

**TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *ALYSSUM* L. (*BRASSICACEAE*) TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER ANALİZLERİ**

126051

S. SELCEN BABAOĞLU AYDAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

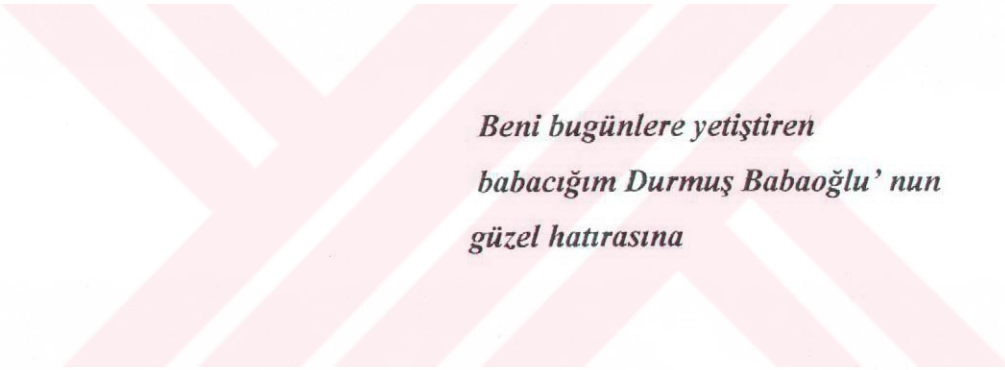
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ağustos 2002
ANKARA**

126051
T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

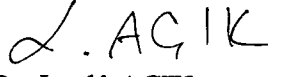


Alyssum murale Waldst.&Kit



*Beni bugünlere yetiştiren
babacığım Durmuş Babaoğlu' nun
güzel hatırasına*

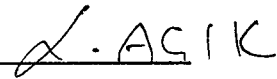
Selcen BABAOĞLU AYDAŞ tarafından hazırlanan TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI *ALYSSUM* L. (*BRASSICACEAE*) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZLERİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.


Doç. Dr. Leylâ AÇIK
Tez Yöneticisi

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

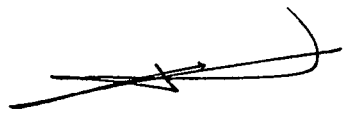
Başkan: Prof. Dr. Hayri DUMAN 

Üye: Doç. Dr. Sibel SÜMER 

Üye: Doç. Dr. Leyla AÇIK 

Üye: _____

Üye: _____


Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE METOTLAR.....	19
2.1. Materyal.....	19
2.1.1. Bitki materyali	19
2.1.1.1 Tohum proteini ile çalışılan türler ve toplandıkları lokaliteler.....	19
2.1.1.2 Yaprak DNA'sı ile çalışılan türler ve toplandıkları lokaliteler.....	19
2.1.2. Tampon ve çözeltiler.....	20
2.1.2.1. Protein izolasyonu için gerekli çözeltiler.....	20
2.1.2.2. Protein elektroforezi için gerekli çözeltiler.....	21
2.1.2.3. DNA izolasyonu için gerekli çözeltiler.....	21
2.1.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler.....	22
2.1.2.5. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan tampon ve çözeltiler.....	22
2.1.3. Sterilizasyon.....	22
2.2. Metot	23
2.2.1. Tohumdan toplam protein izolasyonu.....	23
2.2.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi.....	24
2.2.3. Bitki yapraklarından DNA izolasyonu.....	24
2.2.4. DNA derişim tayini.....	25
2.2.5. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu.....	25
2.2.6. Agaroz jel elektroforezi.....	25
2.2.7. Genetik uzaklık tayini.....	26
3. BULGULAR.....	27
3.1. Bazı <i>Alyssum</i> türlerinin tohum protein profili analizleri.....	27
3.2. <i>Alyssum</i> türlerine uygulanan RAPD-PCR yönteminden elde edilen sonuçlar.....	30
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	
ÖZGEÇMİŞ.....	

**TÜRKİYE'DE YETİŞEN BAZI *ALYSSUM* L. (*BRASSICACEAE*)
TÜRLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZLERİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

S.Selcen Babaoğlu AYDAŞ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ağustos 2002**

ÖZET

Bitki türlerinin taksonomik sınıflandırılması temel olarak morfolojik ve anatomik karakterlere dayanır. Fakat bu özellikler değişken ve bazen de gözlenmesi zor olabileceğinden, izoenzim analizleri, SDS-PAGE, RFLP, RAPD-PCR, gibi moleküler tekniklerle desteklenmelerinde fayda vardır. Bu tekniklerden RAPD-PCR; ekonomik olması, zaman kazandırması, polimorfizmleri kolay tespit edebilmesi ve genomik bilgiye ihtiyaç duymaması bakımından en avantajlı olanlardandır. Türkiye' de yetişen bazı *Alyssum* L (*Brassicaceae*) türleri arasındaki genetik uzaklıklar SDS-PAGE ve RAPD-PCR yöntemleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. RAPD-PCR çalışmasında toplam 42 primer denenmiş bunlardan 5 primerin polimorfik bantlar verdiği gözlenmiştir. Genetik uzaklıklar SDS-PAGE ve RAPD-PCR sonuçlarına göre her tür için hesaplanmış, dendrogramlar çıkartılmıştır.

Bilim Kodu : 405. 02. 00

Anahtar Kelimeler : *Alyssum*, SDS-PAGE, RAPD-PCR

Sayfa Adedi : 59

Tez yöneticisi : Doç. Dr. Leylâ Açık

**MOLECULAR ANALYSIS OF SOME *ALYSSUM* L. (*BRASSICACEAE*)
SPECIES GROWING IN TURKEY
(M.Sc.Thesis)**

S.Selcen Babaoğlu AYDAŞ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Ağustos 2002**

ABSTRACT

The taxonomic classification of plant species is basically depends on the morphologic and anatomic characters, but because these features are changable and sometimes difficult to observe, it is necessary to support by molecular techniques such as SDS-PAGE, RFLP, RAPD-PCR. RAPD-PCR is the most advantageous method because its being economic, fast and less complicated. RAPD-PCR can detect the polymorphisms easily and doesn't need genomic information. The genetic distances among some species of *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) growing in Turkey is determined by using the SDS-PAGE and RAPD-PCR methots. 42 primer were used in RAPD-PCR and 5 of them gave polymorphic bants. Genetic distances were calculated for each species by using the results of SDS-PAGE and RAPD-PCR then dendrograms were obtained.

Science code : 405. 02. 00
Key Words : *Alyssum*, SDS-PAGE, RAPD-PCR
Page number : 59
Adviser : Doç. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı ortaya koyarken her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterici olarak, sabırla çalışmalarında yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Leyla AÇIK' a, çalışmamızı gerçekleştirebilmemiz için gerekli bitki örneklerini ve bunlarla ilgili bilgileri veren sayın Doç. Dr. Nezaket ADIGÜZEL' e, protein jellerimizin fotoğraflarını çeken sayın Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a, çalışmamın her aşamasında yanımda olan, deneylerimde yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Araş. Gör. Ayten ÇELEBİ' ye, Türkiye florası ile ilgili olarak bana yardımcı olan Araş. Gör. Mehtap TEKŞEN' e, çalışmalarım sırasında beni hiç yalnız bırakmayan eşime, anneme ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Bitkisel geri kazanım teknikleri.....	3
Çizelge 2.1. RAPD-PCR’ da kullanılan primerler.....	23
Çizelge 3.1. <i>Alyssum</i> türlerinin birbirlerine göre genetik uzaklıkları.....	29
Çizelge 3.2. B6 primeri ile yapılan RAPD-PCR’ a göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik uzaklıkları.. ..	32
Çizelge 3.3. OPB08 primeri ile yapılan RAPD-PCR’ a göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik uzaklıkları.....	36
Çizelge 3.4. B18 primeri ile yapılan RAPD-PCR’ a göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik uzaklıkları.....	40
Çizelge 3.5. M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR’ a göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik uzaklıkları.....	44
Çizelge 3.6. OPI18 primeri ile yapılan RAPD-PCR’ a göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik uzaklıkları.....	47

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1.	Polimeraz zincir reaksiyonu.....13
Şekil 3.1.	<i>Alyssum</i> türlerinin protein profilleri.....28
Şekil 3.2.	<i>Alyssum</i> protein profillerine göre genetik yakınlıkları.....30
Şekil 3.3.	<i>Alyssum</i> türlerinin B6 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri.....31
Şekil 3.4.	B6 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik yakınlıkları.....33
Şekil 3.5.	<i>Alyssum</i> türlerinin OPB 08 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri.....35
Şekil 3.6.	OPB08 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik yakınlıkları.....37
Şekil 3.7.	<i>Alyssum</i> türlerinin B18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri.....39
Şekil 3.8.	B18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik yakınlıkları.....41
Şekil 3.9.	<i>Alyssum</i> türlerinin M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri.....43
Şekil 3.10.	M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik yakınlıkları.....45
Şekil 3.11	<i>Alyssum</i> türlerinin OPI 18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri.....46
Şekil 3.12	OPI18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre <i>Alyssum</i> türlerinin genetik yakınlıkları.....48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
A	Absorbans
bp	Baz çifti
kb	Kilobaz
nm	Nanometre
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

1. GİRİŞ

Alyssum L. (*Brassicaceae*), Türkiye’de zengin cinsler arasında yer almakta ve 90 türle temsil edilmektedir. Bunlardan 54’ ü endemiktir. Oldukça fazla varyasyon gösteren *Alyssum* türleri, özellikle *Odontarrhena* (Meyer) Hooker seksiyonunda, serpentin alanlarda yetişmektedirler (Davis, 1965). Tarım, madencilik, madenlerin tasfiyesi, hızlı sanayileşme, enerji ve yakıt üretimi, gibi faaliyetler sonucu ağır metaller çevre kirliliğinde önemli bir yer tutmaya başlamıştır. Son yıllarda ağır metal kirliliğini gidermek için yüksek maliyetli teknolojilerin yerine ekonomik, birçok toprak türünde kullanılabilen, tahrip edici olmayan, doğal bir yöntem olarak, karasal bitkilerin ağır metalleri absorbe edip detoksifikasyona uğratma özelliği kullanılmaktadır. *Alyssum*, bazı türleri, nikel metalini kuru yaprak biyokütlesinin %3’üne varan derişimlerde biriktirme özelliğine sahip olması bakımından ekolojik değeri olan bir bitki grubudur.

Bu çalışmamızın amacı Türkiye’de yetişen bazı *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) türleri arasındaki genetik uzaklıkları, varsa türler arası ve tür içi polimorfizmleri SDS-PAGE ve RAPD-PCR yöntemlerini kullanarak belirlemektir.

Genel Bilgiler

Bitkisel geri kazanım farklı bitkileri, çevre kirliliğini oluşturan maddeleri tutmak, indirgemek veya özütlemek suretiyle çevrenin iyileştirilmesini sağlayan bir seri teknolojiye verilen addır. Bitkisel geri kazanım uygulamaları, bitkilerin kirliliği bertaraf etmekte kullandıkları mekanizmalara göre sınıflandırılmaktadır. Bu mekanizmalar inorganik kirleticilerin toprak veya yüzey sularından özütlenerek bitkilerin toprak üstünde kalan kısımları tarafından yok edilmesi (fitoekstraksiyon), kirleticilerin çok çeşitli biyotik ve abiyotik süreç sayesinde indirgenmesi (rizodegradasyon, fitodegradasyon), uçucu kirleticilerin bitkiler tarafından atmosfere buharlaştırılması veya terleme ile atılması (fitovolatilizasyon), kirleticilerin kök bölgesinde tutulması (fitostabilizasyon), kirlenmiş yüzey sularının hidrolik kontrolü ve vejetatif uzantılar yoluyla erozyonun, içerilere sızmaların ve aşınmaların

önlenmesidir. Çizelge 1.1' de tüm bitkisel geri kazanım teknikleri, hangi bitkiler aracılığı ile uygulandıkları, hangi kirleticiler üzerinde etkili oldukları ve kullanıldıkları ortamlar verilerek özetlenmiştir (EPA).

Welch (1995), insanların tarım, madencilik, madenlerin tasfiyesi, elektrolizle kaplama, enerji ve yakıt üretimi, güç iletimi, atıkların indirgenmesi ve askeri operasyonlar gibi aktiviteleri sonucu oluşan ağır metallerin çevre kirliliğinde önemli bir paya sahip olduğunu, bazı metallerin, mesela Mn, Fe, Cu, Zn, Mo ve Ni, mikroorganizmalar, bitki ve hayvanlar için önemli ve faydalı besleyiciler olduğunu, diğerlerinin ise bilinen bir biyolojik veya fizyolojik fonksiyonu olmadığını belirtmiştir. Tüm ağır metaller yüksek derişimlerde güçlü toksik etkilere sahiptir ve çevresel tehdit oluşturlar (Nedelkoska and Doran, 2000).

