

Origanum sipyleum L.'UN FARKLI POPULASYONLARINDA
GENETİK VARYASYONUN
MOLEKÜLER DÜZEYDE TESPİT EDİLMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Volkan KALENDER

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Mehmet TEMEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mayıs 2006

“Bu tez çalışması “022.FENED.14” numaralı proje olarak A.K.Ü BAPK tarafından desteklenmiştir.”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Origanum sipyleum L.'UN FARKLI POPULASYONLARINDA GENETİK
VARYASYONUN MOLEKÜLER DÜZEYDE TESPİT EDİLMESİ

Volkan KALENDER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman
Yrd. Doç. Dr. Mehmet TEMEL

AFYON
2006

Volkan KALENDER'in yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “*Origanum sipyleum* L.’un Farklı Populasyonlarında Genetik Varyasyonun Moleküler Düzeyde Tespit Edilmesi” başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

... / ... /

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muhsin KONUK
(Başkan)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Mehmet TEMEL
(Danışman)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Yüksel TERZİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nunGün
vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

Origanum sipyleum L.'UN FARKLI POPULASYONLARINDA GENETİK
VARYASYONUN MOLEKÜLER DÜZEYDE TESPİT EDİLMESİ

Volkan KALENDER

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Mehmet TEMEL

Türkiye endemiği olan *Origanum sipyleum* L. (Lamiaceae)'un 9 farklı popülasyonu 10 RAPD primeri ile taranmış ve elde edilen 84 lokustan 78'inin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Ortalama polimorfik lokus oranı %92.86'dır. Bu yüksek genetik çeşitliliğin bir göstergesidir. Beklenen heterozigotluk değeri genel ortalaması (0.23), gözlenen ortalama heterozigotluk değeri (0.31), bütün popülasyonlar ve lokuslar için ortalama allel sayısı (1.92) ve etkili allel sayısı (1.53) belirlenen diğer genetik çeşitlilik parametrelerindedir. Beklendiği gibi etkili allel sayısının gözlenen allel sayısından düşük olduğu gözlenmiştir. Coğrafik mesafe olarak birbirine yakın olan popülasyonların genetik benzerlik açısından birbirlerine yakın oldukları gözlenmiştir. Genetik ilişki dendogramının 3 ana kola ayrıldığı ve her bir ana kolun bir fitocoğrafik bölgeyi temsil ettiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, *Origanum sipyleum* popülasyonları arasındaki genetik varyasyonu tanımlamada RAPD tekniğinin başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

2006, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Origanum sipyleum* L., Endemik tür, RAPD, Lamiaceae, Genetik varyasyon

ABSTRACT

Ms.Sc

DETERMINATION OF VARIATION IN MOLECULAR LEVEL OF *Origanum sipyleum* L. AMONG THE DIFFERENT POPULATIONS

Volkan KALENDER

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural & Applied Science

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Mehmet TEMEL

Origanum sipyleum L. (Lamiaceae) endemic to the Turkey collected from 9 different populations were examined by using 10 random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and 78 loci out of 84 loci showed polymorphisms. The ratio of polymorphic loci was 92.86%. This is high levels of genetic variation. Mean value of expected heterozygosity (0.23), mean value of observed heterozygosity (0.31), mean allele frequencies for all populations and loci (1.92), and effective allele frequencies were 1.53. It was found that null allele frequencies was smaller than mean allele frequencies to have. The populations close to each other geographically had been observed low into genetic variability. A dendrogram of genetic relationship had divided 3 major clusters and each one of them had represented one of three phytogeographical regions of Turkey.

As a result of this study, it was determined that RAPD techniques can be used successfully in identifying genetic variations amongst populations of *Origanum sipyleum*.

2006, 178 pages

Key Words: *Origanum sipyleum* L., Endemic species, RAPD , Genetic variation

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	6
2.1 <i>Origanum sipyleum</i> 'un Ekolojik olarak incelenmesi	6
2.2. <i>Origanum sipyleum</i> 'un Ekonomik Önemi.....	6
2.3. Genetik Markörler.....	7
2.3.1. Hibridizasyon Temelli Polimorfizmler.....	8
2.3.2. PCR Temelli Polimorfizmler.....	9
2.4. DNA Markörleri İle Bitkilerde Yapılan Genetik Varyasyon Çalışmaları.....	12
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Bitki Materyali.....	17
3.2. Metot.....	18
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	18
3.3. RAPD Analizi.....	20
3.3.1. Primerler.....	20
3.3.2 Enzim.....	21
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	21
3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	22
3.3.5 İstatistiksel Analiz.....	23
4. BULGULAR	24
4.1. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	24
4.2. PCR Koşullarının Optimizasyonu.....	25
4.3. <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 Farklı Populasyonunda RAPD Analizi.....	25
4.3.1. <i>Origanum sipyleum</i> 'un Elektroforez Sonuçları.....	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
5.1. DNA İzolasyon Metodunun Belirlenmesi.....	37

5.2. RAPD Markör Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	37
KAYNAKLAR.....	41
TEŞEKKÜR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	49
EKLER.....	50
Ek 1. OPA 01 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	50
Ek 2. OPA 07 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	50
Ek 3. OPA 08 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	51
Ek 4. OPA 09 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	51
Ek 5. OPA 10 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	51
Ek 6. OPA 11 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	52
Ek 7. OPA 17 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	52
Ek 8. OPA 18 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	52
Ek 9. OPA 19 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	53
Ek 10. OPA 20 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
M	Molar
mM	Milimolar
rpm	Dakikadaki dönüş
µl	mikrolitre
nm	nanometre
g	gram
mg	Miligram
ng	nanogram
U	ünite
Dk	Dakika
T _m	Erime sıcaklığı
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
°C	santrigrad derece
kb	kilobaz
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
SSR	Simple sequence repeat
AFLP	Amlified fragment lenght polymorphism
SSCP	Single-Stranded Conformation Polymorphism
SA	DNA sekans analizi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
3.1	<i>Origanum sipyleum</i> örneklerinin toplandığı lokaliteler.....	17
4.1	<i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonuna ait genomik DNA örnekleri.....	24
4.2	OPA 01 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	26
4.3	OPA 07 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	26
4.4	OPA 08 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	27
4.5	OPA 09 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	27
4.6	OPA 10 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	28
4.7	OPA 11 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	28
4.8	OPA 17 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	29
4.9	OPA 18 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	29
4.10	OPA 19 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	30
4.11	OPA 20 Primeri ile elde edilen <i>Origanum sipyleum</i> 'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.....	30
4.12	<i>Origanum sipyleum</i> 'un farklı popülasyonları arasındaki benzerlikleri gösteren dendogram.....	36
5.1	Türkiye'nin Fitocoğrafik bölgeleri.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Kullanılan bitki materyali ve lokaliteleri.....	17
3.2 DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar.....	20
3.3 RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve sekansları.....	21
3.4 RAPD analizinde kullanılan bileşenler.....	22
3.5 RAPD analiz programı.....	22
3.6 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan maddeler.....	23
4.1 Çalışılan Populasyonlara Ait Gözlenen Ortalama Allel Sayısı (A), Ortalama Etkili Allel Sayısı (A_e), Polimorfik Lokus Oranı (P), Gözlenen Heterozigotluk (H_o) ve Beklenen Heterozigotluk (H_e) İle Standart Hataları...	34
4.2 Populasyon bireyleri arasındaki benzerlik oranları.....	35

1. GİRİŞ

Türkiye, coğrafik konum itibariyle Asya ve Avrupa arasında bir köprü konumundadır. Çeşitli iklimsel faktörlerin etkisi, topoğrafik ve jeolojik yapısı, çok değişik toprak tiplerinin bulunması ülkemizin çok zengin bir floraya sahip olmasına neden olmuştur. Türkiye İran-Turan, Akdeniz ve Avrupa-Sibirya gibi üç ayrı fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bir yerde bulunmaktadır. Anadolu'ya doğudan İran-Turan, güneyden Akdeniz ve kuzeyden Avrupa-Sibirya elementleri sokularak populasyonlar oluşturmaları bu zenginliğin başlıca nedenidir. Türkiye ayrıca çeşitli ekolojik etmenler, makro ve mikroklimalar nedeniyle çok sayıda cinsin gen merkezi durumunda olup, bununla ilgili olarak endemik taksonlar bakımından da çok zengin bir ülkedir (Davis 1982). Florasında 163 familyaya ilişkin 1225 cins ve 9000 tür bulunan ve bunlardan 3000 türü endemik nitelikte olan Türkiye'nin; 203 familyaya ait 2.500'ü endemik 12.000 türe sahip tüm Avrupa ülkeleri ile karşılaştırıldığında bitkisel gen kaynakları bakımından ne kadar zengin bir ülke konumunda olduğu kolaylıkla anlaşılır. Bu nedenle, genetik materyalin korunması ve kullanımına ilişkin çalışmaların Türkiye için ayrı bir önemi vardır (T. C. Çevre Bakanlığı 1999, İnternet verileri Ankara).

Dünyada 41 türüyle temsil edilen *Origanum* cinsi, Türkiye florasında ise 23 tür ve 5 türaltı takson ile temsil edilmektedir ve bunlardan 15 tür Türkiye için endemiktir. Türkiye birçok bitki türünde olduğu gibi *Origanum* L. cinsine ait çok sayıda türün dünyadaki en önemli gen merkezi konumundadır (Duman vd. 1995).

Türkiye için endemik bir bitki türü olan *Origanum sipyleum*, IUCN tarafından 1994'te oluşturulan "Red Data Book" kategorisine göre LR kategorisinde yer almaktadır. *Origanum sipyleum* populasyonlarının en az beş farklı lokalitede varlığı bilindiği için LR (Lower Risk) kategorisinde değerlendirilmektedir. Bazı etken maddelerinin fazlalığı nedeniyle tıbbi amaçlar doğrultusunda yaygın olarak kullanılması (Baytop 1994), yaşadığı habitatların (yaşama ortamlarının)

parçalara bölünmesi veya habitat kaybı, aşırı tüketim, toprak, su ve hava kirliliği, yabancı türlerin istilası, endüstriyel tarım ve ormancılıktaki gelişmeler ve bölgesel iklim değişimlerinin, Türkiye için endemik olan *Origanum sipyleum* türünü yakın gelecekte tehlike altına sokma riski bulunmaktadır (Işık vd. 1997).

Origanum L. cinsine ait çok sayıda bitki türü uçucu ve aromatik yağlar ve benzeri sekonder metabolitler nedeniyle çeşitli alanlarda ekonomik öneme sahip bitkilerdir. Ayrıca, solunum sistemi uyarıcısı, yara ve gastrik ülser tedavisi, karın ağrısı, soğuk algınlığı, antiromatizmal etki, baş ağrısı, kanser ve tümör tedavisi gibi birçok tıbbi özellikleri nedeni ile üzerinde çok çalışılmış bitkilerdir (Tabata vd. 1988, Boydağ 1996). Aynı zamanda *Origanum* L. cinsine ait bitki türlerinin etnobotanik açıdan halk tıbbında da yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Baytop 1984).

Düz kaslar üzerine gevşetici etkisi olduğu bilinen karvakrol etken maddesi *Origanum* türlerinde yüksek oranda (%74-80) bulunmaktadır. Terapötik indeksinin de oldukça geniş olması nedeniyle midevi, ağrı kesici ve sakinleştirici olarak da tedavide kullanılabilmesi rapor edilmiştir (Cingi vd. 1991). Örneğin, Orta ve Batı Anadolu'da halk arasında Bayırçayı ya da Güveyotu olarak bilinen, yüksek oranda karvakrol, timol ve p-simen içerdiği saptanmış olan *Origanum sipyleum*'un, mide ağrısı ve öksürük tedavisinde sıkça kullanıldığı bilinmektedir (Baser ve ark. 1992).

Geçmişte türlerde var olan genetik varyasyon, tipik olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler kullanılarak klasik yöntemlerle değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ancak morfolojik markörler çok uzun zamandır bilinmelerine rağmen, sayılarının az oluşu ve bu markörlerin çevreden etkilenebilmeleri nedeni ile genetik varyasyonu belirlemede yeterli olmamıştır (Yıldırım ve Kandemir 2001). Biyokimyasal parametrelerden birisi olan izoenzim analizi pratik ve bilgi verici olmasına rağmen düşük polimorfizm gösterdiği için genetik varyasyonu belirlemede çok fazla etkin olamadığından kullanımı sınırlı kalmıştır. Çünkü

varyasyonun, izoenzim seviyesinde olmaması ya da düşük seviyede belirlenmesinden dolayı bazen bitkilerde sınırlı değerlerde bulunabilmektedirler (Crawford vd. 1994). Bu da araştırmacıları DNA analiz tekniklerine yönlendirmiştir.

Son zamanlarda, morfolojik ve fenolojik varyasyonun asıl nedeni olan genetik varyasyonu tespit etmek için, son derece hassas DNA temelli teknikler geliştirilmiştir. Mikrosatellit ya da SSR (simple sequence repeat), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) ve AFLP (amplified fragment length polymorphism) teknikleri tür içi populasyon seviyesinde genetik varyasyon çalışmaları için moleküler markörler üretmede kullanılmaktadırlar (Wolfe ve Liston 1998).

