından elde edilen RAPD-PCR ürünlerinin genel değerlendirilmesi.

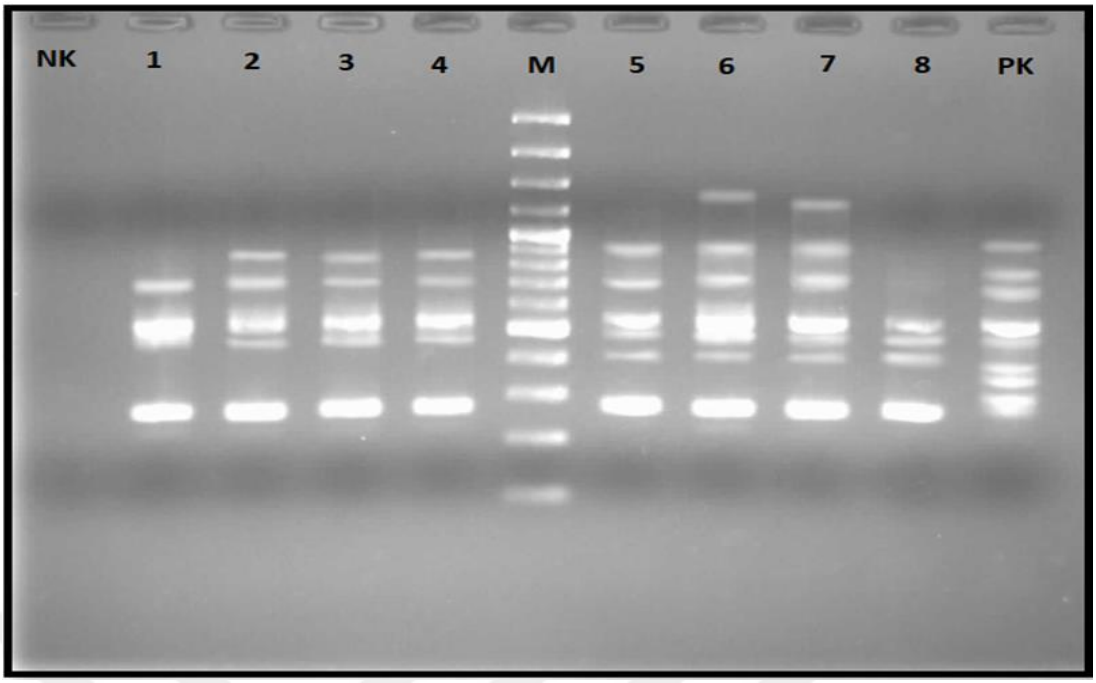
Çalışılan primer sayısı	15
Bant elde edilen primer yüzdesi (15/15)	100
Toplam polimorfik primer sayısı	14
Toplam bant sayısı	114
Monomorfik bant sayısı	19
Polimorfik bant sayısı	95
Populasyon spesifik bant veren primer yüzdesi (15/13)	86.6
Populasyon spesifik bant sayısı	31
Elde edilen monomorfik-polimorfik fragmentlerin bant büyüklükleri (bç)	175-2500
Primer başına elde edilen bant sayısı (114/15)	7.6
Polimorfik primer başına elde edilen ortalama polimorfik bant sayısı (95/14)	6.78
Toplam polimorfizm yüzdesi	83.3

Çizelge 4.2. RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri ve polimorfizm yüzdeleri.

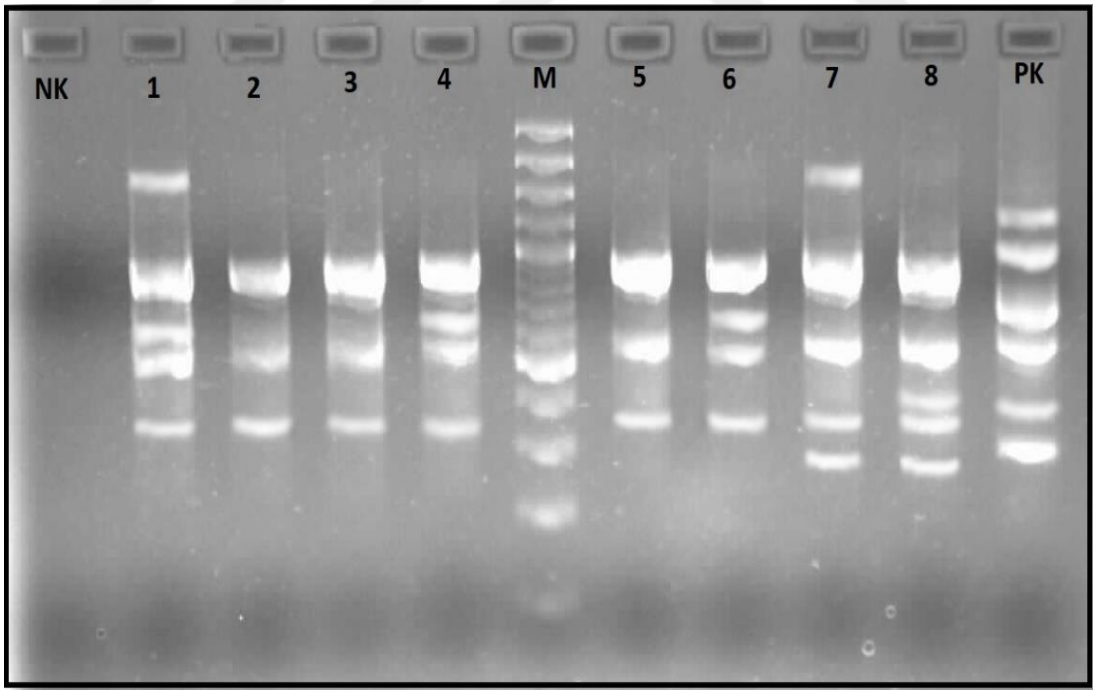
Sıra	Primer	Bant Büyüklüğü	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	% Polimorfizm
1	**CRA-22**	275,400,475,525,700,850,900, **1300**, **1400**	9	2	7	77.7
2	**CRA-23**	300, 350, **400**, 550,650, 900, 1600	7	3	4	57.1
3	**CRA-25**	**325**, 500, 650, 900	4	3	1	25
4	**CRA-26**	**275**, 325, 425, 550, 900	5	2	3	60
5	**Hip-CA**	275, 300, 325, 350, 400, **425,** 500, 550, 625, 675, **750**, **800**, 900, 1000, 1200, **1300**, **1500, 1750**	18	3	15	83.3
6	**Hip-GC**	175*, 275, 300, 475, **600**, 675, 1175	7	1	6	85.7
7	**Hip-TG**	**350**, **375**, 400, 525, 550, 625, 750, **1000**, 1100, **1300**, 1750	11	1	10	9.9

Çizelge 4.2 (devam). RAPD-PCR reaksiyonlarından elde edilen bant karakteristikleri ve polimorfizm yüzdeleri. (*Bant ağırlığı en düşük ve en büyük bantlar, **Bold ve altı çizili ürünleri populasyon spesifik RAPD markırlarını simgelemektedir).

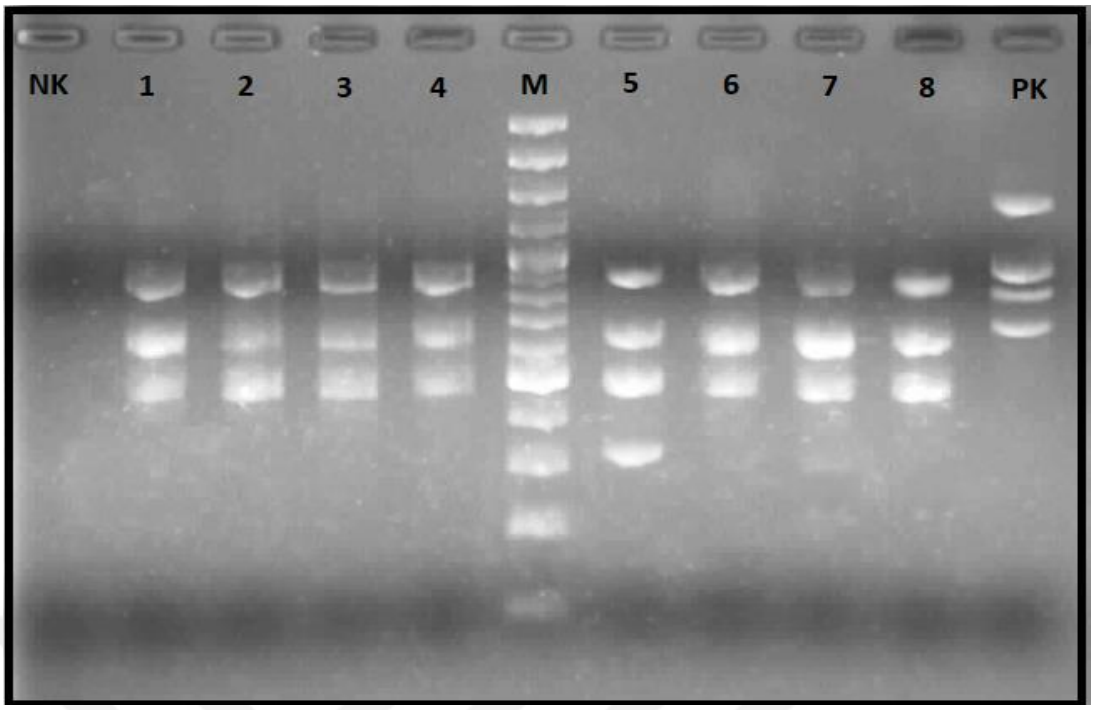
8	**MM**	475, 700, 1100, **1500**	4	-	4	100
9	**OPA-08**	**850**, 1000	2	-	2	100
10	**OPA-11**	250, 350, **400, 425**, 500, 600, 900, 1000, 1300, **1500**, 2000	11	2	9	81.8
11	**OPA-12**	400, 650, 875	3	-	3	100
12	**OPA-13**	275, 375, 425, 475, **500**, 600, 700, 750, 800, 850, **1200**, 1400	12	-	12	100
13	**OPA-14**	475, 600	2	2	-	0
14	**OPA-15**	**475**, 500, **600**, 650, **700**, 800, **1100**, 1175, **1500, 2500***	10	-	10	100
15	**OPA-18**	225, **375**, 425, 525, **675**, 700, 775, 900, 1100	9	-	9	100
Toplam			114	19	95	83.3