Negri ve Hincman' a göre (1996) toprak, su ve sedimentlerden ağır metal kirliliğini gidermek için birçok teknikler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları çökeltme, iyon değişimi, bakteri ve funguslar aracılığı ile biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon) veya toprağın kimyasal olarak süzülmesi, arazi doldurmak için tamamen transferi gibi pahalı yöntemlerdir. Bu metotlar özel bazı koşullarda başarılı olabildiği halde önemli dezavantajlara sahiptir. Değişken toprak çeşidi ve yapısı, zararlı metabolik ürünlerin ortaya çıkması, bölgelerin tahribi ve artan kirliliğin dağılma potansiyeli, varolan tekniklerin kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır. Cunningham ve arkadaşları'na (1995) göre, daha da önemlisi, çevrenin temizliği için geliştirilen bu teknolojilerin maliyeti de çok yüksek olmaktadır. Bu soruna bir çözüm olması amacıyla araştırmalar, ağır metal kirliliği için alternatif, daha düşük maliyetli yöntemler geliştirilmesine yönelmiştir. Bunlardan birisi toprak ve su yollarının temizliğinde canlı bitkilerin kullanıldığı bitkisel geri kazanımdır. Bu yaklaşım ağır metallerle kirlenmiş çevrelerde yaşayabilen bazı karasal bitkilerin, toprak üzerinde kalan kısımların da çinko, manganez, nikel, kobalt ve bakır gibi toksik metalleri biriktirme yeteneklerini kullanır. Halen kullanılmakta olan çevre temizliği metotlarıyla karşılaştırıldığında en az bölgesel tahrip oluşturan ve doğal dengeyi en az bozan yöntemdir. Metal biriktirme özelliği serpentin topraklara endemik türlere

Çizelge 1.1. Bitkisel geri kazanım teknikleri

Mekanizma	Amaç	Ortam	Kirleticiler	Bitkiler	Durumu
Bitkisel özitleme (Fitokstraksiyon)	Kirleticilerin özütlenmesi, zaptedilmesi	Toprak, sediment çamur	Metaller: Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn; Radyonüklidler: ⁹⁰ Sr, ¹³⁷ Cs, ²³⁹ Pu, ²³⁶ U	Hint hardalı, <i>Alyssum</i> , Ayçiçeği, Hibrid kavaklar	Laboratuvar Pilot ve arazi uygulaması
Köklerde süzülme (Rizofiltrasyon)	Kirleticilerin özütlenmesi, zaptedilmesi	Yer altı suyu, yüzey suları	Metaller, Radyonüklidler	Ayçiçeği, Hint hardalı Su sümbülü (<i>Eichornia crassipes</i>)	Laboratuvar, Pilot uygulama
Bitkisel dengeleme (Fitostabilizasyon)	Kirleticilerin tutuklanması	Toprak, sediment, çamur	As, Cd, Cr, Cu, Hs, Pb, Zn	Hint hardalı, Hibrid kavaklar, Otlar	Arazi Uygulaması
Köklerde indirgeme (Rizodegradasyon)	Kirleticilerin parçalanması	Toprak, sediment, çamur, yer altı suyu	Organik bileşikler (TPH, PAH, pestisidler, klorlu çözücüler)	Dut (<i>Morus rubra</i>), otlar, hibrid kavaklar, Su kamışı (<i>Typha latifolia</i>) Pirinç	Arazi Uygulaması
Bitkisel indirgeme (Rizodegradasyon)	Kirleticilerin parçalanması	Toprak, sediment çamur, yer altı suyu yüzey suları	Organik bileşikler, Klorlu çözücüler herbisidler	Algler, hibrid kavaklar, Kara söğüt	Arazi Uygulaması
Bitkisel buharlaştırma (Fitovolatilizasyon)	Kirleticilerin ortamdaki özütlenip havaya verilmesi	Yer altı suyu, toprak, sediment, çamur	Klorlu çözücüler, Bazı inorganikler (Se, Hg ve As)	Kavaklar, Yonca (<i>Medicago sativa</i>), Hint hardalı, Akasya ağacı (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	Laboratuvar ve Arazi uygulaması
Hidrolik kontrol	Kirleticilerin indirgenmesi veya tutuklanması	Yer altı suyu, yüzey suları	Suda çözünebilir organik ve inorganikler	Hibrid kavaklar, söğüt	Arazi uygulaması
Vejetatif örtü	Kirleticilerin tutuklanması, Erozyon kontrolü	Toprak, çamur, sedimentler	Organik ve inorganik bileşikler	Kavaklar, otlar	Arazi uygulaması

has bir olaydır ve bu tür metalofitlerin de çok azında görülür. Küçük tek yıllık otlardan çok yıllık çalı ve ağaçlara kadar değişen birçok familyada gerçekleşebilmektedir. Ağır metalleri biriktirebilen yaklaşık 400 bitki türü bilinmektedir. Metal iyonları, metal biriktiren bitkiler tarafından bir kere alınıp dokularda derişik hale getirildikten sonra, biyokütle biyolojik maden kaynağı olarak geri dönüşüm için veya depolama amacıyla hasat edilip, kurutulup toz haline getirilebilir (Wenzel et al, 1997).

Metal biriktiren bitkilerin diğer bir kullanım alanı da yüzeye yakın maden kaynaklarının bitkiler sayesinde işletilmesidir. Bu teknoloji, uygun bölgelerde bitkilerin yetiştirilmesi, metallenmiş ürünün hasatı ve biyokütlenin metal elde etmek amacıyla muamelesi esasına dayanır. Bitkisel madencilğin temel avantajı geleneksel madencilik yöntemlerine göre daha ucuz olması ve doğrudan madencilik operasyonu için yetersiz fakat mineralce zengin toprakları ekonomik olarak kullanılabilir hale getirmesidir (Brooks et al, 1997). Boyd ve arkadaşları, (1994); Pollard ve Baker, (1997), metal biriktirme özelliğinin bitkileri herbivorlara, zararlı fungilere ve bakteriyel patojenlere karşı koruduğunu bildirmektedirler (Wenzel et al, 1997).

Ağır metallere nikel genel olarak yer altında sülfür madenleri, yüzeyde ise silikat minerallerinin yapısında doğal olarak bulunan bir elementtir. Çevrede ise nikelin ilk hali oksijen veya sülfür ile birleşmiş olarak bulunur. Nikelin yer kabuğundaki oranı 90 mg/kg civarındadır. Sülfür, arsenid, antimonid, oksit ve silikat kaynaklarında dağılmış olarak bulunur. Nikel aynı zamanda insanlar ve volkanik faaliyetler, orman yangınları, atmosferin dış tabakalarındaki meteor parçalanmaları gibi doğal nedenlerle atmosferde toz halinde yayılmış olarak da bulunur. Saf nikel sert, gümüşü beyaz bir metaldir ve güçlü, uzun süreli metal alaşımları yapmak için kullanılır, örneğin paslanmaz çelik tencereler, şarjlanabilir bataryalar, madeni paralar gibi. Nikel sedimenter kayalarda sıklıkla organikçe zengin tortularla birleşmiştir. Nikel bazı organizmalar için esas bir elementtir. Yüksek derişimlerde Ni hem hayvanlar hem de bitkiler için toksiktir ve maruz kalınan süreye bağlı olarak Ni tuzlarının kanser yapıcı etki gösterdiği bulunmuştur (Ebbs and Kochian, 1997).

Ağır metallerle kirlenmiş toprağın temizliğinde kullanılacak ideal bitki türleri, kirliliği hem müsamaha gösterebilecek hem de biriktirebilecek kadar büyük biyokütleye sahip olmalıdır. Bitkisel geri kazanım için en uygun bitki türlerini *Brassicaceae* familyasının üyeleri teşkil etmektedir (Ebbs and Kochian, 1997). Bunlardan *Alyssum* toplam 170 taksonu arasında, kuru yaprak biyokütlesinin %3'üne varan derişimlerde nikel biriktirebilen 48 metal biriktiren cins içermek suretiyle, en geniş grubu oluşturmaktadır (Krämer et al, 1996). İlk olarak Minguzzi ve Vergnano (1948) tarafından, *Alyssum bertolonii*'nin kuru materyalinde yaklaşık 10,000 µ(ppm) [1%] Ni bulundurduğu görülmüştür (Brooks et al, 1997). Krämer ve ark'nın (1996) yapmış olduğu çalışmalarda *A. lesbiacum*, *A. murale* türleri için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Gabrielli ve arkadaşları'nın (1990) yaptığı çalışmada *Alyssum* cinsinin metal biriktiren türlerinin aynı metalle kirlenmiş topraklarda yetişen ve biriktirme özelliği olmayan türlere oranla nikel çok daha fazla müsamaha gösterdiği bulunmuştur (Wenzel et al, 1997). Bir metal biriktirici bitkinin yapraklarında var olan yüksek nikel derişimleri bitki içinde bu metalin zehirli etkisini yok eden bir sistemin varlığını göstermektedir. Nitekim metal biriktiricilerin bu mekanizmasında rol alan bileşikler arasında düşük moleküler ağırlıklı ileticilerden Lee ve ark.'na (1978) göre sitrat ve serbest histidinin büyük önemi olduğu görülmüştür (Kramer et al, 1996).

Mikroorganizmalar ve bitkiler ağır metal zehirlenmesini önlemek için çok çeşitli mekanizmalara sahiptirler. Örneğin özellikle *Eubacteria*'da görülen aktif metal taşınması, mavi yeşil algler, fungi ve bitkilerde görülen metalotionein gibi metal bağlayan peptidlerin sentezi, bitkiler ve bazı fungilerde görülen metal tutucu ajanlar, fungiler ve bitkilerde görülen vakuoler kompartmanlaşma ve serbest metal iyonlarının hücre dışı tutulmasını da içeren birçok yöntem (Schat et al, 2000). Genel olarak metalce zengin ortamlarda yaşayan suş ve ekotipler yüksek metal toleransı için adaptasyon sağlamışlardır. Ağır metallere tolerans daha çok bakterilerde çalışılmıştır. Bakterilerde tolerans plazmitlerle kodlanan metal iletim sistemlerine ve metal redüktaz aktivitelerine bağlıdır. Bitkilerde ve fungilerde tolerans mekanizması genel olarak bilinmemektedir. Dolayısıyla metallerle kirlenmiş toprakların bitkisel geri kazanımla iyileştirilmesi amacıyla genetik mühendisliği ile bitkiler

geliştirilebilmesi, ancak metal tolerans, biriktirme ve iletim mekanizması daha iyi anlaşıldığı zaman mümkün olacaktır (Chaney et al.1997).

1960'lerde, doğal populasyonlarda var olan oldukça yüksek orandaki polimorfizmlerin fark edilmesi ve başarıyla kullanılmaya başlanması moleküler biyolojide kaydedilen gelişmelerin en önemlilerindendir. Polimorfizmlerin kaynağı DNA dizi değişiklikleridir. Yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve parça yerleşmeleri ile meydana gelir ve genleri, onların düzenlenmelerini, biyokimyayı, gelişmeyi, morfolojiyi, davranışı etkileyeceğinden evrim sürecinde fenotipik varyasyonun da kaynağıdır (Britten, 1986).

Türler arasındaki genetik çeşitliliğin incelenmesi, kalite ve verim yönünden yüksek potansiyele sahip, hastalıklara dayanıklı türlerin geliştirilebilmesi için ıslah programlarının her aşamasında kullanılan materyalin özelliklerinin çok iyi bilinmesi gerekir. Islah çalışmalarını daha az masraflı ve daha kısa sürede istenilen sonuçların elde edilebileceği duruma getirebilmek için morfolojik veriler, C bantlama, G bantlama gibi kromozomal çeşitliliklerin incelenmesiyle oluşan sitolojik veriler, izoenzimler, tohum depo proteinleri gibi biyokimyasal markırlar ve RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), SSR (Self Sustained Sequence Replication), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) gibi moleküler markırlar başarıyla kullanılmaktadır (Stuber, 1992).

Sistematik veriler oluşturmak amacıyla yapılan ilk moleküler çalışmalar izoenzimler, proteinler gibi biyokimyasal markırlar üzerine yoğunlaşmıştır. Morfolojik ve agronomik özellikler çevresel faktörlerden etkilenebilme özelliğinde olduğundan ve bu nedenle gerçek anlamda bir genetik benzerlik ya da farklılığı ortaya koyamayacağından biyokimyasal genetik markırlar oldukça avantajlıdır (Crawford, 2000).

Bir enzimin aynı kimyasal reaksiyonu katalize eden fakat molekül yapıları ve özellikle taşıdıkları elektrik yükleri farklı olan çeşitli formlarına izoenzim denir

(Ozban, 1988). Smith (1988) ve Wilson (1988)' a göre izoenzim analizleri biyokimyasal genetik markırlar geliştirmenin yollarından biridir. İzole edilen ve elektroforetik hareketliliklerine göre farklılık gösteren enzimler arasındaki polimorfizmin belirlenmesine dayanır (Andersen and Fairbanks, 1990).

Chen ve arkadaşları (1991), izoenzim analizlerini fungi sistematğinde kullanmışlardır ve genetik varyasyonun incelenmesinde daha basit ve ucuz bir yöntem olduğunu belirtmektedirler. Morfoloji ve farklı sıcaklıklarda gelişebilme özelliğı, önemli bir bitki patojeni olan *Pythium* türlerinin taksonomik problemlerini çözmeye yetmemiştir, nitekim türler arasındaki varyasyonun derecesi izoenzimlerden yararlanılarak tespit edilmiştir (Barr et al, 1996). Bu sayede fungilerin virulans etkileri ve diğ er özelliklerindeki potansiyel varyasyonlar en aza indirilebilir (Vogler et al, 1996).

İzoenzimlerden yararlanılarak bitkilerin de genotipik çeşitlilikleri araştırılmıştır. Taksonomisi oldukça güç olan *Pleurothallis (Orchidaceae)*' in bazı türleri için gerçekleştirilen izoenzim analizinde türlerin hepsinin de kendi kendine tozlaşmayı mümkün kılan yapıda olduğu halde küçük sineklerle tozlaştıkları ve türler arasındaki genetik varyasyonun da yüksek olduğu görülmüştür (Borba et al, 2001).

İzoenzim analizleri diğ er metotlarla karşılaştırıldığında daha hızlı ve daha ekonomik bir metot olmasına rağmen, deneyler için taze materyale ihtiyaç duyulması, polimorfizmleri tam olarak tespit edememesi, analiz için daha az sayıda lokus ve allel kullanması ve markır belirlenmesi için birlikte çok çeşitli metotlar denenmesi gerektiğ inden kullanımı sınırlıdır (Bernatsky and Tanksley, 1989).

Tohum protein profilleri genetik homolojinin moleküler seviyede araştırılması, taksonomik ve filogenetik problemlerin çözülmesinde kullanılan güçlü bir tekniktir (Singh et al, 1991). Son yıllarda türlerin ve tarım mahsullerinin tanımlanmasında tohum depo proteinlerinin analizi özel bir uygulama bulmuştur. Tüm dünyada ekilip biçilen tür ve varyetelerin artan sayısı, bitki çeşitliliğ inin güvenilir bir ayrımının sağlanabilmesi için biyokimyasal işlemlerin de gelişimini uyarmıştır. Özellikle

HPLC, SDS-PAGE, HPCE, IEF-PAGE gibi yöntemler hem monokotiledonların hem de dikotiledonların tanımlanmasında kullanılmakta olan yöntemlerdir. Tohum depo proteinlerinin, elektroforezinin geleneksel morfolojik yaklaşımlara göre avantajı, gelişme mevsimlerinden bağımsız olması, bitkilerin yetiştirilmesine gerek olmaması, materyalin tüm yıl boyunca elde edilebilir olması, hızlı analiz edilebilmesi, saklanmasıdaki kolaylıklar ve ihtiyaç duyulan örneğin az olmasıdır. Denatüre olmuş proteinlerin incelenmesindeki diğer bir avantaj da tohum direncinden ve fizyolojik tohum faaliyetinden bağımsız sonuçların elde edilebilmesidir. Yüksek veya düşük direnç gösteren tohumların elektroforetik sonuçlarının aynı olduğu hatta kurumuş tohumların bile incelenbildiği gözlenmiştir (Dinelli and Lucchese, 1999).