RAPD ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (PCR: Polymerase Chain Reaction) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams vd. 1990). RAPD yönteminin temel prensibi tek bir (9-10 bp) oligonükleotidin (primer) ilgili olan türe ait genomik DNA'ya düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğalma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğalma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütölür ve çoğalma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Welsh ve McClelland 1990, Williams vd. 1990). RAPD tekniği özellikle, bitki türlerinin genetik akrabalıklarının belirlenmesi, sistematik tür problemlerinin çözölmesi, hibritlerin belirlenmesi, populasyonlar arası ve populasyon içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi gibi pek çok uygulamada başarıyla kullanılmaktadır (Özaydın 2004). RAPD metodu çok sayıda markörün meydana gelmesini sağlar. Uygulanışı basittir. Radyoaktivite veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. Yüksek miktarda DNA'ya ya da DNA sekansı hakkında ön bilgiye ihtiyaç yoktur. Bitki türlerinin populasyon yapısı ve genetik çeşitliliğini belirlemede bu markörlerin kullanılması son yıllarda, özellikle endemik ve tehlike altındaki türler için oldukça artmıştır (Rosetto vd. 1995).

Türlere ait genetik çeşitliliğinin ve yapının bilinmesi, gen kaynaklarının etkili korunması açısından önem taşımaktadır (Millar ve Marshall 1991). Çünkü genetik çeşitlilik çalışmaları, korumaya alınacak populasyonların seçiminde yol göstericidir. Bu tür çalışmaların eksikliği, gerek ıslah çalışmalarında gerekse gen kaynaklarını koruma çalışmalarında etkin bir yöntem ve program belirlemeyi güçleştirmektedir (Leding 1998).

İnsan nüfusunun ve ihtiyaçlarının sürekli artması nedeniyle, tahrip edilen doğal kaynaklarımızın genetik yapısı gittikçe daralmaktadır. Bundan dolayı, genetik çeşitliliğin korunması açısından; çeşitliliğin nedenleri, coğrafik değişkenlerle ilişkisi ve tür içindeki dağılımı önem kazanmaktadır (Mouna 1990).

Koruma altına alma çalışmalarının başlıca amacı, ekolojik olarak önemli türlerin yaşayan populasyonlarında, genetik varyasyon ve evrimsel gelişimin korunmasını sağlamak, dolayısıyla bu türlerin potansiyel olarak tükenişini engellemektir (Soule ve Simberloff 1986).

Genetik varyasyonun kaybı, hem kısa hem uzun vadede türün çevresel değişimlere ve demografik dalgalanmalara karşı mücadelesini ve dolayısıyla yaşamını sürdürme yeteneğini azaltacağı ve o türün ortadan kalkmasına yol açabileceği vurgulanmıştır (Ellstrand ve Elam 1993, Milligran vd. 1994). Aslında, tür içindeki yüksek ya da düşük seviyedeki genetik varyasyonu hangi etmenlerin meydana getirdiği belirsiz olmakla birlikte, en azından sürekli olarak genetik varyasyon seviyesinin devamının sağlanması, taksonun uzun dönem korunması için gerekli görülmektedir (Tansley ve Brown 2000).

İdealde, endemik bir türün korunmasına yönelik alınacak idari kararlarda, bu türün hayatını devam ettirmesini etkileyen, genetik varyasyon da olmak üzere diğer faktörlerin ve canlının biyolojisinin bilinmesi gereklidir. Çünkü tür içindeki genetik varyasyon; evrimsel güçler, türün üreme şekli gibi çok farklı ve karmaşık faktörlerin ve bunların etkileşimlerinin sonucu olarak ortaya çıktığından bilgi üretmeden karmaşık ve dinamik bir kaynağı yönetmek, biyolojik bir kaynaktan

optimum bir şekilde ve devamlılık prensipleri içinde yararlanmak olanaksızdır (Velioglu vd. 2002).

Literatür araştırması sonucu, *Origanum sipyleum* üzerine daha önceden yapılmış RAPD çalışmasının olmadığı görülmüştür. *Origanum sipyleum* doğada endemik olarak bulunan, sekonder metabolitler açısından oldukça zengin ve ekonomik önem taşıyan, drog olarak yararlanılan, etnobotanik açıdan halk tıbbında yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. Ayrıca, aşırı otlatmalara maruz kalan ve yaşadığı habitatları yıkıma uğratan ve bu gibi olaylar neticesinde populasyonları sürekli tahribata uğrayan bu ve bu çeşit endemik bitki türlerinin miktarları, yayılış alanları, genetik karakterizasyonu ve populasyonlar arasındaki genetik varyasyonu tespit edilmelidir. Bu çalışmada, Türkiye'nin 9 farklı lokalitesinden toplanmış endemik bir tür olan *Origanum sipyleum*'un genetik varyasyonunun, gen akışının, heterozigotluğunun ve polimorfizm oranlarının RAPD tekniği kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. *Origanum sipyleum*'un Ekolojik olarak incelenmesi

Özdemir vd. (1988), *Origanum sipyleum*'un kalkerli kayalar ve yamaçlarda, çam ormanları altında, maki içlerinde ve steplerde, zaman zaman organik maddelerce zengin ve 100-1500 metre yüksekliğe kadar yayılış gösterdiği, üzerinde yayılış gösterdiği toprakların fiziksel özellikleri bakımından nötr, tınlı-kumlu, kireç bakımından fakir, tuzsuz topraklar olduğu, kimyasal özellikleri açısından ise türün azotlu, organik madde bakımından çok zengin, fosforca zengin ve potasyum bakımından yetersiz topraklarda yetiştiğini belirtmişlerdir.

Temel (2000), *Origanum sipyleum*'un yetiştiği toprakların ortalama olarak su ile doymuşluk oranının %52.45 olarak ölçüldüğünü; pH değerinin ortalama olarak 7.11 olduğunu; fosfor ve potasyum içerikleri bakımından zengin, orta derece humuslu toprakları; Kalsiyum Karbonat (CaCO₃) bakımından orta derece kireçli toprakları; bünye sınıfı olarak ise kumlu-tınlı, tınlı-kumlu ve tınlı toprakları tercih ettiğini belirtmiştir.

O. sipyleum üzerine yapılan başka bir çalışmada ise bu bitkinin killi-tınlı veya tınlı bünyeli, kireç bakımından zengin, nötr veya az alkali, orta derece tuzlu, organik maddece çok humuslu, azot bakımından çok zengin, potasyumca fakir ve fosfor bakımından zengin topraklar üzerinde yetiştiği belirtilmiştir (Yücel ve Öztürk 1998).

2.2. *Origanum sipyleum*'un Ekonomik Önemi

Origanum türlerinin birçoğu içerdikleri uçucu yağ nedeniyle baharat bitkisi olarak, halk tıbbında gastrointestinal hastalıkların tedavisinde, bitkisel drogların yapımında, sabun, deterjan, esans, kozmetik ve parfümeri endüstrisinde, taze sürgünleri salata olarak, bitkilerin kurutulup çiçekli dal ve yaprakları ciğer salamı, sucuk ve peynir üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca içerdikleri uçucu yağların

sos, konserve, et ve diğler yiyecek maddelerine aroma vermek için bazı içkilerin üretiminde de kullanıldığı bildirilmektedir (Başer 1994, Tümen 1995).

Bazı *Origanum* türleri Türkiye’de ihracat amacıyla en çok toplanan bitkiler arasında yer almaktadır. Halk arasında bitkinin kurutulmuş çiçek ve yapraklı dalları kekik olarak kullanılmaktadır. Endemik olan *Origanum sipyleum*’un ticari ismi ise “Yabani Orman Şimşiri” olarak bilinir (Özhatay 1997).

Origanum türleri koku ve tatlarından dolayı aromatik bitkiler arasında yer alırlar. Halk arasında çay olarak ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılırlar. *Origanum* türlerinin uçucu yağlarının kimyasal bileşenlerinin analizi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Başer 1994, Tümen 1995). Bu çalışmalar sonucu, tüm uçucu yağların yaklaşık %70’ini oluşturan karvakrol, p-simen ve linalol gibi üç terpen bileşenin bulunduğ saptanmıştır (Tümen 1995). Benzer bir çalışmayı Başer vd. (1992), *Origanum sipyleum*’un uçucu yağlarının araştırılması üzerine yapmışlar ve 48 çeşit uçucu yağ bileşeni saptamışlardır. Bu bileşenlerden en fazla oranda karvakrol, timol ve p-simen’in bulunduğ unu tespit etmişlerdir.

2.3. Genetik Markörler

Genom analizi için işaret vazifesi gören genetik markörler, bir kromozomdaki spesifik bölgelerdir. Genetik markörler esasında morfolojik ve moleküler markörler olarak iki çeşittir (Lefebvre vd. 1995).

Morfolojik markörler, kalıtımı özelleşmiş biyokimyasal ya da moleküler teknikler olmaksızın görsel olarak gözlemlenebilir. Tek bir lokus tarafından kontrol edilen morfolojik özellikler, genetik markör olarak kullanılabilirler. Çevresel faktörlerin dışında böyle markörlerin ifadesi epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) ve pleiotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) etkileşimler tarafından dahi değiştirilebilir. Morfolojik markörlerin sayısı çok sınırlıdır. Onların alelleri birbirlerini dominant-resesif bir tavırda etkiler ve

böylece onu homozigot bireylerden, heterozigot bireyleri ayırt etmeyi mümkün kılar. Ayrıca morfolojik markörler çevre faktöründen etkilendikleri için bitkinin bütün gelişme devrelerinde kontrol edilememektedirler (Stuber 1992).

DNA seviyesinde polimorfizmi açıklayan markörler DNA markörleri olarak bilinir iken, protein seviyesinde polimorfizmi açıklayan markörler biyokimyasal markörler olarak bilinirler. Biyokimyasal markörler, alelleri saptamak için elektroforez tarafından ayrılabilen, gen ekspresyonunun bir sonucu olarak üretilmiş proteinlerdir. En sık kullanılan protein markörler aynı enzimlerin değişik formları olan izoenzimleridir. Kodominant markörler olarak protein markörler, gen sekansında ve işlevdeki farklılıkları açıklarlar. Bununla birlikte onların kullanımı, sınırlı sayıda olmaları nedeniyle azdır (Staub 1982).

DNA markörler polimorfizmi nasıl açıkladıklarına bağlı olarak iki kategoride sınıflandırılabilir: Hibridizasyon temelli polimorfizmler ve PCR-temelli polimorfizmler.

2.3.1. Hibridizasyon Temelli Polimorfizmler

Hibridizasyon temelli polimorfizmler; RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) ve VNTR (variable number tandem repeats)'ları kapsar (Weising 1998). VNTR, lokus durumundaki polimorfizm tekrarların sayısındaki farklılık nedeniyledir. RFLPs ise, traslokasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ya da nokta mutasyonlar gibi olaylar nedeniyle meydana gelirler.

DNA markörleri içerisinde ilk keşfedilen RFLP markörlerinin kullanıldığı çalışmalarda, restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan genomik DNA'lar, bu markörler ile hibridize edilerek kullanılmıştır. Kesim bölgelerindeki bir nükleotidin bile sebep olduğu mutasyonlardan dolayı bireyler arasında restriksiyon fragmentlerinin uzunluğundaki varyasyon bu teknikte saptanabilmektedir. Southern hibridizasyon metoduna dayalı bu teknikte, radyoaktif işaretli DNA markörleri ile restriksiyon fragmentlerinin hibridizasyonu

sonucu polimorfizm elde edilmektedir (Jones vd. 1997). DNA fragmentleri logaritmik olarak göç ettikleri için büyük fragmentlerdeki değişimleri tespit etmek, küçük fragmentlerdeki benzer boyut değişimlerini tespit etmekten daha zordur. RFLP analizi için çok fazla miktarda DNA ve ayrıca radyoizotop kullanımı gerektirmektedir (Dowling vd. 1996). Aynı boydaki DNA fragmentleri arasında tek bir baz çiftinde meydana gelen değişiklik sonucu oluşan polimorfizmi saptama yeteneğine sahip olan Denatürasyon Gradyent Jel Elektforezi (DGGE), RFLP analizi için alternatif bir yöntemdir (Lerman 1986). DGGE’de DNA fragmentleri, artan konsantrasyonlu poliakrilamid jel ihtiva eden denatürent gradyenti içerisinde elektroforez edilirler.

2.3.2. PCR Temelli Polimorfizmler

PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniği ile yüksek ısıda tek iplik formuna denatüre olmuş DNA moleküllerine ait belirli bölgelerin, ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri sayesinde milyonlarca kopyasının oluşturulması mümkün olmuştur (Halden vd. 1994). PCR reaksiyonunun üç basamağı (kalıp DNA ipliğinin denatürasyonu, primer bağlanması, enzimatik uzama) primerler tarafından belirtilen bölgelerin yüksek seviyede amplifikasyonunu sağlamak için birkaç kez tekrar edilir. PCR bileşenleri; DNA kalıbı, primer, dNTP, MgCl₂ ve yüksek sıcaklıklarda aktif olabilen *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen Taq polimeraz enzimi ve ona uygun bir tampon çözeltidir. PCR protokolü tekrarlanan 30-40 döngüden meydana gelmektedir. Hedeflenen DNA dizisi yaklaşık 2ⁿ sayıda çoğalmaktadır ve n; döngü sayısını ifade etmektedir (Saiki 1988).

PCR bazlı polimorfizmler, fragment ayrılması ve saptanması metoduna, PCR koşullarının zorluğuna, kullanılan primer tipine bağlı olarak, spesifik ya da rastgele olabilir. RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA=Random amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeat amplification or microsatellites; basit sekans tekrarları), AFLP (Amplified fragment length polymorphism; çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi), DAF (DNA

amplification fingerprint = DNA çoğaltılmış parmak izi), SSCP (single-stranded conformation polymorphism; tek iplik konformasyon polimorfizmi) ve SA (DNA sekans analizi) PCR'a dayalı DNA fingerprint metotlarının sadece bir kısmını oluşturmaktadır.