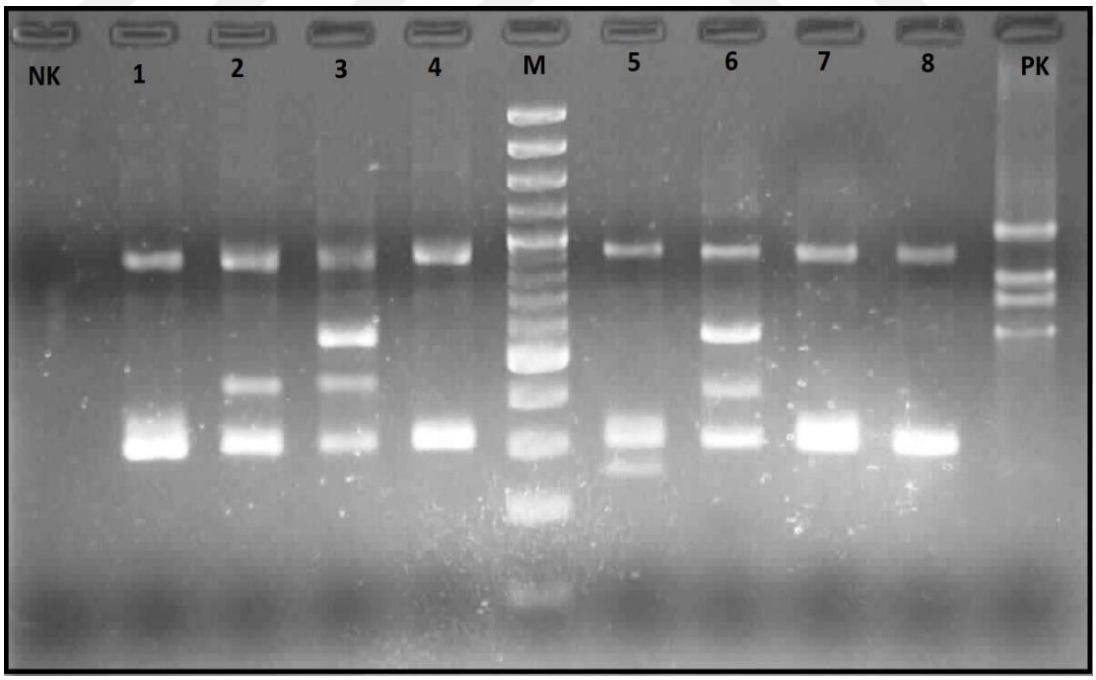
Şekil 4.1. CRA-22 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



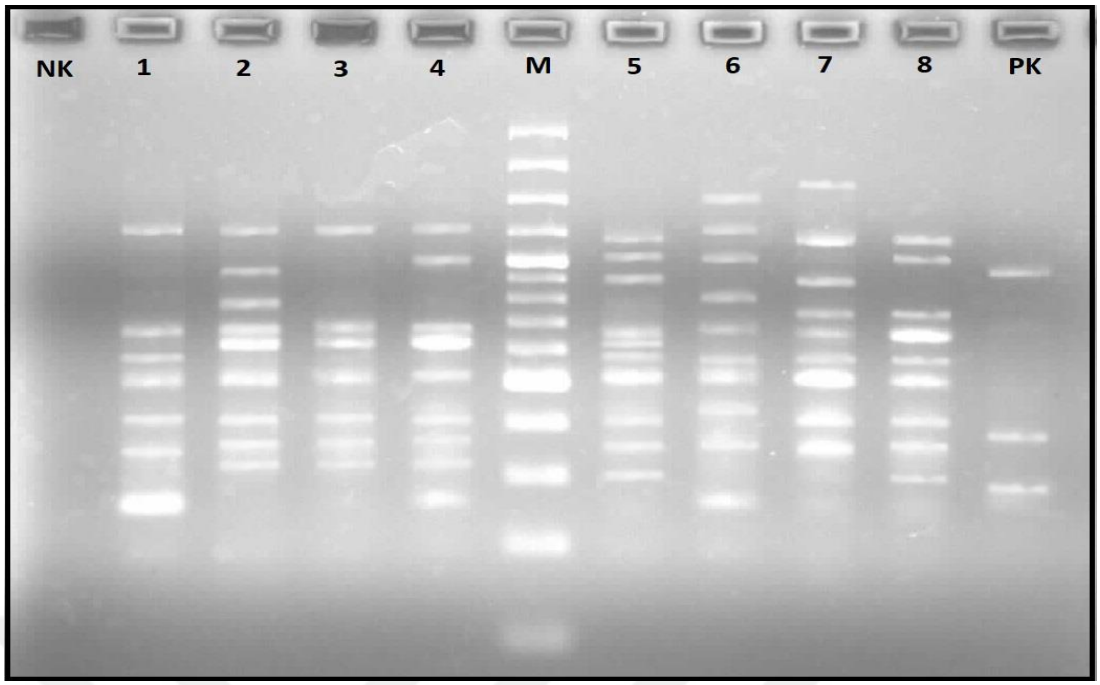
Şekil 4.2. CRA-23 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



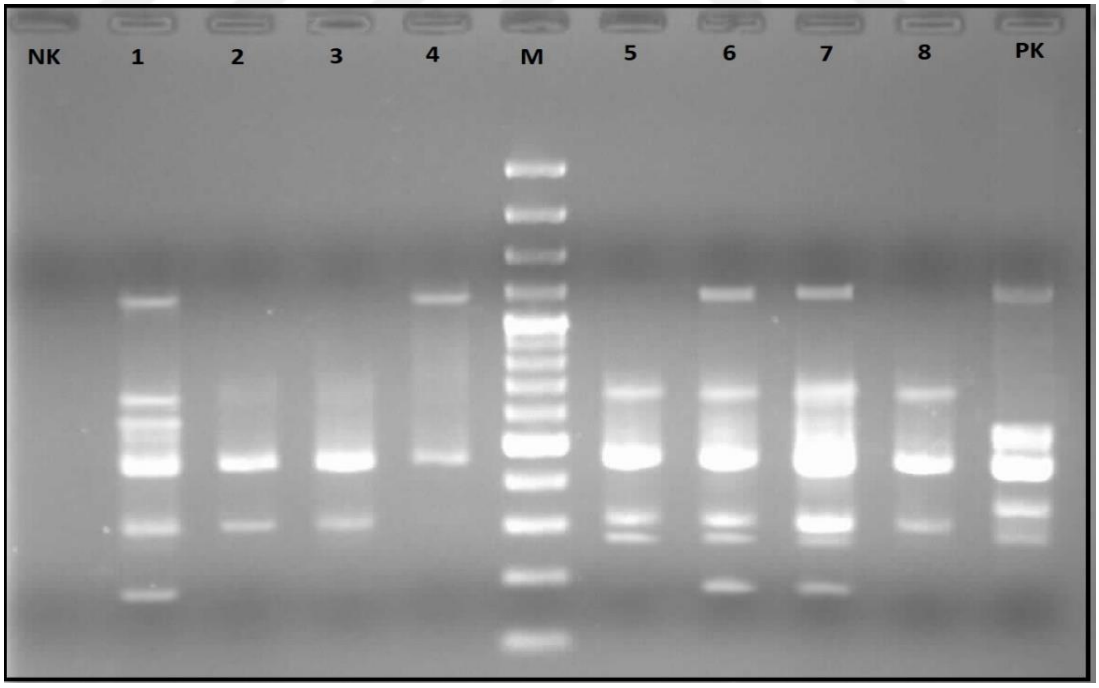
Şekil 4.3. CRA-25 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