Poliakrilamid jel elektroforezi çeşitlerinden olan SDS-PAGE, proteinlerin analizinde, protein saflığını ve moleküler ağırlığını belirlemede kullanılır. SDS-PAGE' ine tabi tutulacak örnekler öncelikle iyonik olmayan bir deterjan olan SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ve β -merkaptotanol içeren tamponda kaynatılır. Merkaptotanol protein tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid köprülerini indirger, SDS de proteine sıkıca bağlanarak denatüre eder ve molekül üzerindeki doğal yükü de değiştirerek tamamen (-) yüklü yapar. Böylece SDS, şarj yoğunluğundan ve şekilden kaynaklanan etkileri ortadan kaldırarak ayrımı sadece moleküler ağırlığa bağlı olarak gerçekleştirir (Dunn, 1993).

Mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılmasında total hücre proteinlerinin SDS-PAGE' i oldukça yaygın bir yöntemdir. Standart koşullarda gelişme gösteren bir bakteri suşu her zaman aynı grup proteinleri üretmektedir. Buna dayanarak, yoğurt ve peynirden izole edilen *Lactobacillus delbrueckii* ve *Streptococcus salivarius* suşlarının tanımlanması SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir (Tskalıdou et al, 1992).

SDS-PAGE' in mikroorganizmalara ilave olarak bitkilerde de kullanımı oldukça yaygındır. SDS-PAGE olgunlaşmamış *Brassica napus* embriyolarının, yapay ortamda farklı derişimdeki çimlenme inhibitörlerinin varlığında ve yokluğundaki

embriyogenez süreçlerinin, tohum depo proteinlerinin biriktirilmesi bakımından karşılaştırılması için kullanılmıştır (Crouch and Sussex, 1981).

SDS-PAGE ile elde edilen dendrogramlar bugüne kadar *Arachis* türlerinin farklı yönlerini çalışmak amacıyla kullanılmıştır; örneğin Cherry (1975) tarafından proteinlerin genel özelliklerini belirlemek amacıyla, Basha (1979) tarafından ekinlerin tanımlanmasında, Yamada ve ark (1980)' nın çalışmasında tohum gelişimini incelemek için, Shokran ve ark (1985) tarafından proteinlerin diğer genetik özelliklerle ilgisini araştırmada, Krishna ve Mitra' nın (1987) yapmış olduğu çalışmada tohum protein polimorfizmi için ve Klotzova ve ark (1983) tarafından da türlerin karşılaştırılması için kullanılmıştır. Son zamanlarda ise *Arachis* cinsi içindeki çeşitliliği değerlendirmek ve protein kompozisyonuna dayalı olarak sınıflandırma yapabilmek amacıyla Güney Amerika'da yetişen 55 tür SDS-PAGE kullanılarak tohum depo proteini kompozisyonu bakımından karşılaştırılmıştır (Hall et al, 1993). Protein profilleri evrim süreci içerisinde çok az değişikliğe uğramaktadır (Singh et al, 1994).

Sesbania cinsine ait bazı türlerin tohum protein profilleri SDS-PAGE ile incelenmiş ve 15 türün, türe özel protein profiline sahip olduğu gözlenmiştir (Saraswati et al, 1993). Kuzey Amerika' da doğal olarak yetişen *Festuca* (*Poaceae*)' ye ait bazı türler dahil olmak üzere, birçok ot cinsindeki taksonomik problemler depo veya enzimatik özelliğe sahip tohum proteinlerinin elektroforetik bantlanmalarının incelenmesi ile çözüm bulmuştur (Aiken and Gardner, 1991).

Festulolium hibridleri; mesela *Lolium multiflorum* ve *Festuca pratensis*' in çaprazlanması örneğinde olduğu gibi hayvan yemi olarak kullanılan otların ıslahında, kış şartlarına dayanıklı, devamlı ve hastalıklara dayanıklı çeşitler elde etmede büyük önem taşımaktadır, fakat çoğu zaman atasal türlerinden, morfolojik, fizyolojik veya kromozomal özelliklerine dayanarak net olarak bir ayırmaları yapılamamaktadır. SDS-PAGE *Festulolium*' un araştırılmasında ve farklı hibridlerin birbirlerinden ayrılmasında kullanılmıştır (Hahn and Schoberlein, 1999).

Bitki biyoteknolojisindeki başarılar, bitkilerde kaydedilecek moleküler ilerlemeler için, bitki gelişiminin moleküler temelini çok iyi anlaşılması gerektiğini ve tarımsal bakımdan önemli çoklu genlerce kontrol edilen özellikleri düzenleyen genlerin tanımlanmasının gerektiğini göstermiştir (Phillips and Vasil, 1994). Bu amaçla moleküler genetikte son birkaç yılda gerçekleştirilen atılımlar, bilim adamlarını yeni birçok teknikler aracılığı ile bitki kaynaklarını korumaya yönlendirmiştir. Gen dizilerindeki farklılıklar daha önceleri erişilmesi mümkün olmayan bir kesinlikte doğrudan olarak gözlenebilmekte ve yorumlanabilmektedir. Geliştirilen teknikler aynı zamanda varyasyonların, türlerin gen havuzlarındaki boyutunu ve dağılımını çalışmak, ayrıca evrimsel ve taksonomik soruları araştırmak için de kullanılmaktadır (Karp and Kresovich, 1997).

DNA' ya dayalı markırlar kromozomları çok küçük bölgelere kadar inceleyebilmemizi sağlamış, haritalara dayalı klonlamalar ve bitki ıslahı için yeni fırsatlar vermiştir. Geçmişte hakkında çok az genetik bilgi edinebildiğimiz cinsler yüzlerce genetik markıra sahip olmuştur. Bazı durumlarda bir cins için oluşturulan haritalar neredeyse tümüyle diğer bir cinse nakledilebilmektedir (Phillips and Vasil 1994).

DNA' ya dayalı markırlar tamamen çevresel etkilerden uzak olduğundan ve bütün genomu temsil ettiğinden oldukça güvenilir metotlardır. Faivre-Ramptant ve ark (1992), tarafından evrim çalışmalarında, Das ve ark (1999), tarafından ıslah çalışmalarında, Rao ve ark (1996), tarafından mahsüllerin geliştirilmesinde, Reamon-Buttner ve ark (1998), tarafından da bitki sistematğinde ve son zamanlarda tarımsal önemi olan özellikleri kodlayan genlerin belirlenmesinde oldukça kullanışlı metotlar oldukları belirtilmiştir. Bunlardan bazıları RFLP, AFLP, RAPD gibi yöntemlerdir (Rajagopal et al, 2000).

RFLP analizlerinin esası DNA fragmentlerinin kesim yerlerindeki genetik polimorfizmin belirlemesine dayanır ve bu yöntem izozimler ya da diğer protein markırlardan daha çok polimorfizm belirler. RFLP analizleri birçok önemli türün üst düzeyde genetik haritalarının oluşturulması için ve markıra dayalı seleksiyon

alışmalarında moleküler markırların, agronomik özelliklerle birleştirilmesiyle bitki ıslahının etkililiğini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Andersen and Fairbanks, 1990).

RFLP' nin gerçekleştirilmesi Zabeau & Roberts' a (1979) göre bireyden DNA' nın özütlenmesi ve saflaştırılmasından sonra DNA molekülü boyunca yer alan kesim bölgelerinin özel dağılımına göre uzunlukları değişen bir restriksiyon fragmenti karışımı oluşturmak amacıyla DNA' nın restriksiyon endonukleazlarla kesilmesine dayanır. Bireyler arasındaki DNA nükleotit dizisinde yer alan genetik varyasyon, DNA molekülü üzerinde yer alan kesim bölgelerinin de özel bir dağılımı olacağı anlamına gelmektedir. Restriksiyon fragmentleri, uzunluklarına göre jel elektroforezi ile ayrılırlar. Fakat buna rağmen karyotik DNA' da doğrudan fragment uzunluk dağılımındaki farkları gözlemek mümkün değildir çünkü oluşan oldukça fazla miktardaki fragmentler jel üzerinde yayılırlar. Bu yüzden Southern'ın (1975) geliştirmiş olduğu teknikle fragmentler jelden nitroselüloz membran gibi katı bir yüzeye aktarılır. Daha sonra fragmentler, tüm fragmente ya da bir bölgesine özgü etiketlenmiş bir DNA probuna hibridize edilerek belirlenebilirler. Yüksek derecede tekrarlı DNA dizileri içeren DNA probları jel üzerinde daha fazla miktarda DNA fragmenti ile hibridize olacağından ve otoradyografide seilemeyeceğinden, RFLP' leri seçebilmek için prob olarak zel DNA dizileri seçilir. Prob ile hibridize olan DNA fragmenti otoradyografi ile tespit edilir ve film üzerinde bir bant şeklinde görülür. Eğer iki birey bir kesim bölgesi bakımından fark gösteriyorsa bu proba homolog olan zel DNA bölgesinin de uzunluğunu etkileyecektir dolayısıyla bant farklı pozisyonda olacaktır (Beckmann and Soller, 1986).

Bitki genetik kaynaklarının özelliklerinin belirlenmesinde RFLP kullanılmasının en önemli dezavantajı materyallerin ve harcanan emeğin maliyetidir. zelliklerin belirlenmesi için ihtiyaç duyulan seviyede RFLP verisi elde edebilmek amacıyla RFLP analizlerine adanmış bir laboratuvara gerek vardır ve geniş miktarlarda türler tanımlanacaksa materyal ve emeğin maliyeti sınırlandırıcı faktörler olabilir (Andersen and Fairbanks, 1990). RFLP analizlerini gerçekleştirmenin teknik

karmaşıklığı yanında diğer bir dezavantajı da tanımlama aşamalarında kısa ömürlü radyoizotopların geniş oranda kullanılıyor olmasıdır (Waugh and Powell, 1992).

Polimeraz zincir reaksiyonu son yıllarda moleküler biyoloji araştırmalarını diğer tekniklerde olduğundan çok daha fazla etkilemiştir. PCR sayesinde RFLP' nin prob hibridizasyonuna dayalı bir çok zorluklarının üstesinden gelinmiştir (Karp and Kresovich, 1997). Polimeraz zincir reaksiyonu bilinen iki dizi bölgesi arasında kalan bir DNA segmentini çoğaltmak için kullanılan bir yöntemdir. DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik reaksiyon için iki oligonukleotit primer olarak kullanılır. Bu oligonukleotitler kalıp DNA' nın karşılıklı zincirleri üzerinde yer alan uç DNA bölgelerine tamamlayıcıdır. Kalıp DNA öncelikle iki oligonukleotitin yüksek miktarlarının ve dört dNTP' nin varlığında denatüre edilir. Daha sonra reaksiyon karışımının sıcaklığı iki oligonukleotit primerin hedef dizilerine birleşmesini sağlayan bir sıcaklığa indirilir ve ardından birleşen primerler DNA polimeraz yardımıyla uzatılır. Daha sonra denatürasyon, birleşme ve DNA sentezinden oluşan döngü birçok kez tekrar edilir, çünkü bir amplifikasyon sonucu oluşan ürünler diğer amplifikasyon için kalıp görevi yapmaktadır ve her başarılı döngü ihtiyaç duyulan DNA ürün miktarını ikiye katlar. Reaksiyonların temel ürünü, sonlanmaları oligonukleotit primerlerin 5' uçları ile biten ve uzunluğu primerler arası uzaklıkla belirlenen çift zincirli DNA segmentleridir (Şekil 1.1)

Saiki ve ark (1985) tarafından polimeraz zincir reaksiyonunda primerlerin uzamasını sağlaması için *E. coli* DNA polimeraz I' in Klenow fragmenti kullanılmıştır. Bu enzim DNA' nın denatüre olması için gerekli sıcaklıklarda aktifliğini kaybettiğinden her sentez döngüsünde yeniden enzim ilavesine ihtiyaç duyulmaktaydı. Bu reaksiyonlar küçük DNA segmentlerinin amplifikasyonunda iyi sonuç verdiği halde daha büyük segmentlerde başarısız olunmuştur. Bu problemler yine Saiki ve ark (1988) tarafından termofilik bakteri *Thermus aquaticus*' tan saflaştırılan sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla çözüme kavuşmuştur. Bu enzim denatürasyon basamağında sıcaklıktan etkilenmemektedir dolayısıyla her döngüde yeniden ilave edilmesine de gerek yoktur.

Çoğaltılmamış DNA

Hedef dizi

Döngü 1

Denatürasyon ve primer birleşmesi

Primer uzaması

Döngü 2

Denatürasyon ve primer birleşmesi

Primer uzaması

3' ten 20' ye kadar döngüler

Yaklaşık 1 milyon kez çoğaltma

Şekil 1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Keşfinden bu yana PCR; Engelke ve ark (1988) tarafından genetik bozuklukların teşhisinde, Ou ve ark (1988) tarafından klinik örneklerdeki patojen organizmaların nükleik asit dizilerinin belirlenmesinde, Higuchi ve ark (1988) tarafından adli örneklerin genetik tanımlanmasında, Farr ve ark (1988) tarafından aktif onkogenlerdeki mutasyonların analizlerinde kullanılmış olması örneklerinde olduğu gibi üst düzeyde uygulama alanları bulmuştur (Maniatis et al,1989).

Moleküler sistematik ve bitki genom haritalarının çıkartılmasında diğer bir dönüm noktası rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR)' nun Williams ve ark (1990); Welch ve McClelland' ın (1990) laboratuvarlarında geliştirilerek günümüze kadarki süreçte başarıyla kullanılmasıdır (Burr, 1994). RAPD-PCR tekniğinde, PCR' da olduğu gibi özel bir hedef dizinin amplifikasyonu için itina ile hazırlanmış uzun oligonukleotit primerler yerine, bitki genomu gibi büyük DNA kalıplarından, rastgele diziler çoğaltabilmek için birçok farklı lokusa bağlanabilen kısa primerler kullanılır (Waugh and Powell, 1992).

Williams' a göre (1990), RAPD-PCR için bireyler arasındaki varyasyon muhtemelen primer bağlanma bölgesini değiştiren veya çıkartan baz çifti yer değişimleri, veya parça eksilmelerinden ya da genomik dizide primer bölgelerini amplifikasyona izin vermeyecek kadar ayıran parça yerleşmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu değişikliklerin her birisi özel bir RAPD fragmentinin varlığı veya yokluğu ile sonuçlanır. Bu sebepten RAPD' ler F_2 populasyonlarına dominant olarak, 3:1 dağılım oranlarında aktarılırlar. Nadir olarak bir RAPD lokusundaki varyasyon, bir DNA fragmentinin varlığı veya yokluğundan çok büyüklüğünde değişim ile sonuçlanır; bu durumda kodominant kalıtım beklenir. RAPD' lerin RFLP ve izozimlere göre birçok avantajları vardır. RAPD' ler yoğun laboratuvar çalışmaları ve Southern transferler, filtre hibridizasyonları, otoradyografi gibi pahalı yöntemler gerektirmez. Herhangi bir genomik kütüphane oluşturulmasına gerek yoktur. RFLP analizlerinde olduğundan çok daha az miktarda genomik DNA' ya ihtiyaç duyulur. RAPD' ler izozimlerden farklı olarak genom boyunca sınırsız sayıda markır elde edilmesini sağlarlar. Türler arası ve tür içinde RFLP ve izozimlerin sağladığından çok daha fazla polimorfizm kaydedebilmektedir (Whitkus et al., 1994).