RAPD ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR'ı temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. RAPD yönteminin temel prensibi; ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğalma yapmasıdır. Tekniğin kullanılmasıyla elde edilen çoğalma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğalma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilebilir (Weising 1992). RAPD, genetik varyasyonun tespiti için yaygın olarak kullanılan bir PCR tekniğidir (Williams vd. 1990). RAPD tekniği özellikle populasyon çalışmaları için faydalıdır (Williams vd. 1990, Parker vd. 1998.). RAPD tekniği, alloenzim ve minisatellitlerde olduğu gibi seçilmiş fragmentler yerine bütün genomu inceler. bundan dolayı RAPD klonal ve genetik kimlikler hakkında tarafsız tahminler sağlar. Ayrıca iyileştirme stratejileri ve üreme programlarının geliştirilmesinde onlara yardımcı olur (Stewart ve Porter 1995). RAPD tekniği, teknoloji, iş gücü ve maliyette düşük gereksinimlere sahip olup, geniş kapsamlı uygulamalarından dolayı moleküler ekolojide büyük avantajlara sahiptir. Ayrıca radyoaktif madde kullanım zorunluluğu yoktur ve sadece az miktarlarda DNA ya gereksinim duyar (Fischer vd. 2000).

SSR polimorfizmi genom analizi için etkili diğer bir araçtır. Burada özel bir basit sekans tekrarına terminal olarak bağlanmış spesifik primer, karşılıklı gelmiş aynı tip iki basit sekans tekrarı arasındaki DNA'yı amplifiye için kullanılır (Zietkiewicz vd. 1994). Mikrosatellitler, çoğu bitki türündeki genetik varyasyon çalışmaları için çok iyi markör oluştururlar. Yüksek polimorfizm göstermeleri, bol miktarda bulunmaları ve kodominant markör olmalarından dolayı, türler arasındaki genetik varyasyonu değerlendirmek açısından oldukça uygundur (Gupta vd. 1996).

AFLP genomik DNA parmak izi için geliştirilmiş bir tekniktir. Bu teknikle, rastgele seçilen primer sekanslarına benzer uçlar ile sadece fragmentler çoğaltılmaktadır. Bir AFLP reaksiyonunda oluşturulan bantların sayısı amplifikasyon primerinin değişken parçasındaki bazların sayısı ile tespit edilmektedir (Vos vd. 1995). Ayrıca bu teknik, PCR amplifikasyonu ve restriksiyon enzim kesim işlemlerinin bir kombinasyonu olup bu iki tekniğin avantajlarına sahiptir. AFLP analizi oldukça yüksek kararlılığı ve hassaslığı dolayısıyla genetik varyasyon çalışmaları için uygun bir teknik olduğu düşünülmektedir (Mueller ve Wolfenbarger 1999).

DAF, RAPD teknolojisindeki yeni gelişmeler sonucu ortaya çıkarılmış bir tekniktir. DAF uygulama protokolü açısından RAPD ile benzerlikler göstermektedir (Kolchinsky vd. 1993). DAF'ı RAPD'den ayıran farklılıklar; protokolda kullanılan primerler, primer bağlanma dereceleri ve tekniğin güvenilirlik oranıdır (Prabhu ve Gresshoff 1994). Genomik DNA'nın kısa parçalarını çoğaltmak ve çoğaltılmış DNA ürünleri oluşturmak için, rastgele seçilmiş kısa (yaklaşık 5 baz çifti) oligonükleotid primerlere bağlanan ısıya dayanıklı DNA polimeraz kullanır. Bu ürünlerin poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyama ile analizi mümkündür. Ayrıca DAF yöntemi hızlı ve genetik karakterizasyon için duyarlı bir tekniktir (Caetano-Anolles vd. 1991).

SSCP (Single-Stranded Conformation Polymorphism) analizi denatüre olmayan şartlar altındaki spesifik sekans bazlı ikincil yapılara sahip tek iplik DNA molekülü prensibine dayanmaktadır. Bir veya birkaç baz farklılığı ile moleküller, farklı jel hareketleriyle sonuçlanan konformasyonlar oluşturabilirler (Jordan vd. 1998). Metot uygulama açısından çabuk ve basittir. Bu teknik çeşitlilik çalışmalarında kodominant nDNA fragmentlerinin ve DNA polimorfizminin tanımlanması için büyük bir potansiyele sahiptir (Bodénés vd. 1996). Bununla birlikte genetik hipotezi doğrulamak için segregasyon oranlarını test etmek gerekmektedir. Ayrıca yöntem hem sekans kompozisyonu hem de sekans için duyarlıdır (Jordan vd. 1998).

SA, diğ er moleküler metotlardaki gibi indirekt de ğ il doğ rudan nükleotid varyasyon bilgisi sa ğ lamaktadır. Bu metot, DNA sekans bilgisi istememesiyle birçok taksonun sekansını mümkün kılan üniversal sekans primerler gerektirir ve ç alış malar sırasında hızlı ve kolayca karşı laş tırılabilen ç ok kaliteli bilgiler sa ğ lamaktadır (Baldwin 1992, Demesure vd. 1995). Bununla birlikte bu metot, genel ç eşitlilik ç alış maları için pahalıdır, yo ğ un emek gerektirir ve lokuslar bir kez görü ntülenebilir.

2.4. DNA Markörleri İ le Bitkilerde Yapılan Genetik Varyasyon Ç alış maları

Fisher vd. (2000), Bir gö l kıyısı bitkisi olan *Ranunculus reptans* bitkisinin Avrupa'nın prealpin bölgesindeki popülasyonlarının büyü klü ğ ü ve sayısının, gö lün su seviyesinin azalmasından dolayı azaldı ğ ını belirtmiş ler ve bu türün de ğ iş ik büyü klükteki 17 popülasyonu arasındaki ve içindeki genetik varyasyonu RAPD tekni ğ i kullanarak tespit etmiş lerdir. Yaptıkları araç tırma sonucu, büyük popülasyonların küçük popülasyonlara göre daha fazla genetik varyasyon gösterdi ğ ini saptamış lardır. Ayrıca popülasyonlar arası gen akış ının ç ok sınırlı oldu ğ unu ve genetik sürüklenme sonucu özellikle küçük popülasyonlarda genetik farklılı ğ ın azaldı ğ ını belirtmiş lerdir. Bu veriler doğ rultusunda önlem olarak, genetik ç eşitlili ğ in korunması için ufak ve büyük boyutlardaki popülasyonların devam etmesi ve ufak popülasyon boyutlarının artması gereklili ğ i vurgulanmış tır.

Esselman vd. (2000), Juan Fernandez adalarına öz ğ ü endemik bir genus olan *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae) türleri arasındaki ve içindeki genetik farklılı ğ ı tespit etmek için RAPD markörleri kullanmış lardır. Tür içindeki RAPD bant farklılı ğ ı 0,022-0,003 arasında sıralanırken, total farklılı ğ ın %90'ı türler arasında göz lenmiş tir. Elde edilen RAPD sonuçları önceki allozyme ç alış maları ile karşı laş tırılmış tir. Bazı türler için RAPD farklılı ğ ı ile allozym'in iliş ki seviyesinin benzer oldu ğ u bulunurken, tüm türler açısından önemli bir korelasyon olmadığı göz lenlenmiş tir. RAPD bantlarından geliştirilen benzerlik iliş kisi ile morfoloji, cpDNA ve ITS'den elde edilen sonuçların birbirlerine benzer olduklarını bulmuş lardır.

Ayres vd. (1999), Sierra Nevada bölgesinde endemik bir tür olan *Wyethia reticulata*'nın populasyon büyüklüğünü, genetik varyasyonunu ve genetik yapısını araştırmak için RAPD tekniğini kullanmışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda sınırlı gen akışının, ufak populasyonlar içindeki genetik sürüklenmenin ve geniş kolonilerin eşeyssel üreme baskınlığının, bu türlerde populasyonların genetik farklılığına yol açtığı bulunmuştur. Ayrıca populasyon dışı çiftleşmeler ve kolonilerin uzun ömürlü olması faktörleriyle genetik farklılığın sürdürüldüğü gözlemlenmiştir.

Tansley ve Brown (2000), nadir ve endemik bir tür olan *Leucadendron elimense* (Proteceae)'nin 3 nadir alt türünün genetik varyasyonunu RAPD tekniğini kullanarak ölçmüşlerdir. Küçük populasyon boyutlarına ve kısıtlanmış yayılma alanlarına rağmen türün çalışılan populasyonlarında genetik varyasyonun yüksek seviyelerde olduğunu gözlemlenmiştir. Yapılan moleküler varyans analizleri sonucu en fazla genetik varyasyonun populasyonlar arasındaki bireyler arasında olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, bu bitki gurubunun küçük rezervlerde minimum idari çaba ve oldukça az parasal harcamalarla korunma altına alınabileceği önerilmiştir.

Martin ve Bermejo (2000), Güney ispanyada bulunan endemik ve tehlike altında olan *Rosmarinus tomentosus* bitkisi üzerinde çalışmışlar ve bu tür içindeki genetik varyasyonun değerlendirilmesi için RAPD tekniğini kullanmışlardır. Elde edilen veriler AMOVA istatistiksel programı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, türün populasyonlarının genetik yapısı ve populasyonlar arası genetik uzaklıklar hakkında bilgi vermiştir.

Sales vd. (2001), Baleric adalarına özgü endemik bir tür olan *Digitalis minor*'un 17 populasyonundan 162 bireydeki genetik farklılığı RAPD tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen matriks verilerinin değerlendirilmesi için AMOVA istatistiksel programı kullanılmıştır. Analiz sonucu populasyonlar arasındaki

varyasyonun düşük değerlerde olduğu ve adalar arasında da genetik farklılığın önemli bir şekilde bölümlenmediği gözlenmiştir.

Jordano ve Godoy (2000), *Prunus mahaleb* (Rosaceae)'un 7 popülasyonu arasındaki genetik varyasyonu araştırmak için RAPD tekniğini kullanmışlardır. Coğrafik uzaklık ve yükselti farklılıklarının yaklaşık 100 km²'lik bir alana yayılmış olarak bulunan bu 7 popülasyonun genetik yapısına nasıl bir etkide bulunabileceği araştırılmıştır. Hem coğrafik hem de yükselti farklılığının bu bitkinin meyve ve çiçek oluşumunda etken faktörler olduğu ve böylece bu türün popülasyonları arasında izolasyona sebep olduğu bildirilmiştir.

Gounaris vd. (2001), Crete adasındaki hibrit varsayılan *Origanum x intercedens* ile onun ebeveyn genotipleri olan *Origanum onites* ve *Origanum vulgare*'nin genetik akrabalıkları ve esansiyel yağlarının karşılaştırılması üzerine bir çalışma yapmışlardır. Rastgele toplanan örnekler, esansiyel yağ bileşenlerinin analizi ve RAPD tekniği ile parmak izi oluşturulması için kullanılmıştır. RAPD tekniğinin ister tek başına, ister esansiyel yağ bileşenleriyle birlikte kullanılmasıyla, doğal popülasyonlardaki hibrit bitkilerin ve atasal iki taksonun genetik teşhisi için güvenilir bir araç olduğunu saptamışlardır.

Skoula vd. (1998), Crete adasındaki bulunan *Salvia fruticosa*'nın farklı kolonileri arasındaki genetik farklılığın, RAPD markırları kullanılarak değerlendirilmesi ve esansiyel yağ içeriklerinin karşılaştırılması üzerine bir çalışma yapmışlardır. 3 farklı popülasyonu temsil eden 48 koloni, RAPD markırları kullanılarak genetik profilleri ve esansiyel yağ içerikleri analiz edilmiştir. Yapılan araştırmada bu türün genetik farklılığının hesaplanması ve bunun esansiyel yağ profilleri ile ilişkisinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Velioğlu vd. (2002), Türkiye'deki doğal karaçam (*Pinus nigra*) popülasyonlarında bulunan genetik çeşitliliğin ne kadarının ormancılık etkinlikleriyle yeni tesis edilen veya edilecek karaçam ormanlarına aktarılabildiğinin moleküler belirteçler yardımıyla araştırılması üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada,

her populasyondan 25'er ağaçtan açık tozlaşma ürünü tohum toplanmıştır ve tohumların megagametofit dokularından elde edilen DNA'lar 11 RAPD primeriyle taranmıştır. F istatistiği sonuçlarına göre toplam genetik çeşitliliğin %94'ü populasyonlar içerisinde, kalan %6'sının populasyonlar arasında olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışılan karaçam tohum kaynaklarında yüksek genetik çeşitlilik tespit edilmiştir.

Tan vd. (2005), geniş yayılım gösteren bir Mangrove (Hindistansakızağacı) türü olan *Ceriops decantra*'nın populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğin tespit edilmesi için ISSR (inter- simple sequence repeat) tekniğini kullanmışlardır. 10 doğal populasyondan toplanan örnekler, tür seviyesinde yüksek genetik varyasyon göstermişlerdir. Populasyonlar coğrafik bölgelere göre guruplandırıldığında toplam varyasyonun %87'sini bölgeler arası farklılık, %4'ünü populasyonlar arası varyasyon ve %9'unu ise populasyon içindeki bireyler arası varyasyon oluşturmuştur. Bu çalışma sonucu genetik yapı hakkında elde edilen bilgiler bu türün korunması ve yönetim anlayışı için bir bilgi birikimi oluşturmaktadır.