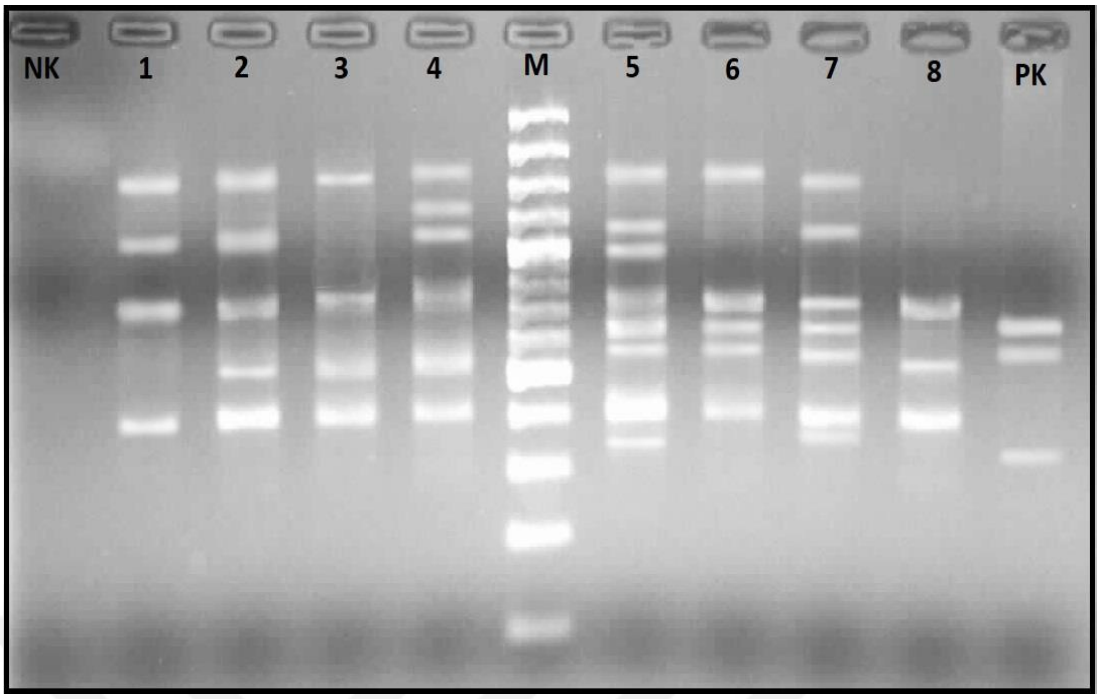
Şekil 4.4. CRA-26 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



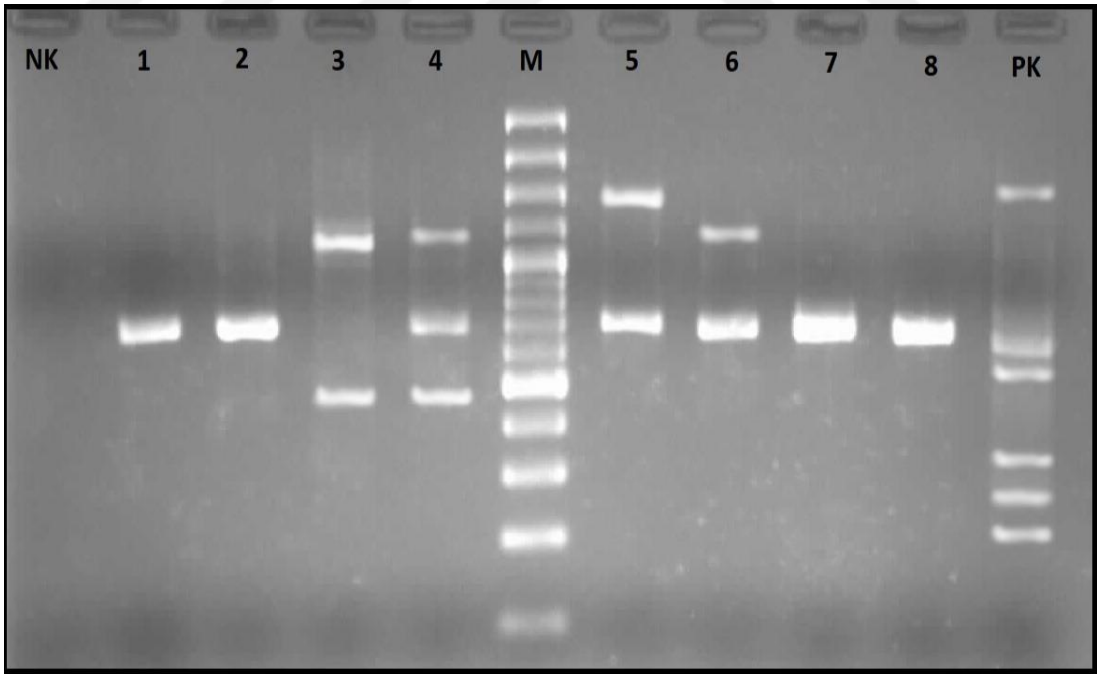
Şekil 4.5. Hip-CA primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



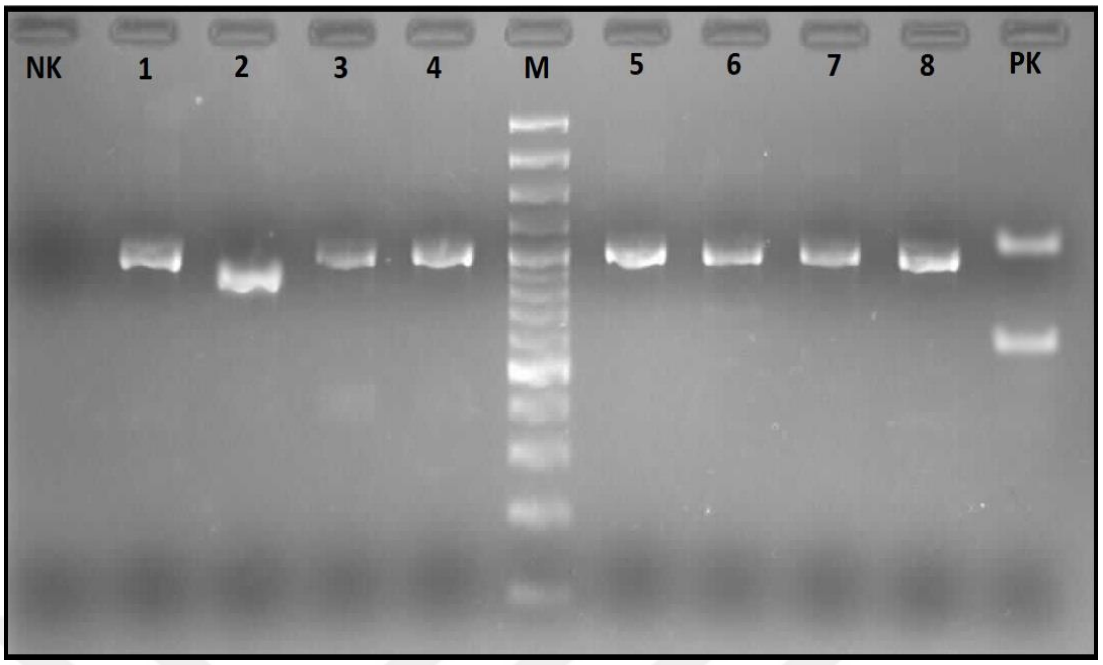
Şekil 4.6. Hip-GC primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



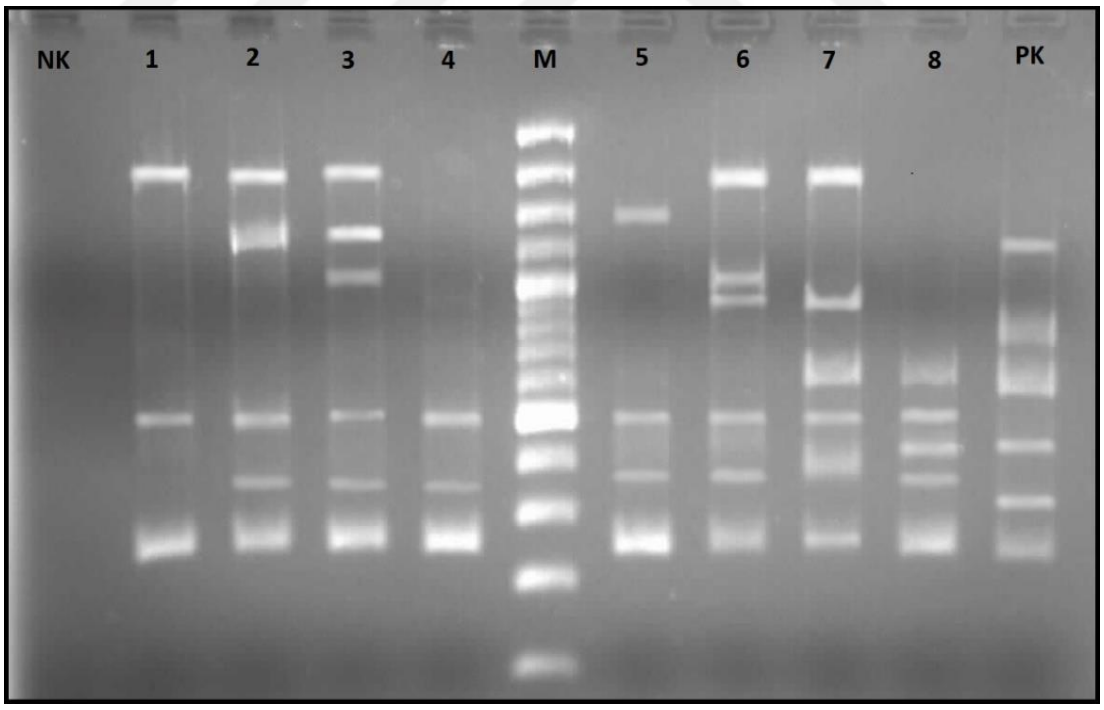
Şekil 4.7. Hip-TG primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