Epidemiyolojide ve ekolojide bakteri tür ve suşlarını doğru olarak tanımlamak çok önemlidir. Bakterilerin hızlı tanımlanması ve sınıflandırılması normalde morfoloji, besin ihtiyaçları, antibiyotik dirençlilikleri, izozim karşılaştırmaları, faj duyarlılıkları ve son zamanlarda da özellikle rRNA dizileri, PCR gibi DNA'ya dayalı metotlar ile yapılmaktadır (Welsh and McClelland, 1990).

İki atasal türün birleşmesiyle oluşan ancak her ikisinden de daha verimli hibridlerin geliştirilmesi için, ağaç geliştirme programları uygulanmaktadır. Hibridlerin dirençliliği ise çaprazlamada kullanılan atasal türlerin yapısına bağlıdır. Genetik olarak farklı atasal türlerin, daha dirençli hibridler verdikleri bilinmektedir. Dolayısıyla farklı klonların sistematik olarak değerlendirilmesinde markır sistemleri oldukça önemli bir paya sahiptir. Moleküler markırlar çevresel faktörlerden, bitkilerin gelişme dönemlerinden, kullanılan bitki materyalinin türünden etkilenen protein ve morfolojik markırlara göre yüksek derecede güvenilirdir. Bu amaçla kavak ağaçları üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmektedir (Rajagopal et al, 2000).

Günümüzde çiçek endüstrisinin ekonomik önemi oldukça artmıştır. Karanfil ve gül, geliştirilmiş özelliklere sahip yeni varyetelerin oluşturulmasında önemli hedef bitkilerdir. Son yıllara kadar ekonomik olarak önemli çeşitlerin belirlenmesi ve ıslahı tamamen klasik tekniklere dayalı olarak gerçekleştirilmekteydi. Ancak moleküler genetik markırların kullanılmaya başlanması ile genetik varyasyonların belirlenmesi sayesinde bu sahada önemli gelişmeler yaşanmıştır (Tzuri et al, 1991).

Güney Amerika'da yetişen ve renklendirmede, kozmetikte, tıpta kullanılan bir tür olması münasebetiyle sosyoekonomik önem taşıyan, ancak biyolojisi ve genetik özellikleri bugüne kadar pek araştırılmamış bir tür olan *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae)'in populasyon içi ve populasyonlar arası genetik farklılıkları RAPD-PCR tekniği kullanılarak, türün coğrafik dağılıma göre değerlendirilmiştir (Gauer and Molina 2000).

Aveneae evrim sürecinde kromozomların yapısal farklılaşmasının diploid seviyede oldukça önemlidir ve *Avenea* karyotiplerine ve hibridlerindeki eşleşme

davranışlarına göre sitolojik açıdan yedi ayrı genoma sınıflandırılabilir. Ana kromozom farkları, çaprazlamalardaki hatalardan dolayı en çok A ve C genomlarına ait türler arasında görülmektedir. Bivalentlerin ve multivalentlerin seviyesinden ve karşılıklı parça değişimi oranlarından ölçüldüğü kadarıyla, DNA dizi homolojisi ile kromozom eşleşmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir. *Avena* cinsinin A genomuna dahil diploid türleri arasındaki moleküler markır uzaklığının karyotipik farklılıklarla aynı olup olmadığını belirlemek ve tekrarlı DNA dizileri bakımından oldukça zengin bir tür olan yulafta RFLP, RAPD' ler sayesinde tür içi ve türler arası ilişkileri göstermek için çalışmalar yapılmıştır (Nocelli et al, 1999).

Ekinlerin geliştirilmesi programlarında markıra dayalı seleksiyon araçlarının kullanılabilmesi için genetik bağlantı haritalarının kurulması çok gereklidir. *Arachis hypogaea* L. üzerine yapılan çalışmada birçok morfolojik, fizyolojik ve diğer özellikler bakımından çeşitliliği temsil etmesi için seçilmiş 70 genotipe RAPD-PCR uygulanmıştır. Yer fıstığındaki polimorfizmlerin belirlenmesi, DNA polimorfizmi gösteren genotipleri dikkatli seçimi sayesinde bir moleküler harita oluşturulması imkanını ortaya koyar (Subramanian et al, 2000).

RAPD-PCR populasyon genetiği çalışmalarında bireyler arası genetik farklılıkların potansiyel olarak çözümlenmesini arttıran bir metottur ve artan oranlardaki bireysel genomlar bağlantı dengesizliği bakımından anında gözlenebilmektedir. RAPD' nın populasyon genetiğindeki dezavantajı ise dominant markırlar olarak ayrılan allellerin yoğunluğudur. RAPD-PCR, amplifikasyonu yapılabilecek herhangi bir allel için hem homozigot hem de heterozigot olan bireylerden alınan kalıp DNA ile ürün verir, ancak homozigot resesif bireylerde fragment oluşmaz. Dominantlık populasyonlar içinde rastgele birleşmeyi engeller, çünkü bireysel genotipler ayırt edilemez (Apostol et al, 1996).

Afgeika sericea Craib (*Leguminosae*) Tayland'da endemik bir türdür. Bitkinin doğal populasyonları ormanların yoğun tahribine bağlı olarak ortaya çıkan habitat kaybına karşı korumasızdır. Türün genetiği ve populasyon yapısı hakkında çok az bilgi vardır. Koruma biyolojisi sahasındaki artan ilgiyle beraber nadir türlerin populasyon

genetiği oldukça ilgi toplamıştır. Bitki korumanın temel amacı biyolojik çeşitliliği ve genetik çeşitliliğin muhafaza edilmesidir. *A. sericea* ile yapılan çalışmalarda RAPD-PCR metodu ile elde edilen genetik uzaklık verileri kullanılarak alt populasyonlar içinde ve arasındaki genetik farklılığın miktarı ve dağılımı belirlenmiş, genetik verilere dayanılarak bitkinin korunmasına yönelik önerilerde bulunulmuştur (Prathepha and Baimai, 1999).

İzozimler, DNA' ya dayalı polimorfizmler gibi genetik markırlar bitki grupları arasındaki ilişkileri belirlemede ve genetik varyasyon derecesini ortaya koymada oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu markırlar gen akışı, yığılması gibi seçici olmayan evrimsel güçlerin etkisini belirlemede oldukça faydalıdır ve az miktarda bitki dokusu gerektirirler. Tüm bunlara rağmen moleküler markırların dağılımının seleksiyon ile nasıl etkilendiği bilinmeden sağladıkları veriler güvenilir değildir, çünkü populasyonun kendi habitatında yaşamını sürdürmesinde kritik rol oynayan önemli karakter özellikleri hakkında bilgi veremezler. Bazı durumlarda populasyonları arasında düşük seviyede moleküler genetik farklılık gösteren bitki grupları arasında yüksek seviyede morfolojik genetik farklılıklar bulunabilir (Olfelt et al, 2001).

Brassicaceae familyası agronomik açıdan oldukça önemli birçok türler ve moleküler açıdan model teşkil eden *Arabidopsis thaliana*' yı içerdiği halde familyada filogenetik ilişkiler çok iyi anlaşılmamıştır. Birçok araştırmacı tarafından *Brassicaceae* familyası gruplara ayrılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar genel olarak meyve şekli, embriyo ve kotiledonların pozisyonu gibi az sayıda morfolojik bazı özelliklere dayalıdır. Kloroplast DNA markırları kullanılarak yapılan analizler grupsal ilişkilerin oldukça yapay olabileceğini göstermiştir. Lepididae ve Arabideae gruplarının polifiletik olduklarını göstermek amacıyla çekirdek genomunda ve kloroplast genomunda kodlanan bölgeler çalışılmıştır (Koch et al, 2001).

Hibrid *Brassica* sebze tohumlarının üretiminde, F_1 hibrid tohumlarının genetik saflığının belirlenmesi, beklenmeyen kontaminasyonların önlenmesi için bir kalite kontrol gerekliliğidir. *Brassica oleraceae* lahanası, brokoli, karnabahar gibi

birçok önemli sebzeyi içerir ve bu *Brassica* sebzelerinden lahanada en çok yetiştirilenidir. Dolayısıyla ekonomik olarak da önemli bir sebzedir. *Brassica* sebzelerinin ticari üretimi genelde hibrid tohumlar aracılığı ile yapılmaktadır ve bu sayede daha üstün bitkiler elde edilmektedir. Hibrid tohumların üretimi atasal bitkilerin kendi kendilerine tozlaşmasının önlenmesi ile mümkün olabilecektir, aksi takdirde oluşacak tohumlar daha az dirençli, eşit olmayan, daha az ürün veren bitkiler verecektir. Ticari lahanada RAPD markırlarının hibrid tohum saflığını belirlemede kullanışlı bir metot olduğunu gösteren çalışmalar da yapılmıştır (Crockett et al, 2000).

RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemlerinin bir arada başarıyla kullanıldığı *Vicia sativa* agg. (*Fabaceae*) üzerine yapılan çalışmada RAPD' ler ve tohum depo proteinleri, *V. sativa* agg.' nin eski sovyetler birliğine dahil alanların farklı bölgelerindeki lokal populasyonları arasındaki genetik farklılıkları tanımlayabilmek için kullanılmıştır. Populasyonların taksonomik ifadesi ve coğrafik dağılımları ile DNA seviyesinde gözlenen genetik varyasyon ve tohum proteinlerinin ilişkisi belirlenmiştir (Potokina et al, 2000).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki materyali

Araştırmada materyal olarak kullanılan *Alyssum* cinsinin türlerine ait kuru yapraklar Gazi Üniversitesi herbaryumundan, tohum örnekleri ise Gazi Üniversitesi öğretim üyesi, Doç. Dr. Nezaket ADIGÜZEL' in koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.1.1.1. Tohum proteini ile çalışılan türler ve toplandıkları lokaliteler

- A. strigosum*: Ankara: Gölbaşı, Beynam ormanı, 1350 m, 16.vii.2000, N. Adıgüzel 3617
- A. murale*: Kütahya: Tavşanlı- Harmancık, 900 m, 23.viii. 2000, N. Adıgüzel 3654
- A. sibiricum*: Ankara: Gölbaşı, Beynam ormanı, 1400 m, 20.viii. 2000, N. Adıgüzel 3649
- A. sibiricum*: Kütahya: Tavşanlı- Harmancık, 900 m, 30.vii. 2000, N. Adıgüzel 3645
- A. sibiricum*: Ankara: Gölbaşı, Beynam ormanı, 1350 m, serpentin yamaç, 16.vii. 2000, N. Adıgüzel 3616
- A. sibiricum*: Kütahya: Tavşanlı- Harmancık, 900 m, 23.viii. 2000, N. Adıgüzel 3656
- A. pateri*: Ankara: Gölbaşı, Beynam ormanı, 1400 m, 20.viii. 2000, N. Adıgüzel 3650
- A. corsicum*: Kütahya: Tavşanlı, 1000 m, 23.viii. 2000, N. Adıgüzel 3653

2.1.1.2. Yaprak DNA' sı ile çalışılan türler ve toplandıkları lokaliteler

- A. huber-morathii*: Muğla: Köyceğiz, Sandras dağı, Alioğlu gediği, 1400 m, P. brutia açıklığı, 20. vii. 1999, N. Adıgüzel 3352

- A. huber-morathii*: Burdur: Salda gölü çevresi, 1400 m, serpantin, 6.ix. 1998, N. Adıgüzel 3096
- A. dudleyi*: Kütahya: Tavşanlı, 880 m, 29.vi. 2000, N. Adıgüzel 3521
- A. dudleyi*: Kütahya: Tunçbilek, 1040 m, 29.vii. 1998, R. Reeves (2045), A. Kruckeberg, N. Adıgüzel
- A. discolor*: Muğla: Marmaris, ultramafik topraklar, 10 m, 27.v. 1996, R. Reeves 1710
- A. davisianum*: Kütahya: Gediz, Kesitsöğüt, 1900 m, 30.vi.2000, N. Adıgüzel 3538
- A. sibiricum*: Kütahya: Kütahya-Eskişehir, 950 m, 30.vi. 2000, N. Adıgüzel 3544, 3545
- A. murale*: subsp. *murale* var. *murale*, Ankara: Kızılcahamam, Soğuksu Milli parkı, 1060 m, kayalık, 1.viii.1990, Ö.E 2013
- A. murale*: subsp. *murale* var. *murale*, Kütahya, Tunçbilek, R. Reeves (2036), 1000 m A. kruckeberg, N. Adıgüzel
- A. borzaenum*: Kütahya: Domaniç- Tavşanlı, 800 m, 2.vii. 1962, D. 36424
- A. cypricum*: Burdur: Dirmil geçidi, R. Reeves 1854
- A. cypricum*: Kıbrıs, Amiandos, 1300 m, 24. iv.1941, D.3207

2.1.2. Tampon ve çözeltiler

2.1.2.1. Protein izolasyonu için gerekli çözeltiler

- Ekstraksiyon tamponu: 0,5 M Tris-HCL (pH 6.8), %10 (w/v) SDS, 2-Merkaptoetanol, %74 (w/v) Üre, saf su.

2.1.2.2. Protein elektroforezi için gerekli çözeltiler

- Elektroforez stok tamponu: Tris, Glisin, %10 (w/v) SDS. (pH 8,3).
- %12'lik poliakrilamid jel: %29,2 (w/v) Akrilamid, %0,8 (w/v) N, N' Metilen-bis-akrilamid, 1,5 M Tris-HCL (pH 8,6), %10 (w/v) SDS, %10 (w/v) Amonyum persülfat, saf su, TEMED (N,N,N',N'Tetrametiletildiamin).
- Boyama çözeltisi I: %100 (w/v) TCA (Trikloroasetik asit), Metanol, saf su.
- Stok boya çözeltisi: Komassi brillant mavisi çözeltisi ile 2N HCl çözeltisi karıştırılır.
- Boyama çözeltisi II: Stok boya çözeltisi, 10 N KOH, %100 (w/v) TCA (Trikloroasetik asit).

2.1.2.3. DNA izolasyonu için gerekli çözeltiler

- Stok Tris çözeltisi: 500 mM Tris (pH 8.0).
- Stok EDTA tamponu: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra asetik asit disodyum tuzu), 5 M NaOH. (pH 8,0)
- Ekstraksiyon tamponu: 50 mM Tris (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl
- Fenol- kloroform (1:1) çözeltisi: Fenol ve kloroform 1:1 oranında karıştırılır.
- %99,5 Etanol
- TE Tamponu: 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8).