Wang vd. (1996), *Amentotaxus formosana* türünün dar yayılım gösteren populasyonlarındaki genetik varyasyonun araştırılması için izoenzim analizi ve RAPD yöntemini kullanmışlardır. İki populasyon arasında, kullanılan izoenzimler bakımından genetik uzaklık olmadığı bulunmuştur. Kullanılan 20 primer bakımından yüksek oranda monomorfik RAPD fragmentleri olduğu gözlenmiştir. Bu iki populasyon arasında yüksek benzerlik (0,994) olduğu bulunmuştur. RAPD markörler, izoenzim analizi ile elde edilen düşük genetik varyasyon seviyesini doğrulamıştır.

Swensen vd. (1995), tehlike altındaki endemik bir tür olan *Malacothamnus fasciculatus var nesioticus*'un genetik çeşitliliğini belirlemek için ribozomal DNA analizi, RAPD ve İzoenzim analizini kullanmışlardır. Amplifiye olmuş DNA profillerinin analizi ve elektroforetik datalar, bu varyetenin tür içindeki diğer varyetelerden belirgin bir biçimde farklı olduğunu ortaya koymuştur. Ribozomal

DNA analizi ile bu varyetenin bir popülasyonu içinde birbirleriyle yakından ilişkili üç genotipin varlığı ortaya koyulurken, izoenzim analizi ve RAPD analizi ile popülasyonların bireyleri arasında yakın ilişkili üç genotipin varlığı tespit edilememiştir. Bu sonuçların, türün uzun dönem koruma altına alınması çalışmalarında bir alt yapı oluşturacağı vurgulanmaktadır.

Schiliro vd. (2001), *Pyrus* türlerindeki genetik varyasyonu belirlemek için RAPD tekniğinin kullanılması üzerine araştırmalar yapmışlardır. Çalışmada esas olarak, standart *Pyrus* kültürleri arasındaki genetik farklılıkları teşhis etmede farklı RAPD koşulları uygulanmıştır. Genotip-spesifik markör değerlendirmesini yapmak için 10 bp uzunluğunda 30 primer ile 11 bp uzunluğunda iki primer, ayrıca 36-45°C aralığında bağlanma sıcaklığı ve bunun yanında iki farklı marka Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Sonuç olarak RAPD analizinin *Pyrus* kültürlerini ayırt etmede güvenilir ve ucuz bir teknik olduğu belirlenmiştir.

Chen vd. (2005), Tibet platosuna özgü endemik bir tür olan *Coelonema draboides* (Brassicaceae) deki genetik varyasyonu tespit etmek için RAPD tekniğini kullanmışlardır. Bu çalışmada toplam 30 popülasyondan 90 örnek toplamışlardır. Kullanılan 14 RAPD primerin toplam 186 amplifiye olmuş bant verdiği gözlemlenmiştir. Bu bantlardan 161 tanesinin (%87) polimorfik bant olduğu gözlemlenmiştir. AMOVA analizi sonucu popülasyonlar içindeki bireyler arasındaki genetik varyasyonun %84.2 oranında, popülasyonlar arasında ise bu oranın %15.8 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak RAPD tekniğinin endemik ve nadir türlerin popülasyonları arasındaki genetik varyasyonu tespit etmede faydalı bir teknik olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca bu türdeki genetik varyasyonun yüksek değerlerde olmasının, değişken çevre koşullarına daha kolay adapte olabileceğinin bir göstergesi olduğu belirtilmiştir.

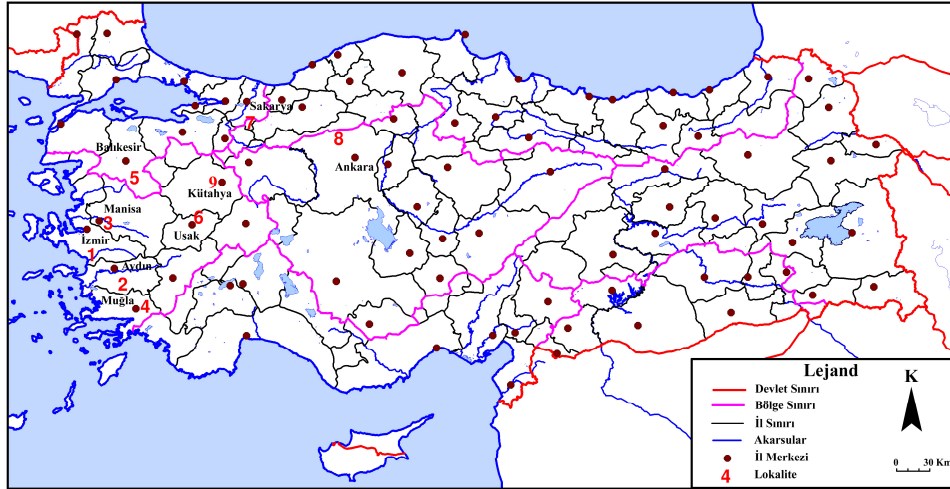
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Bu araştırmada farklı populyasyonlardan taze olarak toplanan *Origanum sipyleum* örnekleri materyal olarak seçilmiştir. Taze olarak toplanan bu örneklere ait lokaliteler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan bitki materyali ve lokaliteleri

Bitki materyali	Materyal sıra no	Toplandığı Bölge	Lokalite
<i>O. sipyleum</i>	1	İzmir	Efes, Meryemana 2. km
"	2	Aydın	Yatağan Çine yolu, Kavaklıdere mevki, 2. km
"	3	Manisa	Manisa, Spil Dağı
"	4	Muğla	Muğla-Kale yolu 30. km
"	5	Balıkesir	Balıkesir, Bigadiç, Bademli Köyü
"	6	Uşak	Gediz Uşak karayolu 30. km
"	7	Bolu	Taraklı Gölpazarı karayolu 10. km
"	8	Ankara	Ankara, Çeltikçi Köyü
"	9	Kütahya	Kütahya, Çamlıca Tepesi



Şekil 3.1. *Origanum sipyleum* örneklerinin toplandığı lokaliteler

3.2. Metot

3.2.1. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan genomik DNA, Khanuja ve ark. (1999) tarafından önerilen CTAB-DNA izolasyon metodunun modifiye edilmesi ile ekstrakte edildi. Toplam 0,1 g olarak tartılan yapraklar, içerisine sıvı azot konmuş steril havanda ezilerek toz haline getirildi. Bu aşama hücre duvarının mekaniksel ve fiziksel olarak parçalanması işlemini içerir. İyice öğütülmüş-donmuş haldeki bitki örneği önceden soğutulmuş bir spatula ile 1,5 mL'lik steril bir eppendorf tüpe transfer edildi. Daha sonrasında her tüpe daha önceden 60 C° de ön ısıtmaya tabi tutulmuş 600 µL ekstraksiyon tamponu (Çizelge 3.2.) eklendi ve dikkatlice ters yüz edilerek karıştırıldı. Daha sonra örnekler 60 C° de su banyosunda 1-2 saat bekletildi ve bu süre zarfında her 5 dakikada bir örnekler yine ters düz edilerek karıştırıldı. Bu aşamada ise DNA izolasyon tamponunda bulunan EDTA, NaCl, CTAB gibi kimyasal maddelerle hücre zarının kimyasal olarak zayıflatılıp parçalanması amaçlanmaktadır. İnkübasyon sonrası oda sıcaklığında 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra örneklerin sıvı kısmı (süpernatant) dikkatlice steril bir eppendorfa dökülerek alındı. Transfer işleminden sonra tüplere 600 µL Kloroform : İzomilalkol (24:1) (Çizelge 3.2.) ilave edildi ve yaklaşık 15 dk ters yüz edilerek hafifçe karıştırıldı. Bu işlemi takiben örnekler, 8000 rpm' de 10 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi. Buradaki amaç, CTAB-protein/polisakkarid komplekslerinin uzaklaştırılmasıdır. Bu işlem sonunda tüplerde, en üstte süpernatantta çözülmüş halde DNA, ortada hücresel proteinlerden oluşan beyaz katman ve en altta kloroform olmak üzere üç katman vardır. Santrifüj sonrası mikro-pipet yardımıyla dikkatlice süpernatant (üst faz) çekilerek steril bir eppendorf tüpe aktarıldı. Kloroform:izoamil alkol ekstraksiyonu her örnek için iki defa tekrarlandı. Steril bir eppendorfa aktarılan süpernatanta, 5 M stok NaCl (Çizelge 3.2.) çözeltisinden son konsantrasyon 1,5 M olacak şekilde NaCl eklendi ve hafifçe karıştırıldı (vorteksleme yapılmadan). Daha sonra soğuk izopropanol son hacim % 60 olacak şekilde örneğe eklendi. İzopropanol DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrılmasını sağladı. İzopropanol eklendikten sonra tüpler hafif bir şekilde ters-düz edildi. Bu aşamada tel tel iplikçik halinde ve beyaz renkli

bir kütle kümelenmesi gözlemlendi. Daha sonra karışım oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda tüpler 3000 rpm'de 3 dk ve 5000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Bu farklı rpm'deki santrifüjleme DNA'nın santrifüj tüpü dibine yığılmasını sağlandı. Santrifüjleme işlemi sonrasında elde edilen süpernatant döküldü ve sonra pellet % 80 etanol ile yıkandı. Yıkama solüsyonu döküldükten sonra, ependorf tüpler ağzı açık kalacak şekilde oda sıcaklığında kısa bir süre kurumaya bırakıldı. Son aşama olarak etanolü uzaklaştırılan pellet DNA, 200 µL TE tampon çözelti (Çizelge 3.2.) içinde çözüldü. RNA'yı uzaklaştırmak için her 100 µL DNA solüsyonuna karşılık 1µL RNaz A kullanıldı ve 15 dakika 37 C^o'de bekletildi. DNA'lar daha sonra -20 C^o'de saklandı.

DNA saflığı, A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak tespit edildi. DNA örnekleri TE tamponunda çözüldüğü için çalışmada kör olarak TE tamponu kullanıldı. 100 ve 150 µl DNA örnekleri TE tampon ile 3 ml'ye tamamlandı ve 260 ve 280 nm'de spektrofotometre cihazında ölçümleri yapıldı. Çift zincirli DNA miktarının tayini spektrofotometrede (Jenway 6305) yapıldı ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma Oranı} \times \text{Katsayı (50)}$$

Hesaplanan DNA miktarlarına göre PCR analizi için µl'de 5 ng olacak şekilde tüm DNA'lar TE tamponu ile seyreltildi.

Çizelge 3.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

Solüsyon Adı	İçeriği	Konsantrasyonu
Ekstraksiyon Tamponu	EDTA Tris-HCl NaCl CTAB β -merkapto etanol PVP	25 mM 100 mM 1.5 NaCl %2.5 (w/v) %0.2 %1
Kloroform:İzoamilalkol	Kloroform İzoamilalkol	24:1 (v/v)
NaCl	Sodyum Klor	5 M
TE Tamponu	Tris-HCl EDTA	10 mM 1 mM

3.3. RAPD Analizi

10 farklı popülasyonu temsil eden *Origanum sipyleum* örneklerinin yapraklarından Çizelge 3.2'deki solüsyonların kullanılması ile izole edilen genomik DNA'lar, RAPD yöntemi ile rastgele seçilmiş 10 bazlık 10 farklı primerin kullanılmasıyla DNA'nın rastgele bölgeleri çoğaltılarak örneklerin genomik parmak izleri çıkartılmış ve incelenmiştir.

3.3.1. Primerler

Bu çalışmada kullanılan 10 nükleotid uzunluğundaki 10 farklı primer QiagenTM, den temin edilmiştir. Ana stoklar, -20°C'de saklanmıştır. RAPD-PCR çalışmasında kullanılan primerler ve nükleotid dizileri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve sekansları

Primer Adı	% G+C	Primer Dizisi
OPA01	70	CAGGCCCTTC
OPA07	60	GAAACGGGTG
OPA08	60	GTGACGTAGG
OPA09	70	GGGTAACGCC
OPA10	60	GTGATCGCAG
OPA11	60	CAATCGCCGT
OPA17	60	GACCGCTTGT
OPA18	60	AGGTGACCGT
OPA19	60	CAAACGTCGG
OPA20	60	GTTGCGATCC

3.3.2 Enzim

PCR'da kullanılan bileşenlerden birisi olan enzim, *Thermus aquaticus* adı verilen termofilik bir bakteriden izole edilmektedir ve ısıya dayanıklı bir enzimdir. Bu çalışmada kullanılan Taq DNA polimeraz enzimi SigmaTM'den temin edilmiştir. Bu enzim -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR'da 200 µl'lik mikro tüpler kullanıldı. Reaksiyon hacmi 25 µl'dir. Çizelge 3.4. deki bileşenler sırasıyla tüplere konuldu.

Çizelge 3.4. RAPD analizinde kullanılan bileşenler

PCR Reaksiyon Bileşenleri	Miktarları
PCR Tampon (MgCL ₂ ihtiva eden)	2,5 µl
Primer	1 µl
dNTP Karışımı	5 µl
Genomik DNA (30 ng)	6 µl
Bidistile Su	10.3 µl
Taq DNA polimeraz (1U)	0.2 µl
Toplam Hacim	25 µl

RAPD için Termalsaykırda (FTGENE2U) program ayarlandı (Çizelge 3.5.). PCR ürünü, sırasıyla tabloda yer alan işlemlere tabi tutuldu.

Çizelge 3.5. RAPD analiz programı

Sıcaklık	Süre	İşlem	Döngü Sayısı
94°C	2 dk	Denatürasyon	-
94 °C	1 dk	Denatürasyon	44 Döngü
36 °C	1 dk	Annealing	
72 °C	1 dk	Polimerizasyon	
72 °C	8 dk	Son uzatma basamağı	-
4 °C	5 dk	Stabilizasyon	-

3.3.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi

PCR ürünlerinin kullanılan primerler vasıtasıyla çoğalıp çoğalmadığını saptamak için % 0.8'lik deneme jeli hazırlandı. Ayrıca kullanılan primerlerle çoğaldığı görülen RAPD bantlarını ayırmak için ise %1.5'lik agaroz jel hazırlandı. %1.5'lik agaroz jel hazırlamak için 1.5 gr agaroz tartıldı ve 100 ml TBE buffer eklendi.