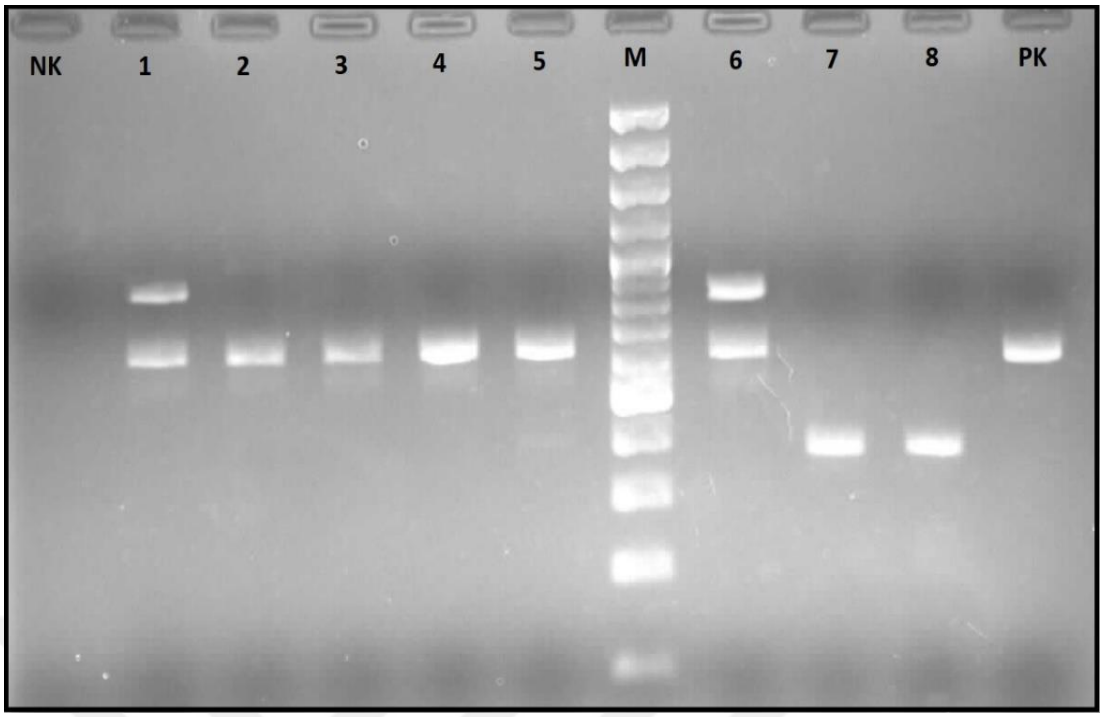
Şekil 4.8. MM primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



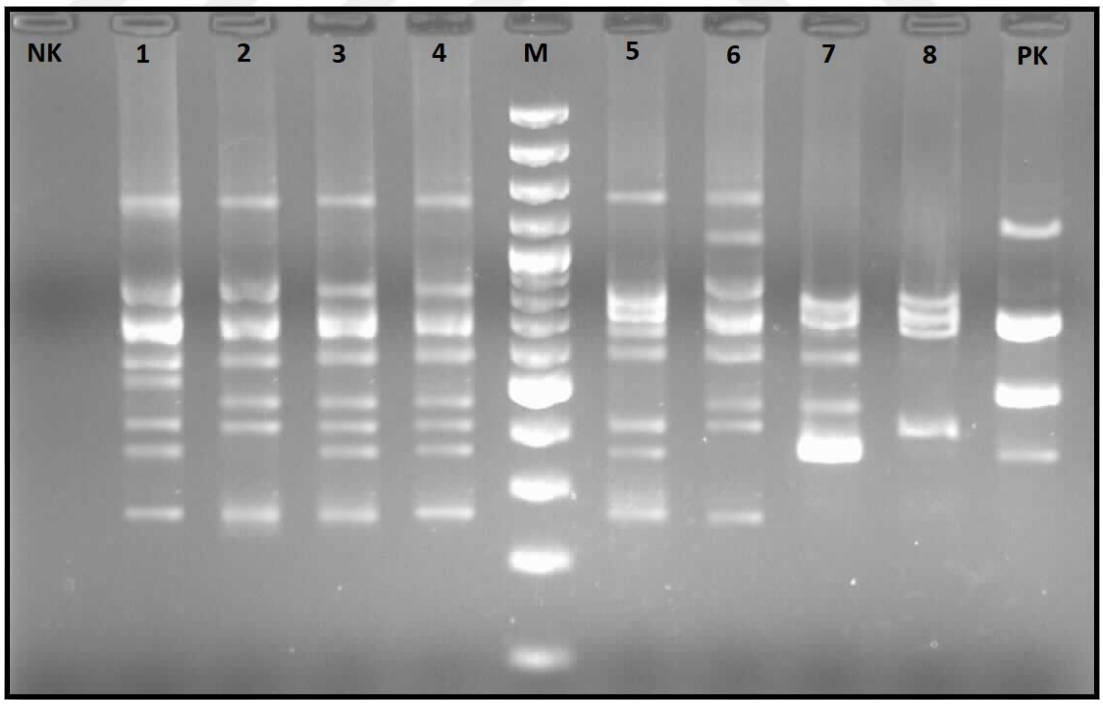
Şekil 4.9. OPA-08 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



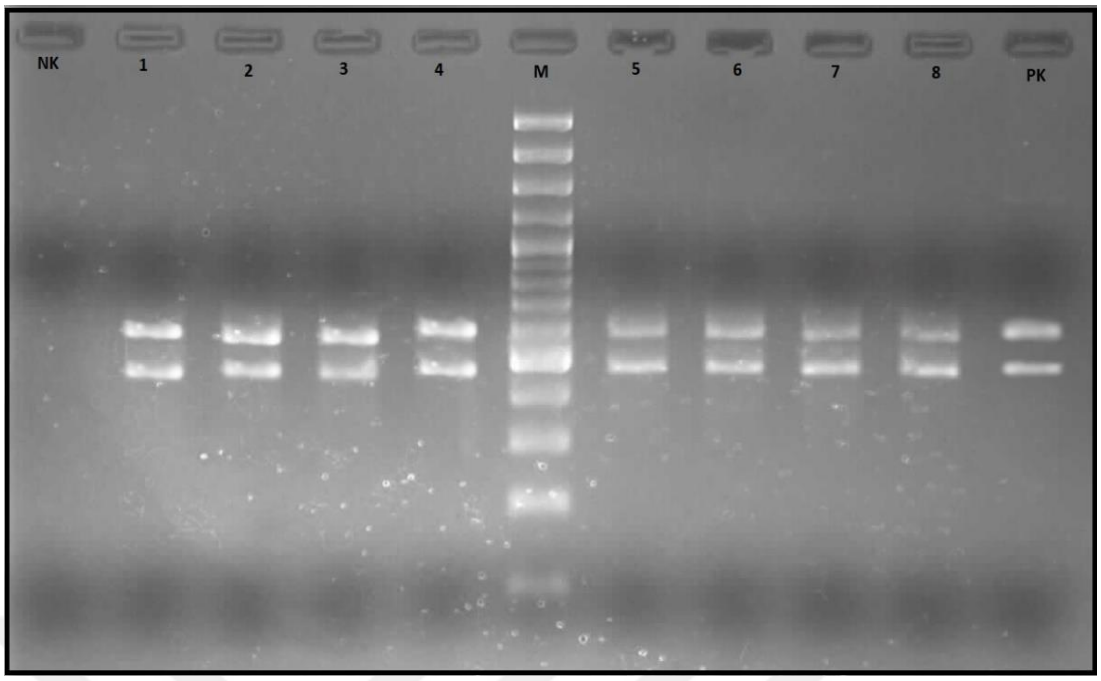
Şekil 4.10. OPA-11 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



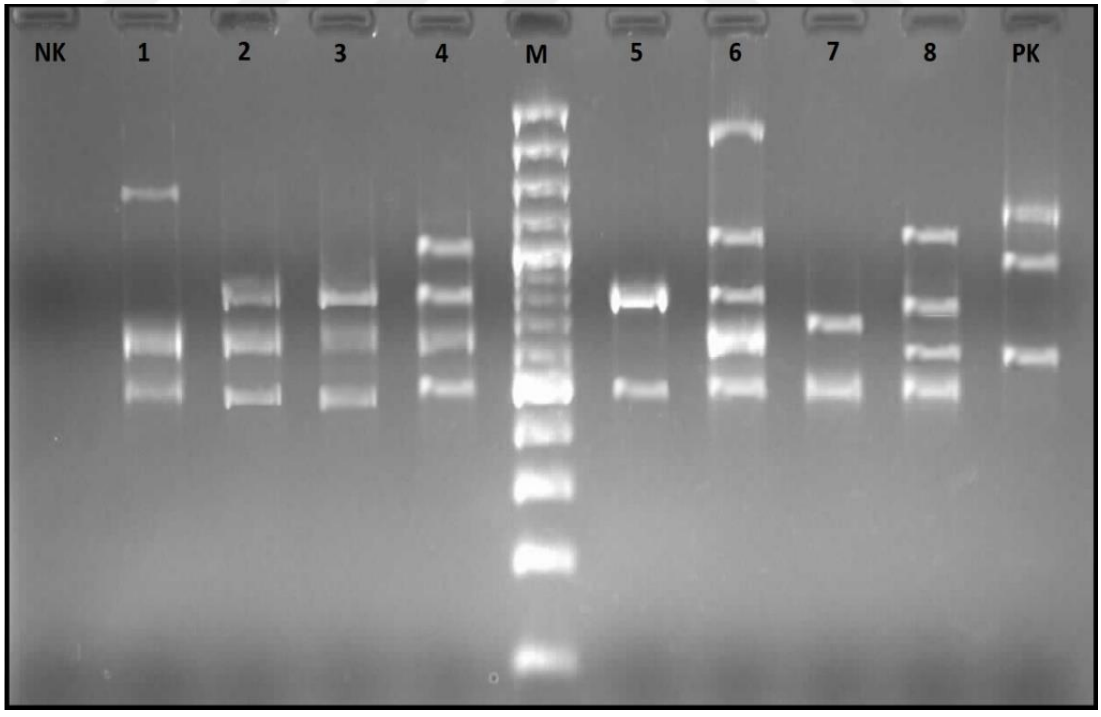
Şekil 4.11. OPA-12 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