2.1.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler

- Nükleotit Karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- $MgCl_2$: 25 mM
- Taq polimeraz tamponu 10x: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 1 mg/ml jelatin.
- Taq polimeraz: 5 u/ μ l
- Primerler: Kullanılan primerler Çizelge 2.1' de verilmiştir.

2.1.2.5. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler

- Agaroz: %0,8 ve %2 (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanır.
- Tris asetat (TAE) tamponu: 242 g Tris base, 57,1 ml Glasial asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8), saf su.
- Yükleme tamponu: % 40 sukroz, % 0,025 bromfenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol
- Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlandı. Koyu renkli şişelerde muhafaza edildi.

2.1.3. Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler, 121 °C' de 20 dk sterilizasyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 2.1. RAPD-PCR’ da kullanılan primerler.

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5’.....3’)	% G+C İçeriği
A1	CAGGCCCTTC	70
A2	TGCCGAGCTG	70
A4	AATCGGGCT	60
A7	GAAACGGGTG	60
LA1	GGGTAACGCC	70
LA2	GTGACGTAGC	60
LA11	TTATGAAACGACGGCCAGT	47,4
LA12	ACGACCCACG	70
LA13	CACCACGCCT	70
LAI	GTGATCGCAC	60
LAIİ	GTTGCGATCC	60
RPOC1	AAGCGGAATTTGTGCTTGTG	45
RPOC2	TAGACATCGGTACTCCAGTGC	52,3
OPI18	TGCCCAGCCT	70
B4	GGACTGGAGT	60
B6	TGCTCTGCC	70
B7	GGTGACGCAG	70
B15	GGAGGGTGTT	60
B18	CCACAGCAGT	60
OPB08	GTCCACACGG	70
OPB10	CTGCTGGGAC	70
UTE	AGGCATCGTTGG	58,3
M13	GAGGGTGGCGTTCT	66,7
OPA07	GAAACGGGTG	60
SCI053	CAGGGGACGA	70
SCI038	GACCCCGGCA	80
SCI079	CGCCACGTTC	70
SCI091	CTCGACTAGG	60
OPO02	TACCTTCCGT	50
OPR03	ACACAGAGGG	60
OPW06	AGGCCCGATG	70
OPC02	GGTCTACACC	60
UBC372	CCCACTGACG	70
UBC373	CTGAGGAGTG	60
UBC378	GACAACAGGA	50
UBC379	GGGCTAGGGT	70
UBC435	CTAGTAGGGG	60
UBC440	CTGTCAACC	60
UBC441	CTGCGTTCTT	50
UBC586	CCGGTTCCAG	70
UBC587	GCTACTAACC	50
UBC589	GACGGAGGTC	70

2.2. Metot

2.2.1. Tohumdan toplam protein izolasyonu

Bitkilerin tohumlarından toplam protein izolasyonu Saraswati ve ark. (1992)’ nın kullanmış olduğu yöntem esas alınarak yapıldı. Bu amaçla her türe ait tohumlardan

40 mg tartılıp, havanda dövülerek toz haline getirildikten sonra 1,5 ml' lik ependorf tüplere alınarak üzerlerine 650 µl ekstraksiyon tamponundan ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında bir gece bekletildi. 3 dk kaynatıldıktan ve 10 000 rpm' de 10 dk santrifüj işleminden sonra üstte kalan sıvı kısımdan 15 µl alınarak SDS-PAGE' ne yükleme yapıldı.

2.2.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

Türlere ait toplam protein izolatlarına SDS-PAGE uygulaması, Laemli (1970)' nin önerdiği yöntem esas alınarak yapıldı. %12'lik poliakrilamid jel hazırlanıp, jelin donması için tetraetilen diamit (TEMED) ilave edildikten sonra cam kalıba (160 x 180 x 1.0 mm) döküldü ve 200 x 200 mm boyutlarındaki dikey elektroforez cihazına (Owl Separation Systems, P10DS, 147566) yerleştirildi. Elektroforez işlemi 20 mA sabit akımda, 16-18 °C sabit sıcaklıkta, izleme boyası jelden çıkana kadar (6-8 saat) devam etti. Jellerin boyanması Demirap ve ark (2000)' na göre gerçekleştirildi. Jeller %100 TCA (trikloroasetik asit) ve metanol içeren ilk boyama çözeltisine alındı ve bu çözeltide bir gece boyunca bekletildi. Jeller bu çözeltiden ikinci boyama çözeltisine nakledildi. Saf su ile birkaç kez yıkandıktan sonra fotoğrafları çekildi.

2.2.3. Bitki yapraklarından DNA izolasyonu

Her türe ait kuru yapraklar havanda dövülerek toz haline getirildikten sonra steril cam beherlere alınarak üzerlerine ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Bu karışım manyetik karıştırıcı ile +4° C' da 50 dk karıştırıldı. Homojenat steril eppendorf tüpüne alınarak +4°C, 10 000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan kısım temiz tüpe alındıktan sonra üzerine proteinlerin uzaklaştırılması için 1:1 oranda fenol kloroform ilave edildi vorteks işlemi uygulandı ve 3 dk 10 000 rpm' de santrifüjlendi. Fenol- kloroform ve sonraki aşamalar bir kez daha tekrarlandıktan sonra üst faz temiz tüpe alındı ve DNA presipitasyonu için üzerine etanol ilave edildi. Tüpler 0° C' da 20 dk bekletildikten sonra 10 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu

ve etanol kısmı atılarak %70' lik alkol ile yıkandı. Kurutulan tüplere TE tamponu ilave edildikten sonra -20°C ' da saklandı.

2.2.4. DNA derişim tayini

UV absorbans spektrofotometresi ile 260 nm ' de ölçüm yapıldı. Buna göre $A_{260} = 1$ olduğunda DNA miktarı $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ' dir. DNA saflığı için ise $A_{260}/A_{280} = 1,8$ formülü kullanılarak elde edilen değer $1,8$ ' e eşit ise saf DNA, $1,8$ ' den büyük ise saf olmayan DNA elde edildiğine karar verildi.

2.2.5. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD-PCR uygulamaları için Maniatis ve ark. (1989)' nın önerdiği yöntem kullanıldı. Çizelge 2.1' de baz dizilimleri ve % G+C oranları verilen rastgele seçilmiş primerlerin her biri ile hedef DNA' nın herhangi bir bölümü rastgele çoğaltıldı.

Uygulanan PCR programı:

96 °C' da	40 saniye	} 45 döngü
30 °C' da	40 saniye	
72 °C' da	40 saniye	

Elde edilen PCR ürünleri -20°C ' da saklandı ve agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

2.2.6. Agaroz jel elektroforezi

Kullanılan elektroforez (BIORAD) yatay konumda olup jel plaklarının büyüklüğü $70 \times 70\text{ mm}$ ' dir. %2 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra $1\text{ }\mu\text{l}$ etidyum bromür çözeltisi eklendi ve plağa döküldü. Jel polimerleştikten sonra $15\text{ }\mu\text{l}$ PCR ürünü ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara yüklendi ve $40-90\text{ V}$ arasında serbest akımda yürütüldü. Jeller UV translüminatör

(Vilber Lourmat) üzerinde görüntülendi ve fotoğrafları polaroid makine (DS34 Polaroid Direct Screen Instant Camera 100 x 81 mm) ile çekildi. Polaroid Studio B/W marka film kullanıldı.

2.2.7. Genetik uzaklık tayini

Bu çalışma boyunca her tür için her bir primer ile elde edilen PCR ürününün jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, bant varlığında 1, yokluğunda ise 0 olarak sayıldı. Türler arasındaki genetik benzerlik 'S' olarak adlandırıldı ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$S = 2 \times N_{AB} / N_A + N_B$$

N_{AB} : A ve B bireylerinin ortak bant sayısı

N_A : A bireyinin toplam bant sayısı

N_B : B bireyinin toplam bant sayısı

Bundan sonra D olarak adlandırılan türler arası genetik uzaklık $D = 1 - S$ formülüne göre hesaplandı ve SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapılarak dendrogramlar çıkartıldı (Wof and Rijini, 1993).

3. BULGULAR

3.1. Bazı *Alyssum* türlerinin tohum protein profili analizleri

A. corsicum NA 3653, *A. corsicum* NA 3653, *A. sibiricum* NA 3656, *A. sibiricum* NA 3616, *A. pateri* NA 3650, *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerinin tohum protein ekstraksiyonu yapıldıktan sonra (Saraswati et al, 1992), SDS-PAGE ile proteinler yürütüldü (Laemli, 1970). SDS-PAGE sonucunda elde edilen jellerin fotoğrafları Polaroid film kullanılarak çekildi (Şekil 3.1.). Sırasıyla *A. corsicum*, *A. corsicum* NA 3653, *A. sibiricum* NA 3656, *A. sibiricum* NA 3616, *A. pateri* NA 3650, *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerinin jel üzerinde oluşturduğu protein bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, her bir bantın, her tür için varlığı 1, yokluğu ise 0 olarak sayıldı. Türler arasındaki genetik benzerlik 'S' olarak adlandırıldı ve $S = 2 \times N_{AB} / N_A + N_B$ (N_{AB} : A ve B bireylerinin ortak bant sayısı, N_A : A bireyinin toplam bant sayısı, N_B : B bireyinin toplam bant sayısı) formülü kullanılarak hesaplandı.

Bundan sonra D olarak adlandırılan türler arası genetik uzaklık $D = 1 - S$ formülüne göre hesaplandı (Çizelge 3.1) ve SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapıldı (Şekil 3.2). Bu veriler ışığında değerlendirilen *A. corsicum* türünün sırasıyla *A. corsicum* NA 3653, *A. sibiricum* NA 3656, *A. sibiricum* NA 3616, *A. pateri* NA 3650, *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerine olan genetik uzaklığı; 0, 0,14, 0,14, 0,50, 0,14, 0,14, 0,47, 0,67' dir. *A. corsicum* NA 3653 türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3656, *A. sibiricum* NA 3616, *A. pateri* NA 3650, *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,14, 0,14, 0,50, 0,14, 0,14, 0,47, 0,56' dir. *A. sibiricum* NA 3656 türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3616, *A. pateri* NA 3650, *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerine olan genetik uzaklığı; 0, 0,50, 0, 0, 0,60, 0,67' dir.



Şekil 3.1. *Alyssum* türlerinin protein profilleri

Hat 1- *A. corsicum* NA 3653

Hat 2- *A. corsicum* NA 3653

Hat 3- *A. sibiricum* NA 3656

Hat 4- *A. sibiricum* NA 3616

Hat 5- *A. pateri* NA 3650

Hat 6- *A. sibiricum* NA 3645

Hat 7- *A. sibiricum* NA 3649

Hat 8- *A. murale* NA 3654

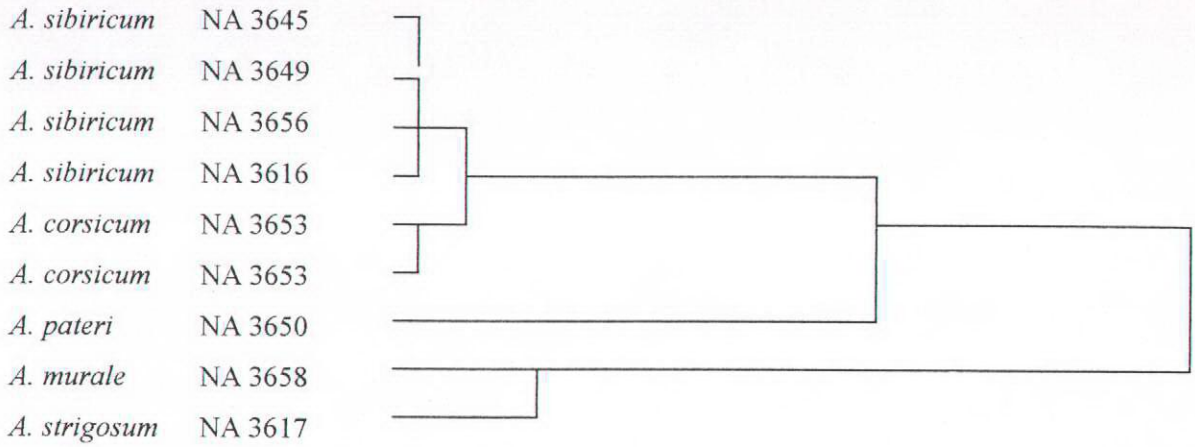
Hat 9- *A. strigosum* NA 3617

Hat 10- Marker (Miyozin (200.000 Da), β galaktozidaz (116,250 Da), fosforilaz b (97,400 Da), serum albumin (66,200 Da), ovalbumin 45.000 Da), karbonik anhidraz (31.000 Da), tripsin inhibitör (21.500 Da), lizozim (14,400 Da), aprotinin (6,500 Da))

A. sibiricum NA 3616 türünün sırasıyla *A. pateri* NA 3650, *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 0, 0, 0,60, 0,67' dir. *A. pateri* NA 3650 türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 0,50, 0,85, 0,87' dir.

Çizelge 3.1. *Alyssum* türlerinin protein profillerine göre genetik uzaklıkları.