Daha sonra karışım mikro dalga fırında yaklaşık olarak 5 dakika bekletilerek eritildi. Tamponun sıcaklığının 50-55°C'ye düşmesi beklendi ve sonrasında sıvı haldeki tampon elektroforez jel tankına döküldü. Yaklaşık olarak 30 dakika sonra donan jel, 150 ml TBE tampon içerisinde 10 mg/ml stok etidyum bromür boyama çözeltisinden 7.5 µl eklenerek 15 dakika süreyle boyandı. Boyama işlemi bitiminde jeller 15 dakika bidistile su ile yıkandı. Son olarak jeller UV görüntüleme cihazına konularak PCR sonucu oluşan bantlar Finepix S7000 marka dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı.

Çizelge 3.6. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan maddeler

Kullanılan Kimyasal Adı	İçeriği	Konsantrasyonu
Tris-Borikasit-EDTA Tamponu (10X)	Tris-HCL	107.8 gr
	Borik Asit	55 gr
	EDTA (0.5 M)	7.4 gr
Bromfenol Mavisi (20 ml)	Bromfenol	0.05 gr
	Sukroz	8 gr
	Distile Su	11.95 ml
Etidyum bromür (10mg/ml)	Etidyum bromür	0.1 gr
	Distile su	10 ml

3.3.5 İstatistiksel Analiz

Jel fotoğraflarından yararlanılarak markör sonuç tabloları hazırlandı. Tablolar üzerinde markörün varlığı "1", yokluğu "0" ile gösterildi. Bantların moleküler boyutları UVI TEC UVI PHOTO. MW Electrophoresis Gel Analysis yazılımı kullanılarak tespit edildi. Veriler tamamlandıktan sonra, istatistiksel analiz programlarında değerlendirilmek üzere elektronik ortama aktarıldı. Etkili allel sayısı (A_e) ve gözlenen (A) allel sayısı, beklenen heterozigotluk (H_e) ve gözlenen heterozigotluk (H_o), Shannon sabiti (I) ve Polimorfik lokus oranları (P), populasyonlar arasındaki benzerlik oranları POPGENE-Microsoft Window-based for Population Genetics Anaysis, Version 1.31 programı kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Bu çalışmada uygulanan DNA izolasyon metodu, Khanuja vd. (1999) tarafından önerilen CTAB-DNA izolasyon metodunun başarılı bir şekilde modifiye edilmiş halidir. İzole edilen DNA'ların miktar tayinleri, Jenway 6305 spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra PCR'da kullanılacak olan DNA miktarlarına uygun olarak, izole edilen DNA'lar uygun oranlarda sulandırılmıştır. Çalışma sonucu izole edilen genomik DNA fotoğrafları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonuna ait genomik DNA örnekleri.

1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya

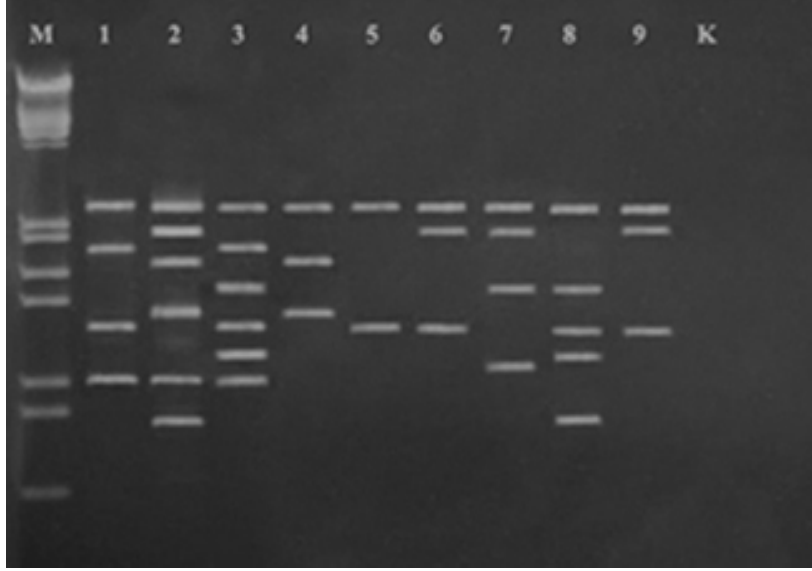
4.2. PCR Koşullarının Optimizasyonu

PCR analizinde kullanılan DNA miktarı, primer miktarı, Taq polimeraz enzim miktarı ve PCR döngü şartlarında optimizasyonlar yapılmıştır. Yapılan optimizasyon işlemleri sonucu; DNA miktarı 30 ng, primer miktarı 12 ng, enzim miktarı 1 ünite olduğunda en iyi amplifikasyonun sağlandığı gözlenmiştir. PCR döngü şartlarında yapılan değişiklikler sonucu, 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyon, sonrasında 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 36°C'de 1 dakika annealing ve 72°C'de 1 dakika polimerizasyon işlemlerini içeren 44 döngülük bir aşamanın ve son olarak 72°C'de 8 dakikalık bir son uzatma işleminin en iyi amplifikasyonu sağladığı gözlenmiştir.

4.3. *Origanum sipyleum*'un 9 Farklı Populasyonunda RAPD Analizi

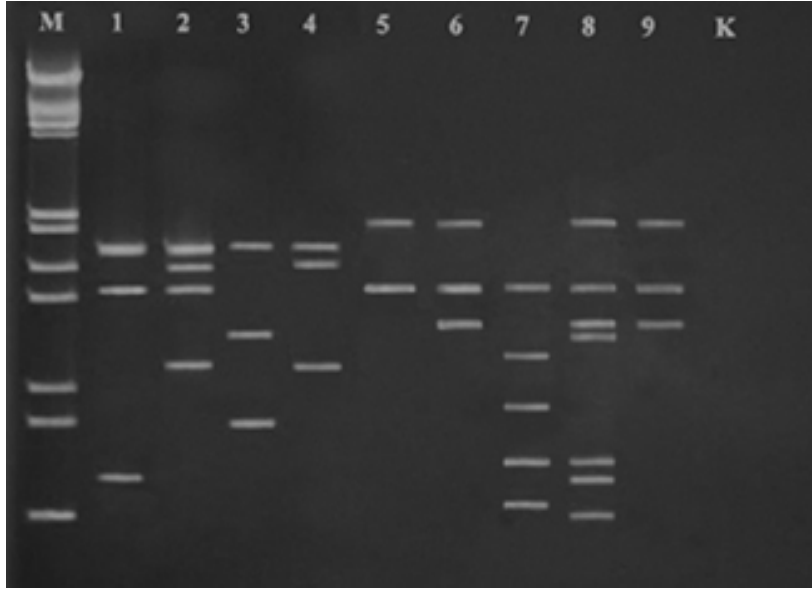
Bu çalışmada Operon teknolojisi ile üretilmiş 16 farklı primer (OPA 01, OPA 02, OPA 06, OPA 07, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA 11, OPA 12, OPA 14, OPA 15, OPA 16, OPA 17, OPA 18, OPA 19, OPA 20) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile RAPD analizi yapıldı. Kullanılan 16 primerin 6 primeri (OPA 02, OPA 06, OPA 12, OPA 14, OPA 15, OPA 16) ile amplifikasyon sağlanamamıştır. Çalışma sonucunda farklı bant profilleri elde edilmiş olup, elde edilen jel fotoğrafları Şekil 4.2-4.11'de verilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bant profillerinin Jel Analiz programı (UVI TEC UVI PHOTO. MV) ile değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler Ekler bölümünde verilmiştir.

4.3.1. *Origanum sipyleum*'un Elektroforez Sonuçları



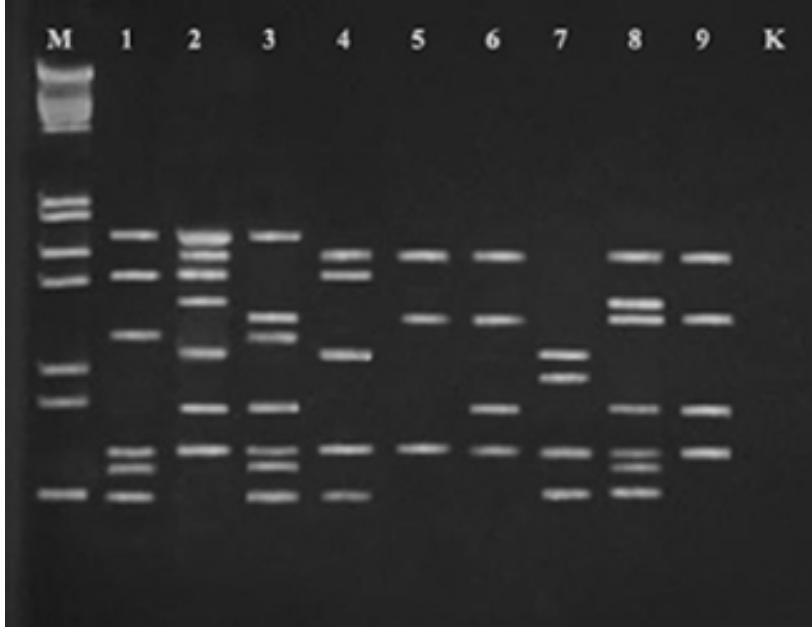
Şekil 4.2. OPA 01 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



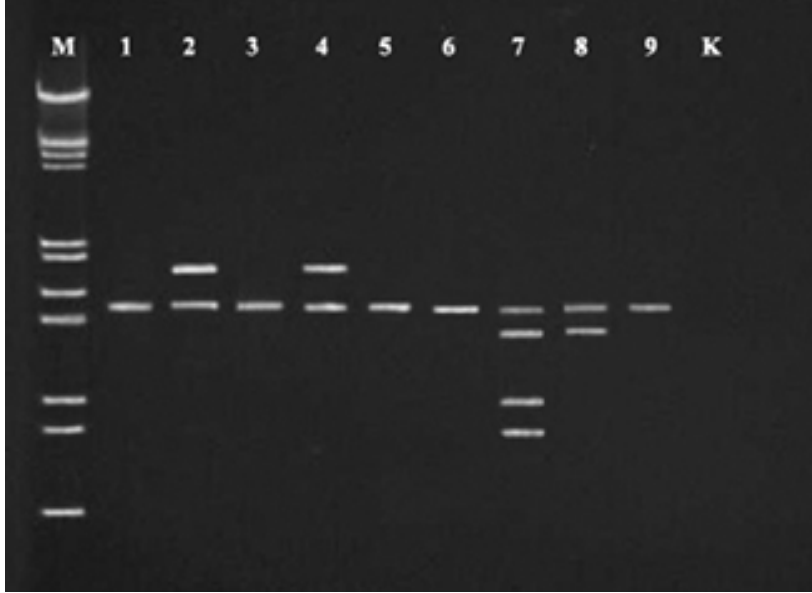
Şekil 4.3. OPA 07 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



Şekil 4.4. OPA 08 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



Şekil 4.5. OPA 09 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



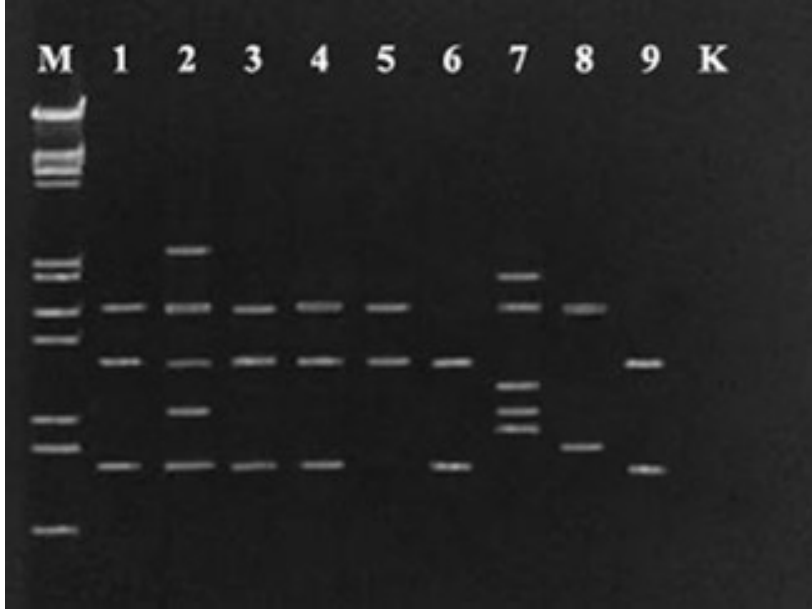
Şekil 4.6. OPA 10 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