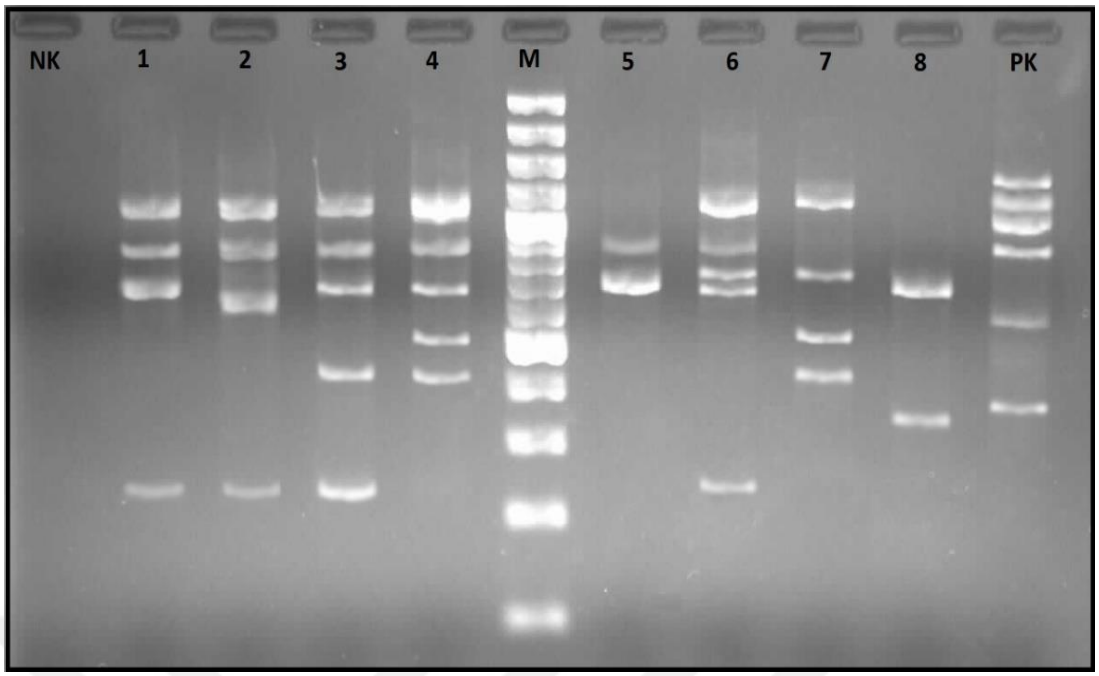
Şekil 4.12. OPA-13 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



Şekil 4.13. OPA-14 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



Şekil 4.14. OPA-15 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.



Şekil 4.15. OPA-18 primerinin agaroz jel görüntüsü. 1-8= *Isatis floribunda* populasyonları, NK=Negatif kontrol, M= DNA büyüklük markırı, PK= Pozitif kontrol.

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Yetiştiği coğrafyanın her türlü iklim ve doğa koşullarına uyum sağlamış olan yabani akrabalar, endemik bitkiler, yerli türler ve ırklar zengin genetik çeşitliliğe sahip olmalarından dolayı günümüzde çok büyük önem taşımaktadırlar. Bu bitki grupları insan tarafından kullanılan kültür bitkilerinin gen havuzlarının zenginleştirilmesinde ve iyileştirilmesinde de oldukça önemlidirler. Genetik çeşitliliğin saptanması, korunması ve sürdürülebilirliği için yapılan bilimsel çalışmalarda farklı sistematik kategorilerde genetik karakterizasyona ihtiyaç duyulabilir. Klasik sistematik sınıflandırma tekniklerinin populasyon genetiği, sistematik ve moleküler genetik analiz teknikleri ile birleştirilmesi gerekmektedir. Bu sentez sayesinde, bitki genetik kaynaklarının kullanımı ve gelecek için korunması mümkün olacağı gibi kültür, yabani ve endemik bitkilerin türiçi ve türlerarası düzeylerde genetik varyasyonları da daha iyi karekterize edilmiş olacaktır. Moleküler genetik analiz yöntemleri ile özellikle problemli değişik sistematik taksonların sınıflandırılmasında, türlerin teşhis ve tespitinde, tür içi ve türlerarası genetik varyasyonların ortaya konmasında, akrabalık ilişkilerin doğru bir şekilde oluşturulmasında vb. gibi oldukça değerli veriler ortaya konmaktadır.

Yayılım sınırları içinde Aksaray İlinin de bulunduğu *Isatis floribunda* endemik bir türdür. *Isatis* cinsinin değişik türleri ile yapılan birçok bilimsel çalışmada, çok değişik fonksiyonları olan farklı ve zengin biyolojik moleküllere sahip olduğu bulunmuştur. Mevcut akademik çalışmaların büyük bir bölümünün özellikle boyar madde içeren türlerin biyokimyası, morfolojik karekterler temel alınarak grubun sınıflandırılması üzerine yoğunlaşıldığı bilinmektedir. Bu durumun aksine, DNA markırlarını kullanan ve temel alan moleküler genetik analiz sonuçlarının ise oldukça az kullanıldığı farkedilmiştir. Literatür taramaları sonucunda ülkemizde bulunan *Isatis* cinsinde, Orta Anadolu'dan toplanan *Isatis glauca* türünde moleküler analiz yapılmış olmasına rağmen (Özbek vd., 2013), endemik olan *Isatis floribunda* bitkisindeki mevcut genetik çeşitliliği ortaya çıkarabilecek herhangi bir moleküler genetik analizin henüz yapılmadığı görülmektedir.

Basit, hızlı, ucuz olması, teknik kolaylık ve çok düşük miktarlarda DNA ihtiyacı gibi teknik avantajlara sahip olduğu bilinen RAPD-PCR tekniği kullanılarak; ilk kez Aksaray sınırları içinde sekiz farklı lokaliteden toplanan (Çizelge 3.1) *Isatis floribunda*

populasyonlarının genetik karekterizasyonu tez çalışmaları dahilinde araştırılmıştır. Deneysel çalışmalar kapsamında toplam 15 adet, 10 bç RAPD primeri seçilmiş ve her primerden başarılı bir şekilde PCR ürünü elde edilmiştir. Bant tekrarlanabilirliği ve metodun güvenirliği RAPD tekniğinin en büyük dezavantajları olarak ilk literatür bilgilerinde çok sık karşılaşılan ifadelerdir (Aydın, 2004). Günümüz koşullarında reaksiyon şartlarının çok sıkı kontrol altında tutulması, deneylerin birden fazla tekrarı ve sonuçların konfirme edilmesiyle, daha saf kimyasalların üretilmesi, teknik açıdan daha donanımlı ve üstün PCR cihazlarının üretilmesiyle sözkonusu olumsuz durumların üstesinden gelinebilmektedir. Tez çalışmasının deneysel işlemleri de bu konular dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bant görüntüsünün en iyi elde edildiği miktar, konsantrasyon ve reaksiyon koşulları deneysel olarak optimize edilmiş ve RAPD-PCR işlemleri için kullanılmıştır. Ayrıca deneysel verilerin güvenirliğini ve verimliğini artırmak, polimorfik RAPD markırları elde etmek için kullanılan random primerlerin sayısı olabildiğince fazla tutulmuştur.

RAPD reaksiyonları sonucunda oluşan polimorfik DNA markırları, bir fragmentin kaybı (1→0) ya da kazancı (0→1) ile ortaya çıkmaktadır. Primerin bağlandığı DNA bölgesinde meydana gelen farklı genetik düzenlemeler (tek baz değişiklikleri, insersiyonlar/delesyonlar) farklı genomlar arasındaki RAPD markır farklılığının ya da değişkenliğinin nedenleri olarak belirtilmektedir (Backeljau vd., 1995). PCR reaksiyonları sonucunda toplamda 114 adet bant gözlenlemiştir. Bu bantların 95'i polimorfik, 19'u ise monomorfik bant olarak değerlendirilmiştir. Total polimorfizm %83.3 oranında yüksek bir değer olarak bulunmuştur. RAPD reaksiyonları sonucunda belirlenen toplam 95 adet polimorfik bandın 31'nin populasyon spesifik olması; yayılım alanları arasında Aksaray'ın da olduğu belirtilen bu endemik türün aslında kendi gen merkezi sınırları içinde de genetik çeşitliğini devam ettirebildiğini, populasyonlar arasında genetik varyasyon düzeyinin yüksek olduğunu göstermesi açısından da önemli bir veridir. 15 adet primerden sadece birinden (OPA-14) istenilen polimorfik RAPD bantları amplifiye edilememiştir (Şekil 4.13). Geri kalan 14 primerin altısında (MM, OPA-08, OPA-12, OPA-13, OPA-15 ve OPA-18) %100 polimorfizm oranına ulaşılırken, sekiz primerde ise %25-90.9 oranları arasında değişen polimorfizm yüzdesi bulunmuştur (Şekil 4.8-9; Şekil 4.11-12; Şekil 4.14-15). Böyle bir tablo genetik karakterizasyon için seçilen RAPD yönteminin ve primerlerin

üzerinde araştırma yapılan bitki türünün moleküler sistematiğinde etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Isatis floribunda hariç *Isatis* cinsinin değişik türleri ile yapılan moleküler genetik çalışmalarda populasyonların polimorfizm değerlerinin yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (Moezzini, 2010; Gilbert, 2002; Spatora, 2007; Rocha, 2011; Özbek, 2013). Farklı bir tür ve metot ile yaptığımız analizlerde de yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına uyumlu olan genetik verilere ulaşılmıştır.