	<i>A. corsicum</i> NA 3653	<i>A. corsicum</i> NA 3653	<i>A. corsicum</i> NA 3653	<i>A. sibiricum</i> NA 3656	<i>A. sibiricum</i> NA 3616	<i>A. pateri</i> NA 3650	<i>A. sibiricum</i> NA 3645	<i>A. sibiricum</i> NA 3649	<i>A. murale</i> NA 3654	<i>A. strigosum</i> NA 3617
<i>A. corsicum</i> NA 3653	0									
<i>A. corsicum</i> NA 3653	0	0								
<i>A. sibiricum</i> NA 3656	0.14	0.14	0							
<i>A. sibiricum</i> NA 3616	0.14	0.14	0	0						
<i>A. pateri</i> NA 3650	0.50	0.50	0.50	0.50	0					
<i>A. sibiricum</i> NA 3645	0.14	0.14	0	0	0.50	0				
<i>A. sibiricum</i> NA 3649	0.14	0.14	0	0	0	0.50	0	0		
<i>A. murale</i> NA 3654	0.47	0.47	0.60	0.60	0.60	0.85	0.60	0.60	0	
<i>A. strigosum</i> NA 3617	0.67	0.56	0.67	0.67	0.67	0.87	0.67	0.67	0.37	0



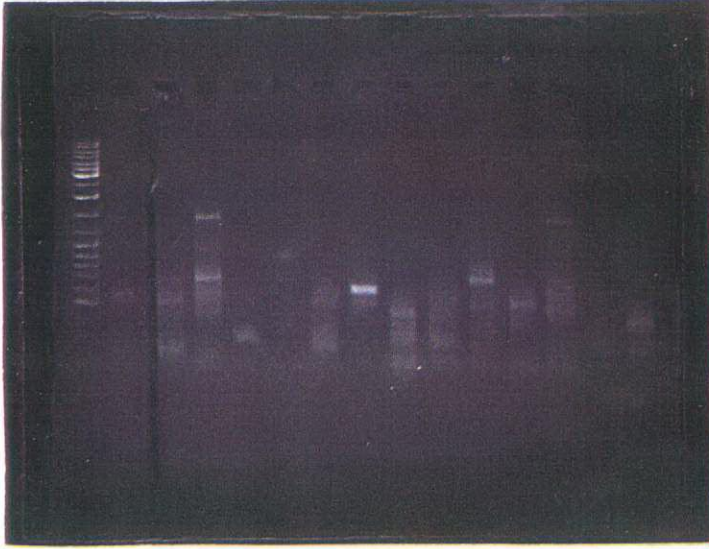
Şekil 3.2. *Alyssum* türlerinin protein profillerine göre genetik yakınlıkları

A. sibiricum NA 3645 türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerine olan genetik uzaklığı; 0, 0,60, 0,67' dir. *A. sibiricum* NA 3649 türünün sırasıyla *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,60, 0,67' dir. *A. murale* NA 3654 türünün *A. strigosum* NA 3617 türüne olan genetik uzaklığı; 0,37' dir.

3.2. *Alyssum* türlerine uygulanan RAPD-PCR yönteminden elde edilen sonuçlar

A. huber- morathii 1, *A. huber- morathii* 2, *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var. *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var. *murale* 2, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, türlerine ait bireylerden DNA izolasyonu yapıldı ve 42 ayrı rastgele primer ile RAPD-PCR denendi. Her türe ait farklı bireyler 1 ve 2 olarak numaralandırıldı. RAPD-PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez analizi sonucunda B6, OPB 08, B18, M13, OPI 18 primerlerinin polimorfik bantlar verdiği gözlemlendi.

B6 primeri ile yapılan RAPD-PCR sonucunda elde edilen ürünler jelde yürütüldü ve fotoğrafları Polaroid film kullanılarak çekildi (Şekil 3.3.). Türlerin jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, her bir bantın, her tür için



Şekil 3.3. *Alyssum* türlerinin B6 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri

Hat 1- DNA Ladder (en büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 100 bp)

Hat 2- *A. huber- morathii* 2

Hat 3- *A. huber- morathii* 1

Hat 4- *A. dudleyi* 1

Hat 5- *A. dudleyi* 2

Hat 6- *A. murale* subsp. *murale* var. *murale* 1

Hat 7- *A. murale* subsp. *murale* var. *murale* 2

Hat 8- *A. discolor*

Hat 9- *A. davisianum*

Hat 10- *A. sibiricum* NA 3544

Hat 11- *A. borzaenum*

Hat 12- *A. sibiricum* NA 3545

Hat 13- *A. sibiricum*

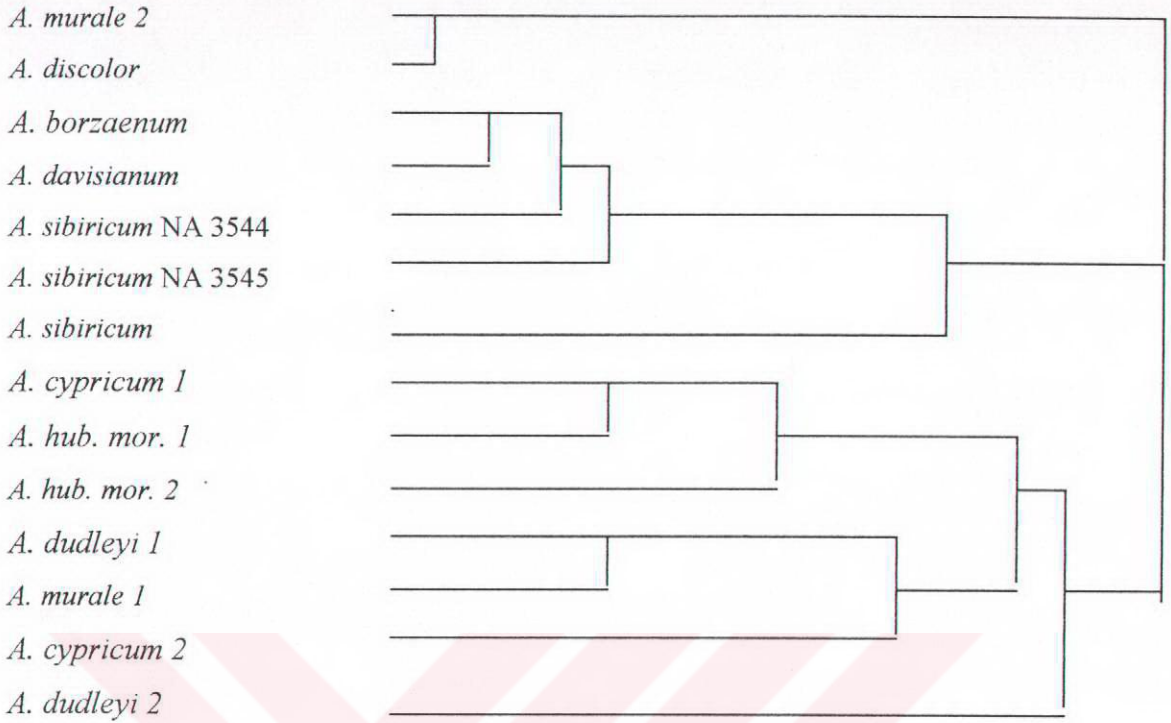
Hat 14- *A. cypricum* 1

Hat 15- *A. cypricum* 2

varlığı 1, yokluğu ise 0 olarak sayıldı ve genetik yakınlıklar hesaplandı (Çizelge 3.2.) SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapıldı (Şekil 3.4). Buna göre *A. huber- morathii* 2 türünün sırasıyla *A. huber- morathii* 1, *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var. *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var. *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1' dir.

Çizelge 3.2. B6 primeri ile yapılan RAPD-PCR' a göre *Alyssum* türlerinin genetik uzaklıkları

	<i>A. huber-morathii</i> 2	<i>A. huber-morathii</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 2	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var <i>murale</i> 1	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var <i>murale</i> 2	<i>A. discolor</i>	<i>A. davistanum</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3544	<i>A. borzaenun</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3545	<i>A. sibiricum</i> 1	<i>A. cyprium</i> 2
<i>A. huber-morathii</i> 2	0												
<i>A. huber-morathii</i> 1	0,50	0											
<i>A. dudleyi</i> 1	1	0,71	0										
<i>A. dudleyi</i> 2	1	1	1	0									
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var <i>murale</i> 1	1	0,60	0,67	1	0								
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var <i>murale</i> 2	1	1	1	1	1	0							
<i>A. discolor</i>	1	1	1	1	1	0,33	0						
<i>A. davistanum</i>	1	1	1	1	1	1	1	0					
<i>A. sibiricum</i> NA 3544	1	1	1	1	1	0,50	1	0,60	0				
<i>A. borzaenun</i>	1	1	1	1	1	1	1	0,60	0,50	0			
<i>A. sibiricum</i> NA 3545	1	1	1	1	1	1	1	0,60	0,50	0,50	0		
<i>A. sibiricum</i>	1	1	1	1	1	1	1	0,75	1	0,71	1	0	
<i>A. cyprium</i> 1	1	0,50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	



Şekil 3.4. B6 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre *Alyssum* türlerinin genetik yakınlıkları

A. huber- morathii 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi 1*, *A. dudleyi 2*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 1*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2*, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 0,71, 1, 0,60, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 0,50, 1' dir. *A. dudleyi 1* türünün sırasıyla *A. dudleyi 2*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 1*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2*, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,67, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 0,67' dir. *A. dudleyi 2* türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale 1*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2*, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1' dir. *A. murale* subsp. *murale* var *murale 1* türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2*, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1' dir. *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2* türünün

sırasıyla *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,33, 1, 0,50, 1, 1, 1, 1, 1' dir. *A. discolor* türünün sırasıyla *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1' dir. *A. davisianum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,60, 0,60, 0,60, 0,75, 1, 1' dir. *A. sibiricum* NA 3544 türünün sırasıyla *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 0,50, 1, 1, 1' dir. *A. borzaenum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 0,71, 1, 1' dir. *A. sibiricum* NA 3545 türünün sırasıyla *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 0,50' dir. *A. sibiricum* türünün sırasıyla *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1' dir. *A. cypricum* 1 türünün *A. cypricum* 2 türüne olan genetik uzaklığı; 1' dir.

OPB08 primeri ile yapılan RAPD-PCR sonucunda elde edilen ürünler jelde yürütüldü ve fotoğrafları Polaroid film kullanılarak çekildi (Şekil 3.5.). Türlerin jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, her bir bantın, her tür için varlığı 1, yokluğu ise 0 olarak sayıldı. Türler arasındaki genetik uzaklıklar her tür için hesaplandı (Çizelge 3.3.) ve SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapıldı (Şekil 3.6.). Buna göre *A. huber-morathii* 2 türünün sırasıyla *A. huber-morathii* 1, *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,33, 0,56, 0,60, 0,75, 1, 0,56, 0,80, 0,75, 1, 0,78, 0,60, 0,78, 0,71. *A. huber-morathii* 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,75, 0,78, 0,71, 1, 0,75, 0,78, 0,71, 1, 0,75, 0,78, 0,75, 0,67.



Şekil 3.5. *Alyssum* türlerinin OPB08 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri

Hat 1- DNA Ladder (en büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 100 bp)

Hat 2- *A. huber- morathii* 2

Hat 3- *A. huber- morathii* 1

Hat 4- *A. dudleyi* 1

Hat 5- *A. dudleyi* 2

Hat 6- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1

Hat 7- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2

Hat 8- *A. discolor*

Hat 9- *A. davisianum*

Hat 10- *A. sibiricum* NA 3544

Hat 11- *A. borzaenum*

Hat 12- *A. sibiricum* NA 3545

Hat 13- *A. sibiricum*

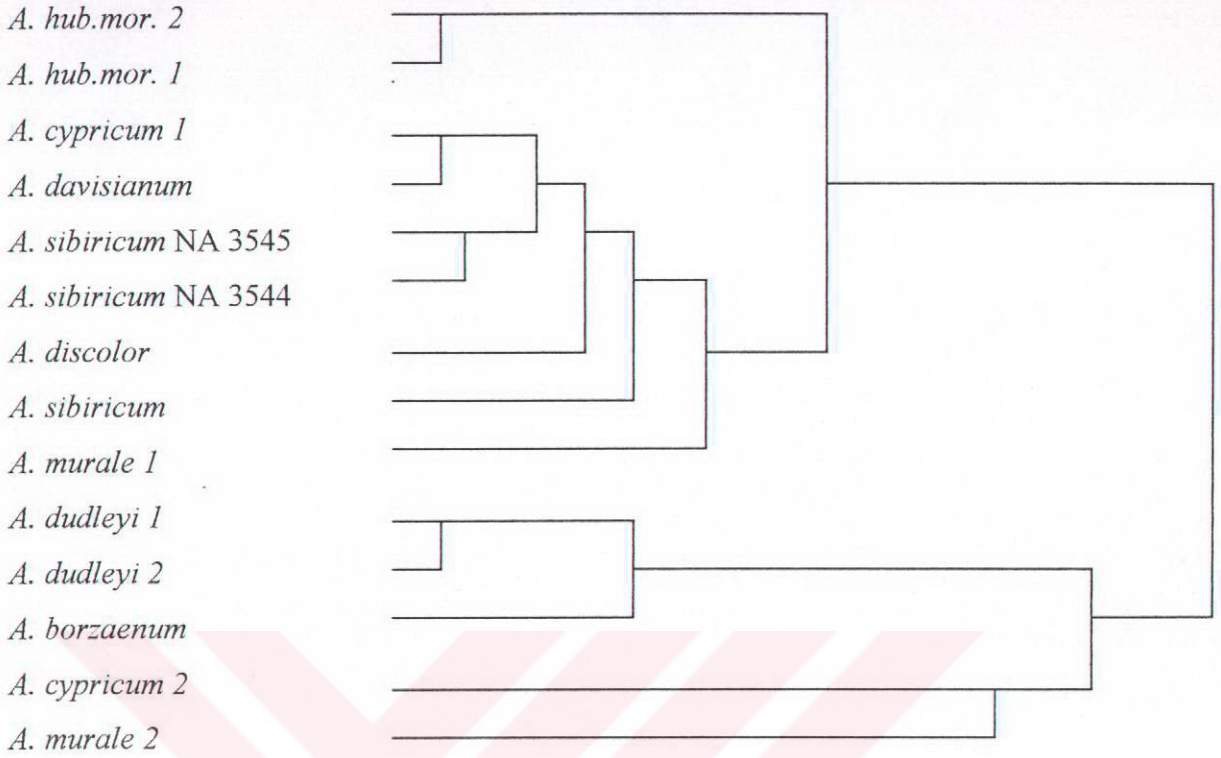
Hat 14- *A. cypricum* 1

Hat 15- *A. cypricum* 2

A. dudleyi 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,33, 1, 1, 0,50, 1, 1, 0,67, 1, 1, 1, 1. *A. dudleyi* 2 türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*,

Çizelge 3.3. OPB08 primeri ile yapılan RAPD-PCR' a göre *Ahyssum* türlerinin genetik uzaklıkları

	<i>A. huber-morathii</i> 2	<i>A. huber-morathii</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 2	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 1	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 2	<i>A. discolor</i>	<i>A. davisianum</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3544	<i>A. borzoi</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3545	<i>A. sibiricum</i>	<i>A. cypricum</i> 1	<i>A. cypricum</i> 2
<i>A. huber-morathii</i> 2	0													
<i>A. huber-morathii</i> 1	0,33	0												
<i>A. dudleyi</i> 1	0,56	0,75	0											
<i>A. dudleyi</i> 2	0,60	0,78	0,33	0										
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 1	0,75	0,71	1	1	0									
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 2	1	1	1	1	1	0								
<i>A. discolor</i>	0,56	0,75	0,50	0,78	0,71	1	0							
<i>A. davisianum</i>	0,80	0,78	1	0,80	0,75	0,67	0,56	0						
<i>A. sibiricum</i> NA 3544	0,75	0,71	1	1	0,67	1	0,43	0,50	0					
<i>A. borzoi</i>	1	1	0,67	0,43	1	1	1	1	1	0				
<i>A. sibiricum</i> NA 3545	0,78	0,75	1	1	0,71	1	0,50	0,56	0,43	1	0			
<i>A. sibiricum</i>	0,60	0,78	1	0,80	0,75	1	0,78	0,60	0,75	1	0,56	0		
<i>A. cypricum</i> 1	0,78	0,75	1	1	0,71	1	0,50	0,33	0,43	1	0,50	0,56	0	
<i>A. cypricum</i> 1	0,71	0,67	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0



Şekil 3.6. OPB08 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre *Alyssum* türlerinin genetik yakınlıkları

A. sibiricum NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 0,78, 0,80, 1, 0,43, 1, 0,80, 1, 1. *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1 türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,71, 0,75, 0,67, 1, 0,71, 0,75, 0,71, 1. *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2 türünün sırasıyla *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,67, 1, 1, 1, 1, 1, 1. *A. discolor* türünün sırasıyla *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,56, 0,43, 1, 0,50, 0,78, 0,50, 1. *A. davisianum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 1, 0,56, 0,60, 0,33, 1. *A. sibiricum* NA 3544 türünün sırasıyla *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1,

0,43, 0,75, 0,43, 1. *A. borzaenum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 1, 1. *A. sibiricum* NA 3545 türünün sırasıyla *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,56, 0,50, 1. *A. sibiricum* türünün sırasıyla *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,56, 1. *A. cypricum* 1 türünün *A. cypricum* 2 türüne olan genetik uzaklığı; 1.