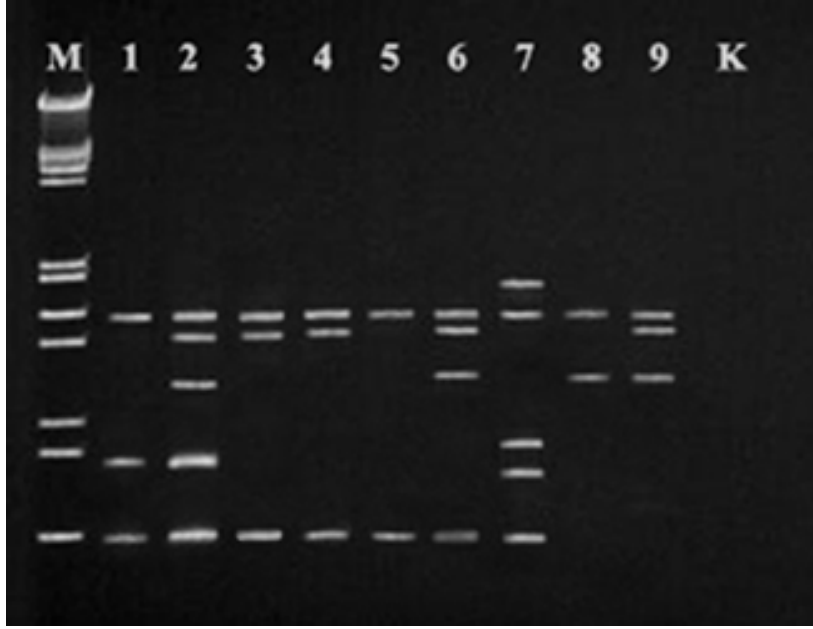
Şekil 4.7. OPA 11 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



Şekil 4.8. OPA 17 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



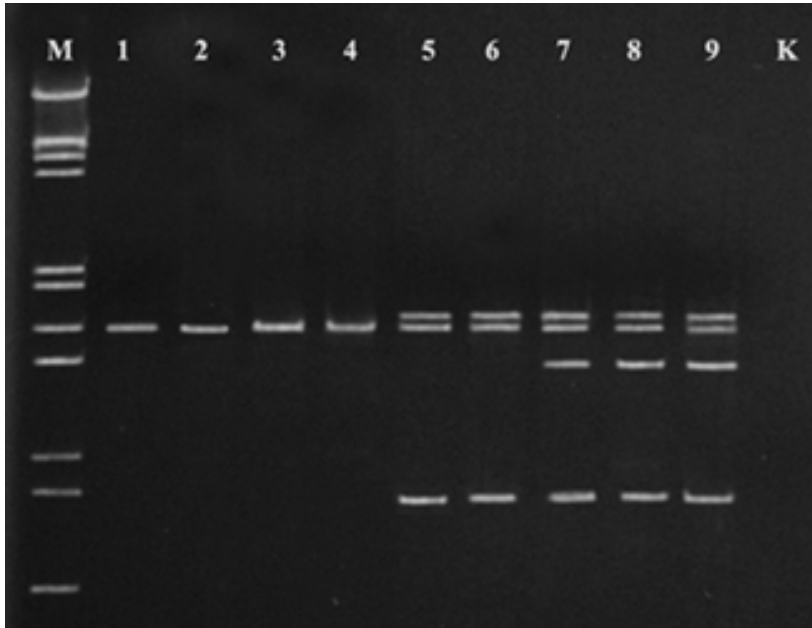
Şekil 4.9. OPA 18 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



Şekil 4.10. OPA 19 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya



Şekil 4.11. OPA 20 Primeri ile elde edilen *Origanum sipyleum*'un 9 farklı popülasyonundaki RAPD sonuçları.

M: Markör, K: Kontrol, 1) İzmir, 2) Aydın, 3) Manisa, 4) Muğla, 5) Balıkesir, 6) Uşak, 7) Gölpaazarı, 8) Ankara, 9) Kütahya

OPA 01 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 11 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 2.25-0.80 kb arasında değiştiği gözlemlendi. 2.25 kb'lik markör bütün bireylerde ortak olarak gözlenirken, diğer markörlerin polimorfik olduğu gözlemlendi. Ayrıca 1.02 kb'lik markör sadece 7 nolu bireyde, 0.8 kb'lik markör ise sadece 2 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 1, Şekil 4.2).

OPA 07 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 14 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 1.95-0.56 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Polimorfik olduğu gözlenen markörlerden 1.08 kb, 0.88 kb ve 0.59 kb'lik markörler sadece 7 nolu bireyde, 0.82 kb'lik markör sadece 3 nolu bireyde, 0.56 kb'lik markör ise sadece 8 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 2, Şekil 4.3).

OPA 08 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 12 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 1.71-0.56 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Ayrıca 0.68 kb'lik markör bütün bireylerde ortak olarak gözlenirken, polimorfik olduğu gözlenen diğer markörlerden 0.90 kb'lik markör sadece 7 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 3, Şekil 4.4).

OPA 09 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 5 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 1.80-0.80 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Ayrıca 1.47 kb'lik markör bütün bireylerde ortak olarak gözlenirken, polimorfik olduğu gözlenen diğer markörlerden 0.95-0.80 kb'lik markör sadece 7 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 4, Şekil 4.5).

OPA 10 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 7 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 2.00-0.61 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Bireyler arasında ortak markörün olmadığı gözlenmiştir. Polimorfik olduğu gözlenen markörlerden 2.00 kb'lik ve 1.46 kb'lik markörler sadece 3 nolu bireyde gözlenirken, 0.82 kb'lik markör ise sadece 1 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 5, Şekil 4.6).

OPA 11 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 4 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 1.87-0.60 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Bireyler arasında ortak markörün olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca 0.96 kb'lik markör bütün bireylerde ortak olarak gözlenirken, polimorfik olduğu gözlenen diğer markörlerden 0.60 kb'lik markör sadece 7 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 6, Şekil 4.7).

OPA 17 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 9 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 2.20-0.75 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Bireyler arasında ortak markörün olmadığı gözlemlenmiştir. Polimorfik olduğu gözlenen markörlerden 2.20 kb'lik markör sadece 2 nolu bireyde gözlenirken, 1.91 kb, 1.11 kb ve 0.91 kb'lik markörler sadece 7 nolu bireyde, 0.83 kb'lik markör ise sadece 8 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 7, Şekil 4.8).

OPA 18 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 8 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 1.85-0.56 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Ayrıca 1.58 kb'lik markör bütün bireylerde ortak olarak gözlenmiştir. Polimorfik olduğu gözlenen diğer markörlerden 1.85 kb, 0.86 kb ve 0.76 kb'lik markörler sadece 7 nolu bireyde gözlenirken, 0.80 kb'lik markör ise sadece 2 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 8, Şekil 4.9).

OPA 19 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 10 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 2.65-0.56 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Bireyler arasında ortak markörün olmadığı gözlemlenmiştir. Polimorfik olduğu gözlenen markörlerden 2.42 kb ve 0.56 kb'lik markörler sadece 7 nolu bireyde gözlenirken, 2.17 kb'lik markör ise sadece 2 nolu bireyde gözlenmiştir (Ek 9, Şekil 4.10).

OPA 20 primeri ile yapılan çalışmadan toplam 4 farklı markör elde edildi. Bu markörlerin boyutlarının 1.68-0.81 kb arasında değiştiği gözlemlendi. Ayrıca 1.59 kb'lik markör bütün bireylerde ortak olarak gözlenmiştir. Ayrıca sadece tek bir bireyde gözlenen markör bulunamamıştır (Ek 10, Şekil 4.11).

Sonuç olarak çalışılan 10 primerde elde edilen veriler incelendiğinde, analizde kullanılan 84 lokusun 78'inin polimorfik RAPD bantı olduğu gözlenmiştir. OPA 01, OPA 08, OPA 09, OPA 11, OPA 18 ve OPA 20 primerlerinin hepsi birer tane monomorfik lokus vermek üzere, toplam 6 monomorfik lokus saptanmıştır.

Populasyonların genetik çeşitliliğini belirlemede gözlenen allel sayısı, etkili allel sayısı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk ve polimorfik lokus oranı gibi kriterler kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

Genetik çeşitliliğin bileşenlerinden birisi olan ortalama gözlenen allel sayısı (A) 1.92 ± 0.259 , etkili allel sayısı (A_e) ise 1.53 ± 0.302 'dir (Çizelge 4.1). Bu çalışmada etkili allel sayısı beklendiği gibi gözlenen allel sayısından düşük bulunmuştur.

Gözlenen ortalama heterozigotluk (H_o) tüm populasyonlar için ortalama değer 0.31 ± 0.019 olarak hesaplanırken, beklenen heterozigotluk (H_e) için ise ortalama değer 0.23 ± 0.015 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Bu çalışmada gözlenen ortalama heterozigotluk değeri beklendiği gibi beklenen heterozigotluk değerinden yüksek olduğu bulunmuştur.

Ortalama polimorfik lokus oranı (0.99 kriterinde) %92.86 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Bu çalışmada elde edilen ortalama polimorfik lokus oranı (%92.86), yüksek genetik çeşitliliğin de bir göstergesidir.

Çizelge 4.1. Çalışılan Populasyonlara Ait Gözlenen Ortalama Allel Sayısı (A), Ortalama Etkili Allel Sayısı (A_e), Polimorfik Lokus Oranı (P), Gözlenen Heteozigotluk (H_o) Ve Beklenen Heterozigotluk (H_e) Ile Standart Hataları.

Populasyonlar	Pop. Sayısı	Na (A)	Ne (A _e)	Ho	He	H	%P
<i>O. sipyleum</i>	9	1.92±0.259	1.53±0.302	0.31±0.019	0.23±0.015	0.31±0.140	92.86

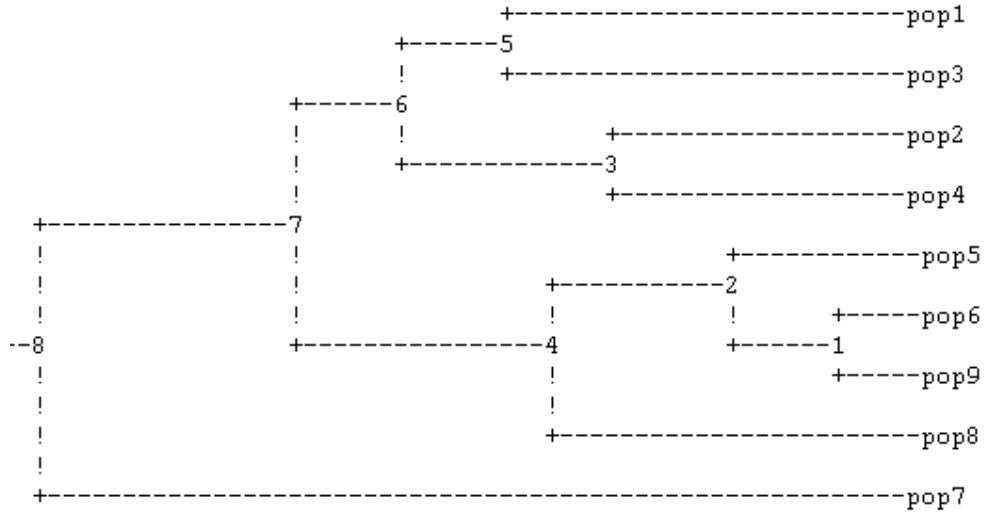
Not: **H** : Nei'nin (1972) genetik farklılık oranı, **Ho**: Gözlenen Heterozigotluk, **He**: Beklenen Heterozigotluk, **Na**: Gözlenen allel sayısı, **Ne**: Beklenen allel sayısı, **P**: Ortalama polimorfik lokus oranı.

RAPD analiz jel fotoğraflarından yararlanılarak elde edilen ‘‘1’’ ve ‘‘0’’ matriks tablosu verileri ile POP GEN bilgisayar programı kullanılarak, bireyler arasındaki benzerlik oranları hesaplanmış (Çizelge 4.2) ve dendogram hazırlanmıştır (Şekil 4.12).

Çizelge 4.2. Populasyon bireyleri arasındaki benzerlik oranları

Pop. No	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	****	0.7262	0.7857	0.6905	0.7262	0.6548	0.5000	0.5952	0.6310
2		****	0.6071	0.7738	0.6190	0.6190	0.4167	0.5119	0.5952
3			****	0.6667	0.6786	0.6310	0.4286	0.5952	0.6071
4				****	0.7262	0.6548	0.4524	0.5000	0.6548
5					****	0.8810	0.5595	0.7500	0.8571
6						****	0.5119	0.7262	0.9524
7							****	0.5238	0.4881
8								****	0.7500
9									****

Not: Çizelgenin üst kısmı populasyonlar arası genetik benzerliği göstermektedir.



<u>I. Orjin</u>	<u>II. Orjin</u>	<u>Uzunluk</u>
8	7	10.27852
7	6	4.48813
6	5	4.43052
5	pop1	15.99715
5	pop3	15.99715
6	3	8.36956
3	pop2	12.05810
3	pop4	12.05810
7	4	9.99401
4	2	7.19495
2	pop5	7.72683
2	1	4.02143
1	pop6	3.70540
1	pop9	3.70540
4	pop8	14.92178
8	pop7	35.19432

Şekil 4.12. *Origanum sipyleum*'un farklı populasyonları arasındaki benzerlikleri gösteren dendrogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. DNA İzolasyon Metodunun Belirlenmesi

Porebski vd. (1997) yaptığı çalışmada, birçok bitki türünde, özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerde güçlü bir oksitleyici ajan olarak iş gören esansiyel yağlar ve fenolik bileşiklerin, ekstrakte edilen DNA'nın miktarında ve saflığında azalmalara yol açtığını belirtmiştir. Zaten *Origanum sipyleum*'un yapısında da yüksek miktarlarda esansiyel yağ bileşenleri bulunduğu bilinmektedir (Başer vd. 1992). Bizim yaptığımız DNA izolasyon çalışmalarında da PVP ve yüksek konsantrasyonlu NaCl kullanılmadığında DNA izolasyonunun verimli olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle yüksek miktarlarda esansiyel yağ ve sekonder metabolit içeren bitkilerden DNA izolasyonu için uygun olan Khanuja vd. (1999) metodu kullanılmıştır. Ayrıca polifenollerin uzaklaştırılmasına yardımcı olmak için PVP, yüksek seviyedeki polisakkarit varlığından doğan problemleri ortadan kaldırmak için ise yüksek konsantrasyonlu NaCl kullanılmıştır.