Çevresel etmenler, antropojenik etkiler, genetik sürüklenme, göç, mutasyon, rekombinasyon ve eşleşme (mating) sistemleri gibi değişik faktörler populasyonların genetik düzeyde farklılaşmasında etkili olmaktadırlar. Özellikle çevresel etmenler, genetik sürüklenme ve gen akışı bu faktörler arasında en etkilileri olarak düşünülmektedir. Coğrafik olarak yakın ve büyüklüğü fazla olmayan populasyonların genetik çeşitliğinin temelinde bu faktörlerin etkisinin büyük olduğu önerilmektedir (Özbek, 2013).

Isatis cinsinin dahil olduğu Brassicaceae familyasında hibridizasyon, introgressiyon ve hibrit türleşme önemli evrimsel kuvvetler ve genetik varyasyon kaynakları olarak rapor edilmektedir (Marhold ve Lihoua, 2006). İnterspesifik (türler arası) gen akışı ve hibridizasyon bazı cinslerin tür farklılaşmasına ve evrimine katkı sağlayabilmektedir. Hibridizasyon *Isatis* cinsinin evriminde önemli bir role sahip olabilir. *Isatis glauca* için hem hibridizasyon hem de dış döllenme (outcrossing) mekanizması türün genetik varyasyon yüksekliğinin nedeni olan iki faktör olarak kabul edilmektedir (Özbek, 2013). Dış döllenme yapan populasyonlarda daha yüksek genetik varyasyon oranları görülebilmektedir (Hamrick ve Godt, 1990). Üzerinde çalışılan *Isatis floribunda* da polimorfizm oranının totalde ve bireysel düzeyde yüksek bulunması bu türün akraba türü *Isatis glauca* gibi dış döllek olduğuna işaret etmektedir.

Moleküler genetik analiz sonuçları bir türün değişik populasyonlarını genetik düzeyde başarılı bir şekilde ayırt edebilme kapasitesine sahip olabilirler, fakat bir bitki taksonunun sistematiğine yönelik yapılan diğer çalışmalarla (morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik, kromozomal, polen analizleri vb gibi) birlikte değerlendirilmesi daha kesin ve güvenilir bilgilerin ortaya konması bakımından oldukça faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A. ve Kellogg, E. A., 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview, Plant Systematic and Evolution, 259, 89-120.

Alwala, S., Suman, A., Arro, J. A., Veremis, J. C. ve Kimbeng, C. A., 2006. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collection, Crop Science, 46, 448-455.

Agarwal, M., Shrivastava, N. ve Padh, H., 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences, Plant Cell Reports, 27, 617-631.

Anonymous, 2002. Mutant germplasm characteization using molecular markers, a manual, IAEA, Vienna, Training course series, no: 19, 339-385.

Arançlı, S., 2002. Biodiversity and natural resource management in Turkey, Proceeding of environmental connectivity: Protected areas the mediterranean context, Malaga, Spain.

Aras, A., Aksoy, N., Batı, Z., Sakınç, M., ve Erdoğan M., 2003. Yaşayan fosil *Sequoiadendron giganteum* (Ağaçlı linyitleri): ksiloloji, palinoloji ve yaşı, İstanbul, IV. Türkiye Kuvaterneri Çalıştayı, 186-194.

Atalay, İ., 1989. Toprak coğrafyası, Ege Üniversitesi yayınları, No:8, İzmir.

Atalay, İ., 1994. Türkiye vejetasyon coğrafyası, Ege Üniversitesi yayını, İzmir.

Avcı, M., 1993. Türkiye'nin flora bölgeleri ve Anadolu diagonali'ne coğrafi bir yaklaşım, Türk Coğrafya Dergisi, 28, 225-248.

Avcı, M., 2004. Ormangülleri (*Rhododendron* L.) ve Türkiye'deki doğal yayılışları, İstanbul Üniversitesi Coğrafya Dergisi, 12, 13-29.

Avcı, M., 2005. Türkiye bitki örtüsünün çeşitlilik ve endemizm açısından bir değerlendirmesi, Ulusal Coğrafya Kongresi, Bildiri Kitabı (editörler S. Avcı., ve H. Turoğlu), 73-85, İstanbul.

Aydın, Ö., 2004. RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Sayı: 6, 113-130.

Backeljau, T., De Bruyn, L., De Wolf, H., Jordaens, K., Van Dongen, S. ve Verhagen, R., 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony, Cladistic, 11, 119-130.

Bassam, B. J. ve Bentley, S., 1995. Electrophoresis of polyester backed polyacrylamide gels, Biotechniques, 19, 568-573.

Batur Ercivan, G., 2018. Mavi boya indigo bitkisinin tarihsel serüveni (the historical adventure of blue dye indigo plant), Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi, Cilt, 11, Sayı: 60, 547-553.

Behçet, L., ve Ünal, M., 1999. Pirreşit dağı (Muradiye-Van vejetasyonu, 1st International Symposium on Protection of Natural Enviroment and Ehrami Karaçam (*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe var. *pyramidata* (Acat.) Yaltırık), Dumlupınar Üniversitesi yayını, Kütahya, 101-120.

Beilstein, M. A., Al-Shehbaz, I. A., ve Kellogg, E. A., 2006. Brassicaceae phylogeny and trichome evolution, American Jornial of Botany, 93(4); 607-619.

Boissier, E., 1867-1884. Flora Orientalis, vol, 1, 5, Genevae et Basilecae.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., ve Davis, R. W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, American Journal of Human Genetics, 32, 314-333.

Bricker, B. J., 2002. PCR as a diagnostic tool for Brucellosis, Veterinary Microbiology, 90, 435-446.

Burtt, B. L., 2001. Tournefort in Turkey (1701-1702), The Karaca Arboretum Magazine, 6, 45-62.

Burtt, B. L., 2002. Tournefort in Turkey (1701-1702) Part 2, The Karaca Arboretum Magazine, 6, 137-146.

Byfield, A., ve Özhatay, N., 1997. A future for Turkey's peatlands: A conservation strategy for Turkey's peatland heritage, Doğal Hayatı Koruma Derneği, İstanbul.

Caetano-Anolles, G., ve Bassam, B. J. D. N. A., 1993. Amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers, Applied Biochemistry and Biotechnology, 42, 189-200.

Chelkowski, J., ve Stepien, L., 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat, J Appl Genet, 42, 117-126.

Cheng, H. Y., Yang, W. C., ve Hsiao, J. Y., 2001. Genetic diversity and relationship among peach cultivars based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP), Botanical Bulletin of Academia Sinica, 42, 201-206.

Ching, A. D. A., Caldwell, K. S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O. S., ve Tingey, S., 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines, BMC Genet, 3, 19.

Dabert, M. A., 2006. DNA Markers in the phylogenetics of the Acari, Biological Letters, 43 (2); 97-107.

Davis, P. H., 1965. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 1-9. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

Davis, P. H., Mill, R. R., ve Tan, K., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol, 10, Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.

Dinelli, G., ve Lucchese, C., 1999. Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of Lolium species and cultivars, Electrophoresis, 20, 2524-2532.

Dizdar, M. Y., 2003. Türkiye'nin Toprak Kaynakları, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara.

Dos Santos, J. B., Nienhuis, J., Skroch, P., Tivang, J., ve Slocum, M. K., 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among Brassica Oleracea L. genotypes, Theoretical and Applied Genetics, 87, 909-915.

Eken, G., Bozdoğan, M., İsfendiyaroğlu, S., Kılıç, D. T., ve Lise, Y., 2006. Türkiyenin önemli doğa alanları, Doğa derneği, Ankara.

Erik, S., ve Tarıkahya, B., 2004. Türkiye florası üzerine, Kebikeç, 17, 139-163.

Ertuğ, F., 2004. Bodrum yöresinde halk tıbbında yararlanılan bitkiler, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, Bildiriler kitabı, 76-93.

Fukuoka, S., Inoue, T., Miyao, A., ve Monna, L., 1994. Mapping of sequence-tagged sites in rice by single conformation polymorphism, DNA Research, 1, 271-277.

Garibyan, L., ve Avashia, N., 2013. Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (PCR), J Invest Dermatol, 133 (3); e6.

Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A.S., ve Bashir, M., 2000. Genetic relationship in Vigna mungo (L.) Hepper vd. V., İberica (L.) R. Wilezek based on morphological traits and SDS-PAGE, Euphytica, 123, 367-378.

Gilbert, K. G., Garton, S., Karam, M. A., Arnold, G. M., Karp, A., ve Edwards, K. J., 2002. A high degree of genetic diversity is revealed in *Isatis* subsp. (dyer's woad) by amplified fragment length polymorphism (AFLP), Theoretical and Applied Genetics, 104, 1150-1156.

Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., ve Dunn, M., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*), Science, 296, 92-100.

Gregor, D., Hartmann, W., ve Stosser, R., 1994. Cultivar identification in Prunus domestica using random amplified polymorphic DNA markers, Acta Horticulturae, 359, 33-40.

Gulsen, O., ve Mutlu, N., 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları, Alatarım 4 (2); 27-37.

Gulsen, O., Karagul, S., ve Abak, K., 2006. Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism, Biologia, 62, 41-45.