B18 primeri ile yapılan RAPD-PCR sunucunda elde edilen ürünler jelde yürütüldü ve fotoğrafları Polaroid film kullanılarak çekildi (Şekil 3.7.). Türlerin jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, her bir bantın, her tür için varlığı 1, yokluğu ise 0 olarak sayıldı. Bundan sonra genetik uzaklıklar her tür için hesaplandı (Çizelge 3.4.) ve SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapıldı (Şekil 3.8.). Buna göre *A. huber-morathii* 2 türünün sırasıyla *A. huber-morathii* 1, *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,75, 0, 0,71, 1, 1, 1, 0,50, 1, 1, 1, 1, 1, 1. *A. huber-morathii* 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,75, 0,54, 0,46, 1, 1, 0,60, 0,64, 0,78, 0,85, 1, 1, 0,75. *A. dudleyi* 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,71, 1, 1, 1, 0,50, 1, 1, 1, 1, 1, 1. *A. dudleyi* 2 türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,40, 1, 0,71, 0,78, 1, 0,75, 0,83, 1, 0,80, 1.



Şekil 3.7. *Alyssum* türlerinin B18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri

Hat 1- DNA Ladder (en büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 100 bp)

Hat 2- *A. huber-morathii* 2

Hat 3- *A. huber-morathii* 1

Hat 4- *A. dudleyi* 1

Hat 5- *A. dudleyi* 2

Hat 6- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1

Hat 7- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2

Hat 8- *A. discolor*

Hat 9- *A. davisianum*

Hat 10- *A. sibiricum* NA 3544

Hat 11- *A. borzaenum*

Hat 12- *A. sibiricum* NA 3545

Hat 13- *A. sibiricum*

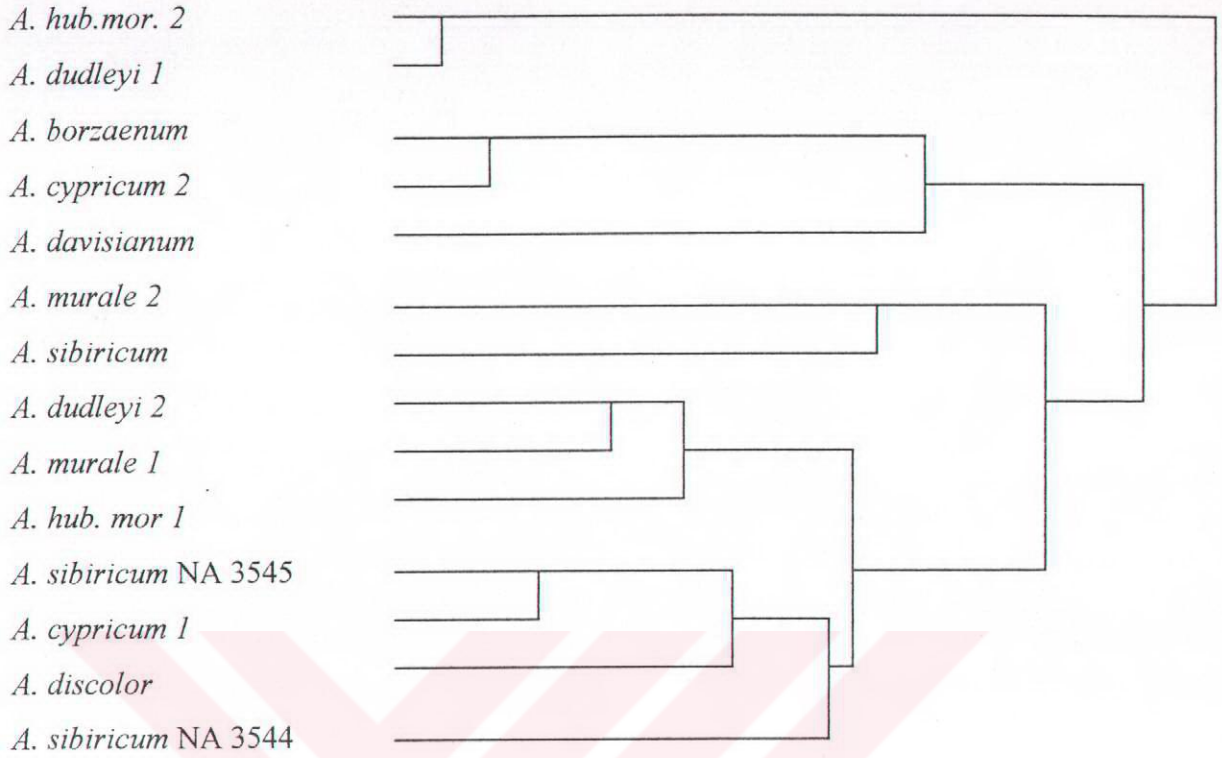
Hat 14- *A. cypricum* 1

Hat 15- *A. cypricum*

A. murale subsp. *murale* var *murale* 1 türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,60, 1, 0,75, 1, 0,80, 1, 0,75, 1. *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2 türünün sırasıyla *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1.

Şizelge 3.4. B18 primeri ile yapılan RAPD-PCR' a göre *Alyssum* türlerinin genetik uzaklıkları

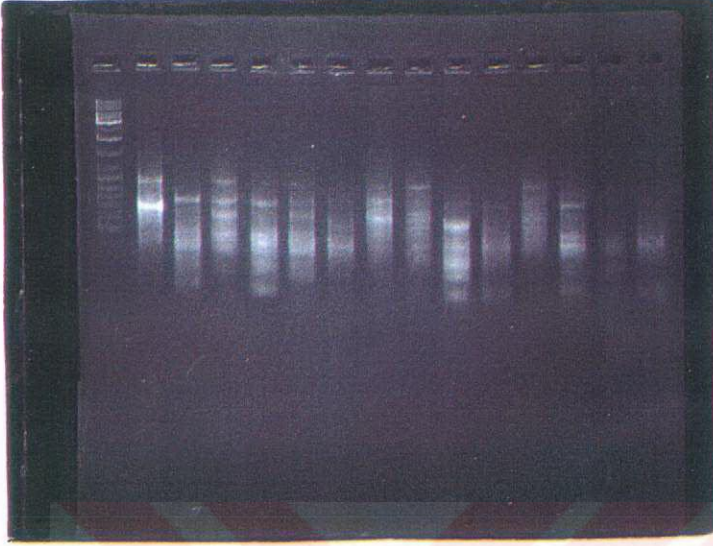
	<i>A. huber-morathii</i> 2	<i>A. huber-morathii</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 2	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var <i>murale</i> 1	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var <i>murale</i> 2	<i>A. discolor</i>	<i>A. davistanum</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3544	<i>A. borzaenunum</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3545	<i>A. sibiricum</i>	<i>A. cypricum</i> 1	<i>A. cypricum</i> 2
<i>A. huber-morathii</i> 2	0													
<i>A. huber-morathii</i> 1	0.75	0												
<i>A. dudleyi</i> 1	0	0.75	0											
<i>A. dudleyi</i> 2	0.71	0.54	0.71	0										
<i>A. murale</i>														
subsp. <i>murale</i>	1	0.46	1	0.40	0									
var. <i>murale</i> 1														
<i>A. murale</i>														
subsp. <i>murale</i>	1	1	1	1	1	0								
var. <i>murale</i> 2														
<i>A. discolor</i>	1	1	1	0.71	0.60	1	0							
<i>A. davistanum</i>	0.50	0.60	0.50	0.78	1	1	1	0						
<i>A. sibiricum</i>														
NA 3544	1	0.64	1	1	0.75	1	1	1	0					
<i>A. borzaenunum</i>	1	0.78	1	0.75	1	1	1	0.60	1	0				
<i>A. sibiricum</i>														
NA 3545	1	0.85	1	0.83	0.80	1	0.71	0.78	0.80	0.75	0			
<i>A. sibiricum</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
<i>A. cypricum</i> 1	1	1	1	0.80	0.75	1	0.60	1	0.75	1	0.40	1	0	
<i>A. cypricum</i> 1	1	0.75	1	1	1	1	1	0.50	1	0.33	0.71	1	1	0



Şekil 3.8. B18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre *Alyssum* türlerinin genetik yakınlıkları

A. discolor türünün sırasıyla *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1, 1, 0,71, 1, 0,60, 1. *A. davisianum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,60, 0,78, 1, 1, 0,50. *A. sibiricum* NA 3544 türünün sırasıyla *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,80, 1, 0,75, 1. *A. borzaenum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,75, 1, 1, 0,33. *A. sibiricum* NA 3545 türünün sırasıyla *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,40, 0,71. *A. sibiricum* türünün sırasıyla *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 1. *A. cypricum* 1 türünün *A. cypricum* 2 türüne olan genetik uzaklığı; 1.

M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR sonucunda elde edilen ürünler jelde yürütüldü ve fotoğrafları çekildi (Şekil 3.9.). Türlerin jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, her bir bantın, her tür için varlığı 1, yokluğu ise 0 olarak sayıldı. Türler arasındaki genetik uzaklıklar hesaplandı (Çizelge 3.5.) ve SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapıldı (Şekil 3.10.). Buna göre *A. huber- morathii* 2 türünün sırasıyla *A. huber- morathii* 1, *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,67, 0,71, 1, 1, 0,60, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1. *A. huber- morathii* 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,71, 0,75, 0,71, 0,60, 1, 0,71, 0,75, 0,67, 1, 0,75, 0,67, 0,60. *A. dudleyi* 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,78, 0,75, 1, 1, 0,75, 1, 1, 1, 1, 1, 1. *A. dudleyi* 2 türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,78, 0,71, 0,75, 0,78, 0,60, 0,75, 1, 0,80, 0,75, 0,71. *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1 türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,67, 1, 0,50, 0,56, 0,71, 1, 0,56, 0,43, 0,67. *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2 türünün sırasıyla *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,67, 0,43, 0,60, 1, 0,71, 0,60, 0,50.

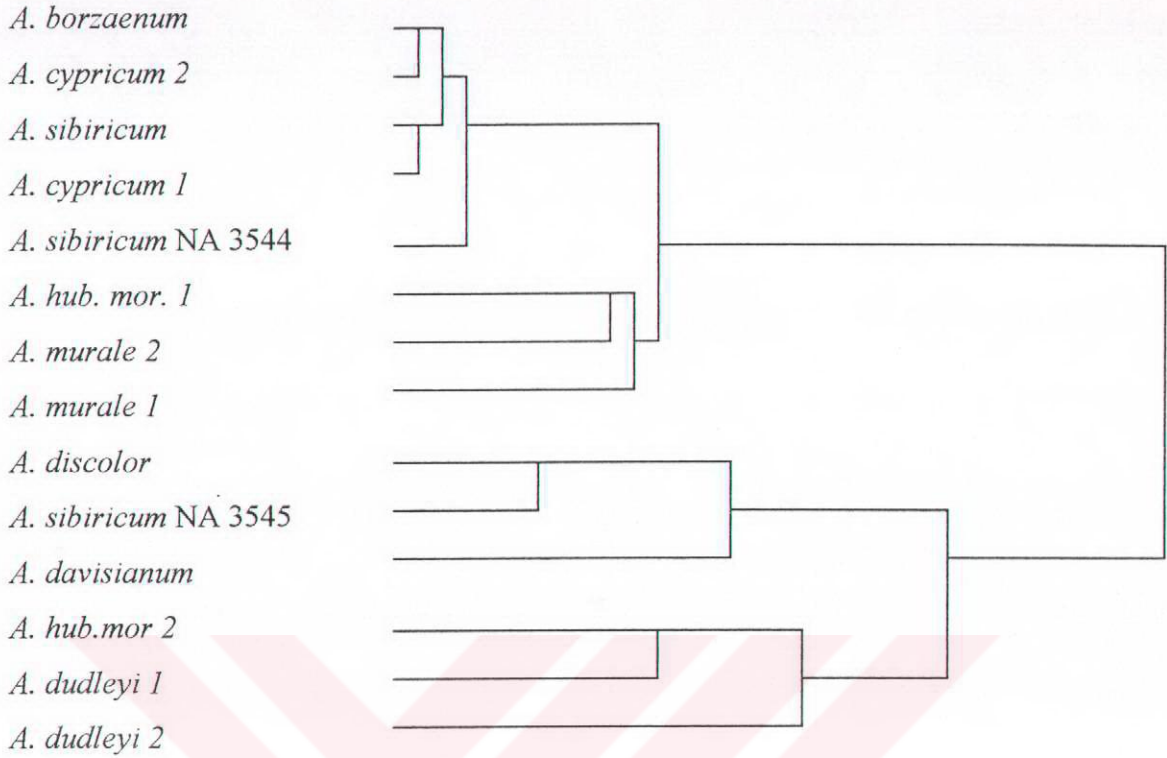


Şekil 3.9. *Alyssum* türlerinin M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri
 Hat 1- DNA Ladder (en büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 100 bp)
 Hat 2- *A. huber- morathii* 2
 Hat 3- *A. huber- morathii* 1
 Hat 4- *A. dudleyi* 1
 Hat 5- *A. dudleyi* 2
 Hat 6- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1
 Hat 7- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2
 Hat 8- *A. discolor*
 Hat 9- *A. davisianum*
 Hat 10- *A. sibiricum* NA 3544
 Hat 11- *A. borzaenum*
 Hat 12- *A. sibiricum* NA 3545
 Hat 13- *A. sibiricum*
 Hat 14- *A. cypricum* 1
 Hat 15- *A. cypricum*

A. discolor türünün sırasıyla *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,43, 1, 1, 0,50, 1, 1, 1. *A. davisianum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,78, 0,71, 0,60, 0,78, 0,71, 0,67.