5.2. RAPD Markör Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Origanum sipyleum'un 9 farklı populasyonu 10 RAPD primeri ile taranmış ve elde edilen 84 lokustan 78'inin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Ortalama polimorfik lokus oranı %92.86'dır; bu da yüksek genetik çeşitliliğin bir göstergesidir. Ayrıca diğer genetik çeşitlilik parametreleri değerlendirildiğinde; beklenen heterozigotluk değeri genel ortalaması 0.23, gözlenen ortalama heterozigotluk değerinin ise 0.31 olduğu, genetik çeşitliliğin diğer bileşenlerinden olan ortalama allel sayısının (A) bütün populasyonlar ve lokuslar için 1.92 olduğu, etkili allel sayısının (A_e) ise 1.53 olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, etkili allel sayısının beklendiği gibi gözlenen allel sayısından düşük olduğu da bulunmuştur. Bu bulgulara bakılarak populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

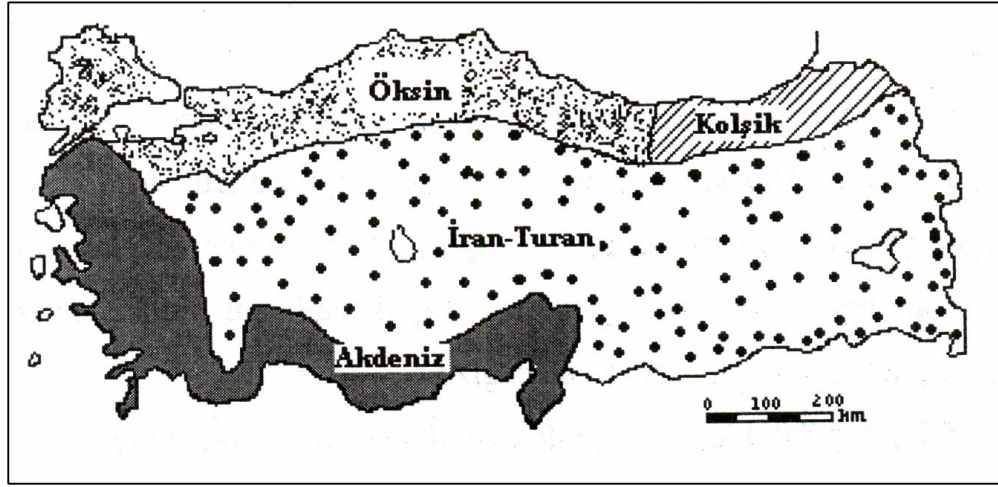
Fisher vd. (2000)'nin yaptıkları çalışmada, doğal ortamda yaşayan birçok bitki türünün populasyonları arası gen akış seviyesinin normalde düşük olduğu ve bunun sonucu olarak, populasyonlar arasında genetik açıdan farklar meydana gelebileceği vurgulanmıştır. Ayrıca populasyonlar arası gen akışının, polen ya da tohum vasıtasıyla, yani göçmen genlerle aktarıldığında meydana gelebileceği ve taşınan bu polenlerin, populasyonun genetik farklılığını yansıtacağı üzerinde durulmuştur. Ayrıca populasyonlar arası coğrafik mesafe azaldıkça, populasyonlar arasındaki gen akışının da arttığı sonucuna varılmıştır. Bizim yaptığımız çalışma sonucu elde ettiğimiz dendogram da incelendiğinde, coğrafik mesafe olarak birbirine yakın olan populasyonların genetik benzerlik açısından da birbirlerine yakın olduklarını göstermektedir. Bu bulgular, literatürdeki diğer genetik varyasyon çalışma sonuçları ile ortak bir noktada buluşmaktadır. Yani coğrafik mesafe, tür seviyesinde genetik çeşitlilikle pozitif olarak ilişkilendirilebilir.

Atalay (1994)'in yaptığı çalışmalar sonucu verdiği bilgilere göre, flora bölgeleri bir iklim tipinin hüküm sürdüğü geniş ve düz sahaları kapsamaktadır. İklim ve toprak faktörleri birlikte bitki ve hayvanların yerleşmesini ve bunların yaşamını kontrol altına almaktadır. İklim bölgeleri kendilerine özgü bitkilerin ortaya çıkmasını ve yetişmesini sağlamaktadır. Böylece belli doğal şartlar, özgün populasyonların ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bizim çalışma materyali olarak kullandığımız bitkiler de, toplanma lokaliteleri olarak Türkiye'nin 3 farklı fitocoğrafik bölgesinden örnekler içermektedir. Yaptığımız çalışma sonucu elde ettiğimiz dendogram incelendiğinde de, dendogramın 3 ana kola ayrıldığı ve her bir ana kolun ayrı bir fitocoğrafik bölgeyi temsil ettiği gözlenmiştir. Dendograma göre Avrupa-Sibiryaya fitocoğrafik bölgesini 7 numaralı lokalitenin, Akdeniz fitocoğrafik bölgesini 1,2,3 ve 4 numaralı lokalitelerin, İran-Turan fitocoğrafik bölgesini ise 5,6,8 ve 9 numaralı lokaliteler temsil ettiği görülmüştür (Çizelge 3.1, Şekil 3.1, 5.1). Ayrıca bu lokalitelerin dendogramın 3 ana kolu içerisinde kendi aralarında birbirlerine yakınlık derecelerine göre gruplandıkları görülmektedir (Şekil 4.12). Bu sonuçlara bakarak, aynı türe ait farklı populasyonlarda genetik varyasyonun çeşitli seviyelerde görülmesinde coğrafik ve ekolojik faktörlerin de önemli bir rolü olduğu kanısına varabiliriz. Zaten Ellstrand ve Elam (1993)'ın

yaptığı çalışma da bu kanıyı doğrular niteliktedir. Bu çalışmaya göre; genetik sürüklenme, soy içi üreme ve aynı zamanda gen akışı gibi potansiyel genetik riskler ile çeşitli ekolojik faktörler, bitki populasyonları arasındaki genetik varyasyonu belirleyen önemli faktörlerdir. Yani populasyonlar arasındaki bu genetik farklılığa populasyonlar arası gen akışının azlığı, genetik sürüklenme ve soy içi üremedeki artış sebep olmuş olabilir. Ayrıca *Origanum sipyleum*'un hem çiçeklenme hem de meyve dönemleri 1-2 ay ile sınırlı olup, bu potansiyel, coğrafik açıdan da bu türün yakın populasyonların da bile üreme izolasyonunun meydana gelmesine sebep olmuş olabilir.

Mitton ve Grant (1984) ve Bosh vd. (1996)'nin yaptıkları çalışmalar sonucu, özellikle endemik ve tehlike altındaki bitki türlerinin populasyonlarını tehdit eden riskler çoğunlukla değişen ekolojik faktörler ve genetik varyasyonun azalmasını sağlayan potansiyel genetik riskler olabileceği kanısına varılmıştır. Çünkü çeşitli çalışmalarda genetik açıdan homojen olan bir bitkinin, olumsuz demografik ortam ve çevreden kaynaklanan bölgesel yok olmalara daha fazla müsait olduğu belirtilmiştir. Fakat Tansley ve Brown (2000)'un çalışmasında da belirttiği gibi eğer endemik bir bitkinin populasyonları arası genetik varyasyon yüksek değerlerde ise, o bitki minimum idari çaba ve oldukça az parasal harcamalarla koruma altına alınabilir. Bizim yaptığımız çalışmada da, *Origanum sipyleum*'un genetik varyasyonunun oldukça yüksek olduğu zaten bulunmuştur. İşte bu noktada, endemik ve tehlike altındaki türlerin korunmasına yönelik kararlarda genetik varyasyonun hesaplanmasının önemi açığa çıkmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada, *Origanum sipyleum*'un geniş bir genetik varyasyon gösterdiği belirlenmiş ve RAPD tekniğinin bu tür için genetik varyasyon hesaplanmasında başarılı bir şekilde uygulanabileceği ortaya konmuştur.



Şekil 5.1 Türkiye'nin Fitocoğrafik bölgeleri (Tatlı 2002).

KAYNAKLAR

- Atalay, İ., 1994, "Türkiye Vejetasyon Coğrafyası", Ege Üniversitesi Basım Evi Bornova, s.112-125, İzmir.
- Ayres, D.R. and Ryan, F.J., 1999, "Genetic Diversty and Structure of The Narrow Endemic *Wyethia Reticulata* and Its Congener *W. bolanderi* (Asteraceae) Using RAPD and Allozyme Techniques", American Journal of Botany, 86(3): 344-353.
- Baldwin, B.C., 1992, "Phylogenetic Utility of The İnternal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: an Example From the Compositae", Molecular Phylogenetics and Evolution, 1: 3-16.
- Başer, K.H.C., Özek, T. ve Kürkçüoğlu, M., 1992, "Composition of The Essential Oil of *Origanum sipyleum* of Turkish Origin", J. Ess. Oil Res., 4: 139-142.
- Başer, K.H.C., Özek, T., Tümen, G., Sezik, E., 1994, "Ticari önemi olan Türk *Origanum* Türlerinin Uçucu Yağları", TAB Bülteni, 10: 28-30.
- Baytop, T., 1984, "Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi", İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, No. 40, İstanbul, 282-283, 325-326.
- Baytop, T., 1994, "Türkçe Bitki Adları Sözlüğü", Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları: 578, s.33, 206, Ankara.
- Bosh, M., Simon, J., Molero, J., Blache, C., 1996, Reproductive Biology, Genetic Variation and Conservation of the Rare Endemic Dysploid *Delphinium bolosii* (Ranunculaceae), Biological Conservation, 86: 57-66.
- Boydağ, İ., 1996, "Üç *Origanum* Türü: *Origanum majarona* L., *O. minutiflorum* O. Schwarz and P.H. Davis ve *O. onites* L. Uçucu Yağlarının Fraksiyonlu Distilasyonu", Anadolu Üniv. Sağ. Bil. Ens., Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Bodénés, C., Laigret, F. and Kremer, A., 1996, "İnheritance and Molecular Variations of PCR SSCP Fragments in Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.)", Theoretical and Applied Genetics, 93:348-354.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M., 1991, "DNA Amplification Fingerprinting Using Andry Short Arbitrary Oligonucleotide Primers", Biotechnology, 9: 553-557.
- Chen, S., Xia, T., Chen, S. and Zhou, Y., 2005, "RAPD Profiling in Detecting Genetic Variation in Endemic *Coelonema* (Brassicaceae) of Qinghai-Tibet Plateau of China", Biochemical Genetics, 43: 189-201.

- Cingi, M.İ., Kırimer, N., Sarıkardaşoğlu, İ., Cingi, C., Başer, K.H.C., 1991, "*Origanum onites* Ve *Origanum minutiflorum* Uçucu Yağlarının Farmakolojik Etkileri", 9. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 16-19 Mayıs, Eskişehir.
- Crawford, D.J., Stuessy, T.F., Haines, D. W., Cosner, M.B., Wiens, D. and Lopez, P., 1994, "*Lactoris fernandeziana* on The Juan Fernandez Islands: Allozyme Uniformity and Field Observations", *Conservation Biology*, 8: 277-280.
- Davis, P. H. (Edt.), 1982, "Flora of Turkey and The East Aegean Island", Univ. Press, Edinburgh, 7:297-313.
- Demesure, B., Sodzi, N. and Petit, R.J., 1995, "A Set of Universal Primers for Amplification of Polymorphic Non-Coding Regions of Mitochondrial and Chloroplast DNA in Plants", *Molecular Ecology*, 4:129-131.
- Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D. and Rieseberg, L.H., 1996, "Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites", *Molecular Systematics*, 249-320.
- Duman, H., Aytaç, Z., Ekici, M., Karavelioğulları, F. A., Dönmez, A., Duran, A., 1995, "Three New Species (*Labiatae*) From Turkey", *Flora of Mediterranean*, 5:221-228.
- Ellstrand, N.C., Elam, D.R., 1993, "Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation", *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24:217-242.
- Esselman, E.J., Crawford, D.J., Brauner, S., Stuessy, T.F., Anderson, G.J. and Silva, O.J., 2000, "RAPD Marker Diversity Within and Divergence Among Species of *Dendroseris* (Asteraceae:Lactuceae)", *American Journal of Botany*, 87:591-596.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., Van Kleunen, M., Schmid, B., 2000. "RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae)", *American Journal of Botany*, 87:1128–1137.
- Gounaris, y., Skoula, m., Fournaraki, c., Drakakaki, G., Makris, A., 2001, Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum × intercedens* to its parental taxa in the island of Crete, *Biochemical Systematics and Ecology*, 30: 249-258.
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Ramesh, B., 1996. "Microsatellites in plants: a new class of molecular markers", *Curr. Sci.* 70, 45–54.