Guo, W., Zhang, T., Shen, X., Yu, J. Z., ve Kohel, R. J., 2003. Development of SCAR marker linked to a major QTL for high fiber strength and its usage in molecular-marker assisted selection in upland cotton, Crop Science, 43, 2252-2256.

Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., ve Başer, K. H. C., 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Supplement II., Vol. XI., Edinburgh: Edinburgh University Press.

Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., ve Babaç, M.T., 2012. Türkiye Bitkileri Listesi Damarlı Bitkiler, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmalı Derneği Yayını, Flora Dizisi 1, İstanbul.

Güner, A., 2014. *Resimli Türkiye Florası.* Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi, Flora Araştırmaları Derneği ve Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları yayını, İstanbul.

Haliassos, A., Chomel, J. C., Tesson, L., Baudis, M., Kruh, J., ve Kaplan, J. C., 1989. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations, Nucleic Acids Researc, 17, 3606.

Hamrick, JL., ve Godt, MJW., 1990. Allozyme diversity in plant species, pp. 43–63, In; Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L., ve Weir, B. S., (editörler), Plant population genetics, breeding and genetic resources, Sinauer Associates, Sunderland.

Harris, S.A., 1999. RAPD in systematics-a useful metodology, pp. 211-228, In; Hollingsworth, P. M., Bateman R. M., ve Gornall R. J., (editörler), Molecular Systematics and Plant Evolution, Taylor & Francis, London.

Hayashi, K., 1992. PCR-SSCP-rapid and easy detection of DNAsequence changes, Humman Cell, 5, 180-184.

Hayek, A., 1911. Entwurf eines Cruciferensystems auf phylogenetischer Grundlage, Beih Bot Centralbl, 27, 127-335.

Hu, J., ve Vick, B. A., 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping, Plant Molecular Biology Reporter, 21, 289-294.

Hu, J., Ochoa, O. E., Truco, M. J., Vick, B. A., 2005. Application of the TRAP technique to lettuce (Lactuca sativa L.) genotyping, Euphytica, 144, 225-235.

IUCN (International Union for Conservation of Nature) Red List of Threatened Species. Version 2017-13.

Jo, I. H., Kim, Y. C., Kim, D. H., Kim, K. H., Hyun, T. K., Ryu, H., vd., 2017. Applications of molecular markers in the discrimination of Panaxspecies and Korean ginseng cultivars (Panax ginseng), Journal of Ginseng Research, 41, 444-449.

Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J. N., ve Lang, D. J., 2002. Genetic diversity among forage bermudagrass (*Cynodon* spp.): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprintig, Crop Science, 42, 2118-2127.

Karcicio, M., 2006. Yerel durum buğdayı (*Triticum durum* Desf.) çeşitlerinde RAPD-PCR tekniği ile genetik çeşitlilik analizi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Karp, A., Issar, P. G., ve Ingram, D. S., 1998. Molecular tools for screening biodiversity. Chapman and Hall, London.

Kılıçoğlu, M. Ç., ve Özkoç, G., 2008. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 23 (1); 65-72.

Koch, M., 2003. Molecular phylogenetics, evolution and population biology in Brassicaceae, pp.1-35, In:Sharma A.K., ve Sharma A., (editörler) Plant genome: biodiversity and evolution, vol. la (phanero gams), Science Publishers, Enfield, NH, USA.

Komori, T., ve Nitta, N., 2005. Utlization of CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers, Breeding Science, 55, 93-98.

Konieczny, A., ve Ausubel, F. M., 1993. Procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers, The Plant Journal, 4, 403-410.

Kumar, A., ve Bennetzen, J. L., 1999. Plant retrotransposons, Ann Rev Genet, 33, 479-532.

Kutluk, H., ve Aytuğ, B., 2001. "Endemik plants of Turkey", Plants of the Balkan Peninsula: into the Next Millenium, Proceeding of the 2nd Balkan Botanical Congress, İstanbul, Vol. I, 285-288.

Li, G., ve Quiros, C. F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica, Theoretical and Applied Genetics, 103, 455-546.

Li, L., Strahwald, J., Hofferbert, H. R., Lu, J., Tacke, E., Junghans, H., vd., 2005. DNA variation at the invertase locus inv. GE/GF is associated with tuber quality traits in populations of potato breeding clones, Genetics, 170, 813-882.

Liu, Z., Anderson, J. A., Hu, J., Friesen, T. L., Rasmussen, J. B., ve Faris, J. D., 2005. A wheat intervarietal linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci, Theoretical and Applied Genetics, 111, 782-794.

Majer, D., Mithen, R., Lewis, B. G., Vos, P., ve Oliver, R. P., 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi, Mycological Research, 100, 1107-1111.

Marhold, K., ve Lihová, J., 2006. Polyploidy, hybridization and reticulate evolution: lessons from the Brassicaceae K. Plant Syst Evol, 259, 143-174.

McDermott, J. M., Brandle, U., Dutly, F., Haemmerli, U. A., Keller, S., Muller, K. E., vd., 1994. Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR and VNTR markers, Phytopathology, 84, 1316-1321.

Michelia, M. R., ve Bova, R., 1997. Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR, Springer, Berlin.

Min, W. K., Han, J. H., Kang, W. H., Lee, H. R., ve Kim, B. D., 2008. Reverse random amplified microsatellite polymorphism reveals enhanced polymorphisms in the 3' end of simple sequence repeats in the pepper genome, Molecules and Cells, 26 (3); 250-7.

Moazzeni, H., Zarrea, S., Al-Shehbaz, I. A., ve Mummenhoff, K., 2010. Phylogeny of Isatis (Brassicaceae) allied genera based on ITS sequence of nuclear ribosomal DNA and morphological characters, Flora, 205, 337-343.

Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J., ve Pepper, A. E., 1998. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics, Plant Journal, 14, 387-392.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., ve Sekiya, T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86, 2766-2770.

Özbek, Ö., Görgülü, E., ve Yıldırımlı, Ş., 2013. Genetic diversity in populations of *Isatis glauca* Aucher ex Boiss. subsp. from Central Anatolia in Turkey, as revealed by AFLP analysis, Botanical Studies, 54-48.

Özgökçe, F., 1999. Van gölü havzasında yetişebilen bazı otsu bitkilerin yakacak olarak değerlendirilmesi üzerine düşünceler. 1st International Symposium on Protection of Natural Enviroment and Ehrami Karaçam (Pinus nigra Arnold. subsp. pallasiana (Lamb.) Holmboe var. pyramidata (Acat.) Yaltırık), Dumlupınar Üniversitesi yayını, Kütahya, 784-791.

Özhatay, N., Byfield, A., ve Atay, S., 2005, Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı, WWF Türkiye Doğal Hayatı Koruma Vakfı yayını, İstanbul.

Öztürk, M., Çelik, A., Yarcı, C., Aksoy, A., ve Feolı, E., 2002. An overview of plant diversity, land use and degradation in the Mediterranean region of Turkey, Management of Environmental Quality, 13 (5); 442-449.

Paran, I., ve Michelmore, R. W., 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, Theoretical and Applied Genetics, 85, 985-999.

Richard, I., ve Beckman, J. S., 1995. How neutral are synonymous codon mutations, Nature Genetics, 10, 259.

Rocha, L., Martins, S., Carnide, V., Braga, F., ve Carvalho, C., 2011. Genetik diversity in woad (*Isatis tinctoria* L.) accessions detected by ISSR markers. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 9 (2); 210-213.

Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., ve Marth, G., 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, Nature, 409, 928-933.

Sanchez de la Hoz, M. P., Davila, J. P., Loarce, Y., ve Ferrer, E., 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley, Genome, 39, 112-117.

Schlotterer, C., ve Tautz, D., 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA, Nucleic Acids Research, 20, 2211-2215.

Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments, Nat Biotechnology, 18, 233-234.

Schulz, O. E., 1936. Cruciferae, pp. 227-658. in: Engler A., ve Harms H., (editor) Die natürlichen Pflanzenfami lien, vol. 17B, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Semblat, J. P., Wajnberg, E., Dalmasso, A., Abad, P., ve Castagnone- Sereno, P., 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis, Molecular Ecology, 7, 119-125.

Sobrino, B., Briona, M., ve Carracedoa, A., 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, Forensic Science International, 154, 181-194.

Somuncu, M., 2003. Türkiye'de koruma altındaki dağlık alanlarda turizm/ rekreasyon ve çevre etkileşimi: Aladağlar ve Kaçkar Dağları milli parkı örnekleri, Coğrafi Çevre Koruma ve Turizm Sempozyumu, 65-72.

Spataro, G., Taviani, P., ve Negri, V., 2007. Genetic variation and population structure in Eurasian collection of *Isatis tinctoria* L., Genetic Resources and Crop Evolution, 54, 573-584.

Spataro, G., ve Negri, V., 2008. Adaptability and variation in *Isatis tinctoria* L.: a new crop for Europe, Euphytica, 163, 89-102.

Sunyaev, S., Hanke, J., Aydin, A., Wirkner, U., Zastrow, I., Reich, J., vd., 1999. Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. Journal of Molecular Medicine, 77, 754–760.

Şimşek, I., Aytekin, F., Yeşilada, E., ve Yıldırımlı, Ş., 2004. Anadolu'da halk arasında bitkilerin kullanılış amaçları üzerinde etnobotanik bir çalışma, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler kitabı, 434-457.

Tautz, D., ve Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes, Nucleic Acids Research, 12 (10): 4127-4138.

Temizkan, G., ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler (2. baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 345.

Tzortzakakis, E. A., Blok, V. C., Phillips, M. S., ve Trudgill, D. L., 1999. Variation in rootknot nematode (Meloidogyne spp.) in Crete in relation to control with resistant tomato and pepper, Nematology, 1 (5): 499-506.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., vd., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids Res, 23, 4407-4414.

Walker, M., 2001, Biodiversity update, New Scientist, 2288.

Welsh, J., ve McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Res, 18, 7213-7218.

Wenz, H. M., Robertson, J. M., Menchen, S., Oaks, F., Demorest, D. M., Scheibler, D., vd., 1998. High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis, Genome Research, 3, 69-80.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., ve Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Research, 18 (22: 6531-6535.

Wu, K. S., Jones, R., Danneberger, L., ve Scolnik, P., 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning, Nucleic Acids Research, 22, 3257-3258.

Yıldırım, A., ve Kandemir, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları, Bitki Biyoteknolojisi 2, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, 334-363.

Yıldırımlı, S., 1988. Revision of *Isatis* L. (Curiciferae) genus from West and North part of Turkey, Turkish Journal Botany, 12 (3): 332-400.

Yıldırımlı, Ş., 2001. The cholorogy of the Turkish species of Brassicaceae, Buddlejaceae and Buxaceae famillies, OT Sistematik Botanik Dergisi, 8 (1): 141-171.

Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K., Li, S., ve Liu, B., 2002. A draft sequence of the rice Genome (*Oryza sativa* L. subsp. indica), Science, 296, 79-92.

URL-1< http://www.plantsoftheworldonline.org > Erişim tarihi: 08.11.2019.

URL-2< https://www.bizimbitkiler.org.tr/v3/demo/details.php?id=4117&t=1> Erişim tarihi: 22.11.2019.

URL-3
<http://www.tehditaltindabitkiler.org.tr/v2/index.php?sayfa=detay&id=NTY2> Erişim tarihi: 25.11.2019.

EKLER

EK A. DNA izolasyonu, agaroz jel elektroforezi ve RAPD-PCR'da kullanılan kimyasallar.

Kimyasal ya da sarf adı	**Marka**
Agaroz	Lonza
Borik asit	Merck
EDTA	Lobachemie
2-Merkaptoetanol	Merck
Tris	Thermo scientific
CTAB	Merck
NaCl	Merck
RNaz	Thermo scientific
Proteinaz K (PK)	Thermo scientific
Etil alkol	Sigma aldrich
Kloroform/izoamil alkol	Sigma aldrich
PVP-40	Sigma aldrich
10 X Buffer	Thermo scientific
$MgCl_2$	Thermo scientific
dNTPmix	Thermo scientific
Taq DNA polimeraz	Thermo scientific

EK B. RAPD-PCR ürünlerinin farklı *Isatis* populasyonlarına ve pozitif kontrol örneğine göre bant dağılımı.

CRA-22								
275	+	+	+	+	+	+	+	+
400	-	-	-	-	+	+	+	+
475	-	+	+	+	+	+	+	+
525	+	+	+	+	+	+	+	+
700	+	+	+	+	+	+	+	-
850	-	+	+	+	-	-	-	-
900	-	-	-	-	+	+	+	-
1300	-	-	-	-	-	-	+	-
1400	-	-	-	-	-	+	-	-
CRA-23								
300	-	-	-	-	-	-	+	+
350	+	+	+	+	+	+	+	+
400	-	-	-	-	-	-	-	+
550	+	+	+	+	+	+	+	+
650	+	-	-	+	-	+	-	-
900	+	+	+	+	+	+	+	+
1600	+	-	-	-	-	-	+	-
CRA-25								
325	-	-	-	-	+	-	-	-
500	+	+	+	+	+	+	+	+
650	+	+	+	+	+	+	+	+
900	+	+	+	+	+	+	+	+
CRA-26								
275	-	-	-	-	+	-	-	-
325	+	+	+	+	+	+	+	+
425	-	+	+	-	-	+	-	-
550	-	-	+	-	-	+	-	-
900	+	+	+	+	+	+	+	+
Hip-GC								
175	+	-	-	-	-	+	+	-
275	-	-	-	-	+	+	+	-
300	+	+	+	-	+	+	+	+
475	+	+	+	+	+	+	+	+
600	+	-	-	-	-	-	-	-
675	+	-	-	-	+	+	+	+
1175	+	-	-	+	-	+	+	-

EK B. (devam). RAPD-PCR ürünlerinin farklı *Isatis* populasyonlarına göre bant dağılımı.

OPA-08								
850	-	+	-	-	-	-	-	-
1000	+	-	+	+	+	+	+	+
OPA-11								
250	+	+	+	+	+	+	+	+
350	-	+	+	+	+	+	-	+
400	-	-	-	-	-	-	+	-
425	-	-	-	-	-	-	-	+
500	+	+	+	+	+	+	+	+
600	-	-	-	-	-	-	+	+
900	-	-	-	-	-	+	+	-
1000	-	-	+	-	-	+	-	-
1300	-	+	+	-	-	-	-	-
1500	-	-	-	-	+	-	-	-
2000	+	+	+	-	-	+	+	-
OPA-12								
400	-	-	-	-	-	-	+	+
650	+	+	+	+	+	+	-	-
875	+	-	-	-	-	+	-	-
OPA-13								
275	+	+	+	+	+	+	-	-
375	+	-	+	+	+	-	+	-
425	+	+	+	+	+	+	-	+
475	-	+	+	+	-	+	+	-
500	+	-	-	-	-	-	-	-
600	+	+	+	+	+	+	+	-
700	+	+	+	+	+	-	-	+
750	-	-	-	-	+	+	+	+
800	-	-	-	-	+	-	+	+
850	+	+	+	+	-	+	-	-
1200	-	-	-	-	-	+	-	-
1400	+	+	+	+	+	+	-	-
OPA-14								
475	+	+	+	+	+	+	+	+
600	+	+	+	+	+	+	+	+

EK B. (devam). RAPD-PCR ürünlerinin farklı *Isatis* populasyonlarına göre bant dağılımı.

OPA-15								
475	-	-	+	-	-	-	-	-
500	+	+	-	+	+	+	+	+
600	-	-	-	-	-	-	-	+
650	+	+	+	+	-	+	-	-
700	-	-	-	-	-	-	+	-
800	-	+	+	+	+	+	-	+
1100	-	-	-	+	-	-	-	-
1175	-	-	-	-	-	+	-	+
1500	+	-	-	-	-	-	-	-
2500	-	-	-	-	-	+	-	-
OPA-18								
225	+	+	+	-	-	+	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	+
425	-	-	+	+	-	-	+	-
525	-	-	-	+	-	-	+	-
675	-	+	-	-	-	-	-	-
700	+	-	+	+	+	+	-	+
775	-	-	-	-	-	+	+	-
900	+	+	+	+	+	+	-	-
1100	+	+	+	+	-	+	+	-
Hip-TG								
350	-	-	-	-	+	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	+	-
400	+	+	+	+	+	+	+	+
525	-	+	+	+	-	-	-	+
550	-	-	-	-	+	+	+	-
625	-	-	-	-	+	+	+	-
750	+	+	+	+	+	+	+	+
1000	-	-	-	-	+	-	-	-
1100	+	+	-	+	+	-	+	-
1300	-	-	-	+	-	-	-	-
1750	+	+	+	+	+	+	+	-
MM								
475	-	-	+	+	-	-	-	-
700	+	+	-	+	+	+	+	+
1100	-	-	+	+	-	+	-	-
1500	-	-	-	-	+	-	-	-

EK B. (devam). RAPD-PCR ürünlerinin farklı *Isatis* populasyonlarına göre bant dağılımı.

Hip-CA								
275	+	-	-	+	-	+	-	-
300	-	-	-	-	-	+	-	+
325	-	+	+	+	-	-	-	-
350	+	+	+	+	+	+	+	+
400	+	+	+	+	+	-	+	+
425	-	-	-	-	-	+	-	-
500	+	+	+	+	+	+	+	+
550	+	-	-	-	+	+	+	+
625	-	+	+	+	+	-	-	-
675	+	+	+	+	+	+	+	+
750	-	+	-	-	-	-	-	-
800	-	-	-	-	-	+	-	-
900	-	+	-	-	+	-	+	-
1000	-	-	-	+	+	+	-	+
1200	+	+	+	+	+	-	+	+
1300	-	-	-	-	-	+	-	-
1500	-	-	-	-	-	+	-	-
1750	-	-	-	-	-	-	+	-

EK C. Pozitif kontrol örneğinde RAPD-PCR ürünlerinin farklı *Isatis* populasyonlara göre bant dağılımı.

Primer	Bant Büyüklüğü (bç)
CRA-22	300, 375, 400, 475, 525, 675, 700, 800, 975
Hip-CA	300, 375, 1000
CRA-25	700, 850, 1000, 1500
CRA-26	600, 750, 800, 1100
Hip-GC	275, 350, 450, 550, 1175
Hip-TG	325, 550, 700
OPA-08	650, 1200
OPA-12	650
OPA-14	475, 600
OPA-15	650, 1100, 1300
OPA-18	350, 625, 900, 1000, 1250
CRA-23	300, 400, 550, 650, 1000, 1200
MM	225, 275, 325, 600, 675, 1500
OPA-11	250, 300, 425, 575, 750, 1200
OPA-13	375, 475, 700, 1200

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ayna DOVLETOVA

Adres : Şeyhhamit mah. 3314. Sok. Yeşilpınar sitesi, 6/1 giriş. Merkez/ Aksaray.

E-posta adresi : aynadowletowa@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2012-2016

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 2016-