- Halden, C., Nilsson, N.O., Rading, M.I. and Sall, T., 1994, "Evaluation of RFLP and RAPD Markers in a Comparison of Brassica Napus Breeding Lines", *Theor. Appl. Genetics*, 88: 123-128.
- Ietswaart, J. H., 1980, "A Taxonomic Revision of The Genus *Origanum*", Leiden University Press", London.
- Işık, K., Yalıtırık, F., Akesen, A., 1997, "Ormanlar, Biyolojik Çeşitlilik ve Doğal Mirasın Korunması", XI. Dünya Ormancılık Kongresi Bildirileri, 13-22 Ekim, 1997, Cilt 2, s. 3-22, Antalya.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, W.O., Sala, F., Van De Wiel, C., 1997, "Reproducibility Testing of RAPD, AFLP and SSR Markers in Plants by a Network of European Laboratories", *Molecular Breeding*, v.3, 381-390.
- Jordan, W.C., Foley, K. and Bruford, M.W., 1998, "Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis", In; KARP, A., ISAAC, P.G. and INGRAM, D.S. (Eds), *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, 152-156.
- Jordano, P. and Godoy, J.A., 2000, "RAPD Variation and Population Genetic Structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an Animal-Dispersed Tree", *Molecular Ecology*, 9:1293-1305.
- Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P., Kumar, S., 1999, "Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils", *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol.17, pp.1-7 .
- Kolchinsky, A.M., Funke, R.P. and Gresshoff, P.M., 1993, "Amplified Fragment Can be Used as Markers for DNA From Pulse Field Gels", *Biotechniques*, 14:400-403.
- Leding, F.T., 1998, "Genetic Diversity in Tree Species: With Special Reference to Conservation in Turkey and The Eastern Mediterranean", In: *The Proceedings of International Symposium on In-Situ Conservation of Plant Genetic Diversity*, Edited by Zencirci, N., Kaya, Z., Anikster, Y., Adams, W.T., Central Research Institute for Field Crops, Turkey, 231-247.
- Lefebvre V, Chevre AM., 1995, "Tools for marking plant disease and pest resistance genes, a review", *Agronomie*, 15: 3-19.
- Lerman, L.S., Silverstein, K., Gringfeld E., 1986, "Searching for Gene Defects by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis", *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, 51: 285-97.

- Martin, J.P. and Bermejo, 2000, "Genetic Variation in the Endemic and Endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath and Maire (Labiatae) Using RAPD Markers", *Heredity*, 85: 434-443.
- Milligran, B.G., Leebens-Mack, J., Strand, A.E., 1994, "Conservation Genetics: Beyond the Maintenance of Marker Diversity", *Molecular Ecology*, 3: 423-435.
- Millar, C.I., Marshall, K.A., 1991, "Allozyme Variation of Port-Orford-Cedar (*Chamaecyparis Lawsoniana*): Implication for Genetic Conservation", *Forest Sci.*, 37:1060-1075.
- Mitton, J.B., Grant, M.C., 1984, Associations among protein heterozygosity, growth rate and developmental homeostasis, *Annual Review of Ecology Systematics*, 15: 479-499.
- Mouna, Q., 1990, "Population Genetics in Forest Tree Improvement. in: Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources, Brown H.D.
- Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L., 1999, "AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.*", 14: 389-394.
- Nie, M., 1972, Genetic Distance Between Populations, *American Naturalist*, 106:283-292.
- Özaydın, S., 2004, "RAPD Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği", *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Ekim, Sayı 6, s. 113-129. Kütahya.*
- Özdemir, F., Pirdal, M., Öztürk, M., 1988, "Batı Anadolu'da Yayılış Gösteren Bazı Endemiklerin Morfolojik, Anatomik ve Ekolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar", IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-23 Eylül, Cilt 3: 141-150, Sivas.
- Özhatay, N., Koyuncu, M., Altay, S. ve Byfield, A., 1997, "Türkiye'nin doğal tubbi bitkilerinin ticareti hakkında bir çalışma", İstanbul.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C., Fuerst, P.A., 1998, "What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker", *Ecology*, 79: 361-382.
- Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R., 1997, Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components, *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8-15.

- Prabhu, R.R., and Gresshoff, P.E., 1994, "Inheritance Of Polymorphic Markers Generated by DNA Amplification Fingerprinting and Their use as Genetic Markers Generated by DNA Amplification Fingerprinting and Their Use as Genetic Markers in Soybean", *Plant Molecular Biology*, 26: 105-106
- Rosetto, M., Weaver, P.K., Dixon, K.W., 1995, "Use of RAPD Analysis in Devising Conservation Strategies for The Rare and Endangered *Grevillea scapigera* (Proteeceae)", *Molecular Ecology*, 4: 321-329.
- Sales, E., Nebauer, S.G., Mus, M. and Segura, J., 2001, "Population Genetic Study in the Baleric Endemic Plant Species *Digitalis Minor* (Scrophulariaceae) Using RAPD Markers", *American Journal of Botany*, 88(10): 1750-1759.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A., 1998, "Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase", *Science*, 239: 487-491.
- Schiliro, E., Prediere, S. and Bertaccini, A., 2001, "Use of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis to Detect Genetic Variation in *Pyrus* Species", *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 271a-h.
- Skoula, M., Hilali, I.E., Makris, A.M., 1998, "Evaluation of The Genetic Diversity of *Salvia Fruticosa* Mill. Clones Using RAPD Markers and Comparison With the Essential Oil Profiles", *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 559-568.
- Soule, M.E., Simberloff, D., 1986, "What Do Genetics and Ecology Tell Us About The Desing of Nature Reserve?", *Biological Conservation*, 35: 19-40.
- Staub, J.E., Kuhns, L.J., May, B., Grun, P., 1982, "Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes", *J Am. Sci.*, 107: 405-8.
- Stewart, C.N.J., Porter, D.M., 1995, "RAPD proling in biological conservation: an application to estimating clonal variation in rare and endangered *Iliamna* in Virginia", *Biological Conservation*, 74: 135-142.
- Stuber, C.W., 1992, "Biochemical and Molecular Markers in Plant Breeding", *Plant Breeding Reviews*, 9: 37-61.
- Swensen, S.M., Allan, G., Howe, M., Elisen, W.J., Junak, S.A. and Rieseberg, L.H., 1995, "Genetic Analysis of the Endangered Island Endemic *Malacothamnus fasciculatus* (Nutt.) Grene Var. *Nesioticus* (Rob.) Kearn. (Malvaceae) ", *Conservation Biology*, 9(2): 404-415.

- Tabata, M., Honda, G. And Sezik, E., 1988, "A Report on Traditional Medicine and Medicinal Plants in Turkey", Fac. Pharmceut. Sci., Kyoto University.
- Tan, F., Huang, Y., Ge, X., Su, G., Ni, X., Shi, S., 2005, "Population Genetic Structure and Conservation İmplications of *Ceriops Decandra* in Malay Peninsula and North Australia", *Aquatic Botany*, 81: 175-188.
- Tansley, S.A., Brown, C.R., 2000, "RAPD Variation in The Rare and Endengered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): İmplications for Their Conservation", *Biological Conservation*, 95: 39-48.
- Tatlı, A., 2002, "Türkiye Vejetasyonu (Ders kitabı)", Dumlupınar Üniversitesi, 87, Kütahya.
- Temel, M., 2000, "Batı Anadolu Bölgesinde Yayılış Gösteren *Origanum L.* (Lamiaceae) Türleri Üzerinde Biyosistematik Çalışmalar", Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Tümen, G., Başer, K. H. C. and Kırımer, N., 1995. The Essential Oils of Turkish *Origanum* Species: A Treatise 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, 15-19 October, İstanbul.
- Velioğlu, E., Çengel, B., İçgen, Y., Kandemir, G., Alan, M., Kaya, Z., 2002, "Moleküler Belirteçler Yardımıyla Karaçam (*Pinus nigra* Arnold supspecies *pallasiana* (Lamb.) Holmboe) Tohum Meşcerelerinde", Tohum Bahçelerinde ve Ağaçlandırmalarında Bulunan Genetik Çeşitliliğin Karşılaştırılması, Orman Bakanlığı Yayın No:190, Ankara.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414.
- Wang, C., Wang, W., Chiang, C., Wang, Y., Lin, T., 1996, Low Genetic Variation in *Amentotaxus formosana* Li Revealed by İsozyme Analysis and Random Amplified Polymorphic DNA Markers, *Heredity*, 77: 388-395.
- Weising K, Winter P, Huttel B, Kahl G., 1998, Microsatellite markers for molecular breeding. *J Crop Prod.*, 11: 113–43.
- Weising K, Kaemmer D, Ramser J, Bierwerth S, Kahl G., 1992, Plant DNA fingerprinting with simple repetitive oligonucleotides, DNA Polymorphisms in Eukaryotic Genomes, *Adv Mol Genet*, 5:135–56.
- Welsh, J., Mcclelland, M., 1990, Fingerprinting Genoms Using PCR With Arbitrary Primers, *Nucleic Acids Research*, Vol. 18: 7213-7218.

- Williams, J.K.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990, DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No.22: 6531-6535.
- Wolfe, A.D. and Liston, A., 1998, Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology, In: D.E. Soltis, P. S. Soltis, And J.J Doyle (Eds.), *Molecular Systematics of Plants II, DNA Sequencing*, 43-86, Kluwer Academic Publishers, New York, USA.
- Yıldırım, A. ve Kandemir, N., 2001, Genetik Markörler ve Analiz Metotları, *Bitki Biyoteknolojisi II: Genetik Mühendisliği Uygulamaları*, s. 334-363, Konya.
- Yücel, E. & Öztürk, M., 1998, "Studies on the Autecology of *Origanum sipyleum* L.", *Plant Life in South-West and Central Asia*, 5th International Symposium, 18-22 May, Tashkent, Uzbekistan.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored PCR amplification, *Genomics*, 20:176–83.

www.cevreorman.gov.tr, 21.09.2005

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Mehmet TEMEL'e, çalışma ortamımızı oluşturan ve her açıdan desteklerini sakınmayan sayın hocam Prof.Dr. Muhsin KONUK'a, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Süleyman CENKÇİ'ye, yine desteğini esirgemeyen hocam Yrd.Doç.Dr. Mustafa YILDIZ'a, çalışmalarımın her aşamasında gerek maddi gerekse manevi açıdan her türlü konuda bana yardımcı olan sevgili hocam Arş.Gör. Yasin EREN'e, çalışma süresince bana her türlü desteği sağlayan çok sevdiğim ev arkadaşlarım Arş.Gör. Çetin ŞENKUL'a ve Arş.Gör. Mustafa YAKAR'a ve ayrıca her konuda daima bana destek olan canımdan çok sevdiğim aileme çok çok teşekkürler.

ÖZGEÇMİŞ

14 Temmuz 1981'de İstanbul'da doğmuştur. İlkokulu İvat Turhan İlköğ. Okulunda, Orta okulu Malazgirt ortaöğretim okulunda tamamlamıştır. 1999 yılında Akşemseddin Lisesinden mezun olmuştur. Aynı sene Afyon Kocatepe Ün. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Biyoloji bölümünü kazanmıştır ve bu bölümden 2003 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Afyon Kocatepe Ün. Biyoloji bölümünde yüksek lisansa başlamıştır.

EKLER

Ek 1. OPA 01 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 01									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2.25	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1.96	0	1	0	0	0	1	1	0	1
1.80	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1.69	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.47	0	0	1	0	0	0	1	1	0
1.31	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.23	1	0	1	0	1	1	0	1	1
1.07	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1.02	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.96	1	1	1	0	0	0	0	0	0
0.80	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Ek 2. OPA 07 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 07									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.95	0	0	0	0	1	1	0	1	1
1.75	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1.60	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.43	1	1	0	0	1	1	1	1	1
1.24	0	0	0	0	0	1	0	1	1
0.83	0	0	1	0	0	0	0	1	0
1.08	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1.04	0	1	0	1	0	0	0	0	0
0.88	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.82	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0.71	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0.66	1	0	0	0	0	0	0	1	0
0.59	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.56	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Ek 3. OPA 08 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 08									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.71	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1.56	0	1	0	1	1	1	0	1	1
1.42	1	1	0	1	0	0	0	0	0
1.27	0	1	0	0	0	0	0	1	0
1.18	0	0	1	0	1	1	0	1	1
1.10	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1.01	0	1	0	1	0	0	1	0	0
0.90	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.81	0	1	1	0	0	1	0	1	1
0.68	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.64	1	0	1	0	0	0	0	1	0
0.56	1	0	1	1	0	0	1	1	0

Ek 4. OPA 09 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 09									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.80	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.47	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1.31	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0.95	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.80	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Ek 5. OPA 10 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 10									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2.00	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1.46	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1.23	1	1	1	1	1	0	0	1	1
0.91	0	0	0	1	1	1	0	0	1
0.82	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0.70	0	0	1	0	0	0	1	0	0
0.61	1	1	0	0	0	0	1	1	0

Ek 6. OPA 11 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 11									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.87	1	1	0	0	1	1	1	1	1
1.60	0	0	0	0	0	1	1	1	1
0.96	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.60	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Ek 7. OPA 17 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 17									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2.20	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1.91	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1.61	1	1	1	1	1	0	1	1	0
1.25	1	1	1	1	1	1	0	0	1
1.11	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.98	0	1	0	0	0	0	1	0	0
0.91	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.83	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0.75	1	1	1	1	0	1	0	0	1

Ek 8. OPA 18 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 18									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.85	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1.58	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1.46	0	1	1	1	0	1	0	0	1
1.18	0	1	0	0	0	1	0	1	1
0.86	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.80	0	1	0	0	0	0	0	0	0

0.76	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0.56	1	1	1	1	1	1	1	0	0

Ek 9. OPA 19 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 19									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2.65	1	1	1	0	1	1	0	1	1
2.42	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2.17	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1.54	1	1	1	1	0	0	1	0	0
1.36	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1.20	0	1	0	1	0	0	0	0	0
1.13	0	0	0	0	0	1	0	0	1
0.91	1	1	1	0	0	0	1	0	0
0.61	0	0	0	1	0	0	0	0	1
0.56	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Ek 10. OPA 20 Primeri ile elde edilen RAPD markör sonuçları

OPA 20									
(kb)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.68	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1.59	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1.36	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.81	0	0	0	0	1	1	1	1	1