Çizelge 3.5. M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR' a göre *Alyssum* türlerinin genetik uzaklıkları

	<i>A. huber-morathii</i> 2	<i>A. huber-morathii</i> 1	<i>A. huber-morathii</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 2	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 1	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 2	<i>A. discolor</i>	<i>A. davistanum</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3544	<i>A. borzaenum</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3545	<i>A. sibiricum</i>	<i>A. cypricum</i> 1	<i>A. cypricum</i> 2
<i>A. huber-morathii</i> 2	0														
<i>A. huber-morathii</i> 1	1	0													
<i>A. dudleyi</i> 1	0,67	0,71	0												
<i>A. dudleyi</i> 2	0,71	0,75	0,78	0											
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 1	1	0,71	0,75	0,78		0									
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 2	1	0,60	1	0,71	0,71	0,67	0								
<i>A. discolor</i>	0,60	1	1	1	0,75	1	1	0							
<i>A. davistanum</i>	1	0,71	0,75	0,78	0,78	0,50	0,67	0,43	0						
<i>A. sibiricum</i> NA 3544	1	0,75	1	1	0,60	0,56	0,43	1	0,78	0					
<i>A. borzaenum</i>	1	0,67	1	1	0,75	0,71	0,60	1	0,71	0,50	0				
<i>A. sibiricum</i> NA 3545	1	1	1	1	1	1	1	0,50	0,60	1	1	0			
<i>A. sibiricum</i>	1	0,75	1	1	0,80	0,56	0,71	1	0,78	0,40	0,25	1	0		
<i>A. cypricum</i> 1	1	0,67	1	1	0,75	0,43	0,60	1	0,71	0,25	0,33	1	0,25	0	
<i>A. cypricum</i> 1	1	0,60	1	1	0,71	0,67	0,50	1	0,67	0,43	0,20	1	0,43	0,20	0



Şekil 3.10. M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre *Alyssum* türlerinin genetik yakınlıkları

A. sibiricum NA 3544 türünün sırasıyla *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 1, 0,40, 0,25, 0,43. *A. borzaenum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 1, 0,25, 0,33, 0,20. *A. sibiricum* NA 3545 türünün sırasıyla *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 1,1,1. *A. sibiricum* türünün sırasıyla *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 0,25, 0,43. *A. cypricum 1* türünün *A. cypricum 2* türüne olan genetik uzaklığı; 0,20.

OPI 18 primeri ile yapılan RAPD-PCR sonucunda elde edilen ürünler jelde yürütüldü ve fotoğrafları çekildi (Şekil 3.11.). Türlerin jel üzerinde oluşturduğu DNA bantları birbirleriyle karşılaştırılarak, her bir bantın, her tür için varlığı 1, yokluğu ise 0 olarak sayıldı. Bundan sonra türler arası genetik uzaklık hesaplandı (Çizelge 3.6.) ve SPSS paket istatistik programı ile kümeleme analizleri yapıldı (Şekil 3.12.).

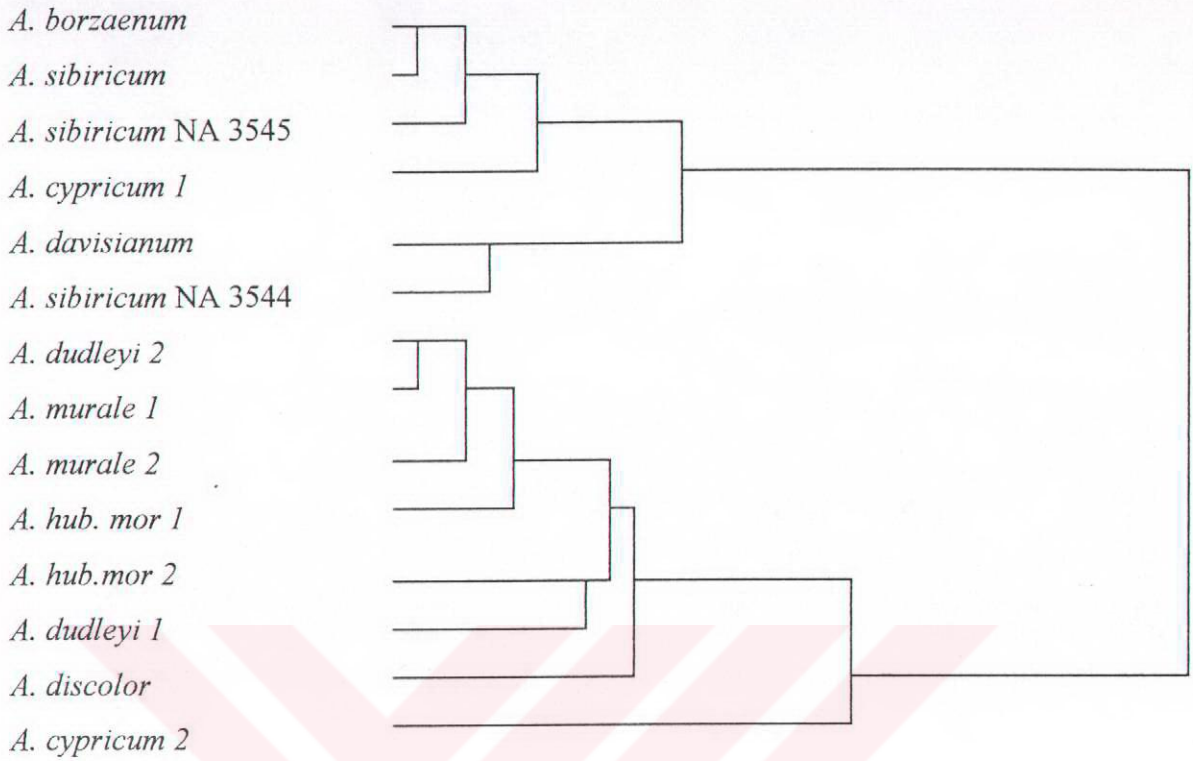


Şekil 3.11. *Alyssum* türlerinin OPI 18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünleri
 Hat 1- DNA Ladder (en büyükten küçüğe doğru moleküler ağırlık; 3000, 2000, 1500, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 100 bp)
 Hat 2- *A. huber- morathii* 2
 Hat 3- *A. huber- morathii* 1
 Hat 4- *A. dudleyi* 1
 Hat 5- *A. dudleyi* 2
 Hat 6- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1
 Hat 7- *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2
 Hat 8- *A. discolor*
 Hat 9- *A. davisianum*
 Hat 10- *A. sibiricum* NA 3544
 Hat 11- *A. borzaenum*
 Hat 12- *A. sibiricum* NA 3545
 Hat 13- *A. sibiricum*
 Hat 14- *A. cypricum* 1
 Hat 15- *A. cypricum*

Buna göre *A. huber- morathii* 2 türünün sırasıyla *A. huber- morathii* 1, *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,33, 0,67, 0,56, 0,56, 0,60, 0,56, 1, 1, 0,78, 1, 0,78, 1, 1.

Çizelge 3.6. OPI18 primeri ile yapılan RAPD-PCR' a göre *Alyssum* türlerinin genetik uzaklıkları

	<i>A. huber-morathii</i> 2	<i>A. huber-morathii</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 1	<i>A. dudleyi</i> 2	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 1	<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 2	<i>A. discolor</i>	<i>A. davisianum</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3544	<i>A. borzaenun</i>	<i>A. sibiricum</i> NA 3545	<i>A. sibiricum</i>	<i>A. cypricum</i> 1	<i>A. cypricum</i> 2
<i>A. huber-morathii</i> 2	0													
<i>A. huber-morathii</i> 1	0,33	0												
<i>A. dudleyi</i> 1	0,67	0,45	0											
<i>A. dudleyi</i> 2	0,56	0,25	0,64	0										
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 1	0,56	0,25	0,64	0,25	0									
<i>A. murale</i> subsp. <i>murale</i> var. <i>murale</i> 2	0,60	0,33	0,67	0,33	0,11	0								
<i>A. discolor</i>	0,56	0,50	0,82	0,50	0,50	0,33	0							
<i>A. davisianum</i>	1	1	1	1	1	0,78	0,50	0						
<i>A. sibiricum</i> NA 3544	1	1	1	1	1	1	0,75	0,25	0					
<i>A. borzaenun</i>	0,78	0,75	0,82	1	1	1	0,75	0,75	0,50	0				
<i>A. sibiricum</i> NA 3545	1	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0,43	0,14	0			
<i>A. sibiricum</i>	0,78	0,75	0,82	1	1	1	0,75	0,75	0,50	0	0,14	0		
<i>A. cypricum</i> 1	1	1	1	1	1	1	0,75	0,43	0,43	0,43	0,33	0,43	0	
<i>A. cypricum</i> 2	1	0,71	0,80	0,43	0,43	0,75	1	1	1	0,71	0,67	0,67	0,67	0



Şekil 3.12. OPI18 primeri ile yapılan RAPD-PCR ürünlerine göre *Alyssum* türlerinin genetik yakınlıkları

A. huber- morathii 1 türünün sırasıyla *A. dudleyi 1*, *A. dudleyi 2*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 1*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2*, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 0,45, 0,25, 0,25, 0,33, 0,50, 1, 1, 0,75, 1, 0,75, 1, 0,71. *A. dudleyi 1* türünün sırasıyla *A. dudleyi 2*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 1*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2*, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 0,64, 0,64, 0,67, 0,82, 1, 1, 0,82, 1, 0,82, 1, 0,80. *A. dudleyi 2* türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale 1*, *A. murale* subsp. *murale* var *murale 2*, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum 1*, *A. cypricum 2* türlerine olan genetik uzaklığı; 0,25, 0,33, 0,50, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 0,43.

A. murale subsp. *murale* var *murale* 1 türünün sırasıyla *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,11, 0,50, 1, 1, 1, 1,1 , 1, 0,43. *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2 türünün sırasıyla *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,33, 0,78, 1, 1, 1, 1, 1, 0,75. *A. discolor* türünün sırasıyla *A. davisianum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 0,75, 0,75, 0,75, 0,75, 1, *A. davisianum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3544, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,25, 0,75, 0,75, 0,75, 0,43, 1. *A. sibiricum* NA 3544 türünün sırasıyla *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,50, 0,43, 0,50, 0,43, 1. *A. borzaenum* türünün sırasıyla *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,14, 0, 0,43, 0,71. *A. sibiricum* NA 3545 türünün sırasıyla *A. sibiricum*, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,14, 0,33, 0,67. *A. sibiricum* türünün sırasıyla *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2 türlerine olan genetik uzaklığı; 0,43, 0,67. *A. cypricum* 1 türünün *A. cypricum* 2 türüne olan genetik uzaklığı; 0,67.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *Alyssum* cinsine ait *A. corsicum*, *A. corsicum* NA 3653, *A. sibiricum* NA 3656, *A. sibiricum* NA 3616, *A. pateri* NA 3650, *A. sibiricum* NA 3645, *A. sibiricum* NA 3649, *A. murale* NA 3654, *A. strigosum* NA 3617 türlerinin bireyleri arasındaki genetik uzaklıklar, tohum protein polimorfizmini ortaya koymada biyokimyasal bir yöntem olan SDS-PAGE ile belirlenmiştir (Şekil 3.2.). Buna göre *A. sibiricum* türüne ait bireylerin birbirleri ile tamamen aynı, *A. corsicum* türüne ait bireylerin de birbiriyle tamamen aynı oldukları ve bu iki grubun birbirine yakın oldukları görülmektedir. *A. sibiricum* ve *A. corsicum* türlerine en yakın türler sırasıyla *A. pateri*, *A. murale*, daha sonra da *A. strigosum*' dur. SDS-PAGE ile ortaya konulan *Alyssum* türleri arasındaki genetik uzaklıklar Davis (1965)' in Türkiye florasında belirtmiş olduğu türler arası uzaklıklarla tamamen aynı bulunmuştur.

Alyssum cinsine ait *A. huber-morathii* 1, *A. huber-morathii* 2, *A. dudleyi* 1, *A. dudleyi* 2, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 1, *A. murale* subsp. *murale* var *murale* 2, *A. cypricum* 1, *A. cypricum* 2, *A. discolor*, *A. davisianum*, *A. borzaenum*, *A. sibiricum* NA 3544, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum*, türlerinin bireylerine uygulamış olduğumuz RAPD-PCR çalışmasında toplam 42 primer denenmiştir. Elektroforez analizi sonucunda, sadece 5 primerin; OPI 18, OPB 08, B18, B6, M13' ün polimorfik bantlar verdiği gözlenmiştir.

Yapılan değerlendirmede genetik uzaklıkların tanımlanmasında en uygun primerin OPI 18 primeri olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.12.). Buna göre *A. borzaenum*, *A. sibiricum*, *A. sibiricum* NA 3545, *A. sibiricum* NA 3544, *A. cypricum* türüne ait bir birey, *A. davisianum* türleri kendi aralarında bir grup oluşturmuş ve *A. davisianum* türü diğerlerine uzak yer almıştır, *A. murale*, *A. huber-morathii*, *A. dudleyi*, *A. discolor*, *A. cypricum* türüne ait diğer birey de kendi aralarında bir grup oluşturmuştur.

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile *Alyssum* cinsine ait türler, toplam tohum proteinleri bakımından türler arası polimorfizm göstermiştir. Türlerin DNA' sı ile

yapılan çalışmada ise özellikle *A. cypricum* türünde büyük oranda tür içi polimorfizm tespit edilmiştir. Her iki çalışmada da türler arası farklılıklar ortaya konmuştur. Bundan sonraki çalışmalar her türe ait daha fazla sayıda birey ve RAPD-PCR çalışmalarında daha çok sayıda primer kullanılarak yapılmalıdır. *Alyssum* türlerinin nikel absorblama oranlarının da göz önünde bulundurulması ile bu özelliğin genetik farklılıklarla ilişkilendirilmesi mümkün olabilecektir.



KAYNAKLAR

- Adıgüzel, N., Reeves, R.D., 2002, *Alyssum dudleyi*, **Edinburgh Journal of Botany**, 59(2): 215-219
- Açık, L., 1992, Studies on yeast cytosine permease, **Ph. D Thesis**, University of Manchester, Faculty of Technology
- Aiken, S.G., Gardner, S.E., 1991, SDS-PAGE of seed proteins in *Festuca L (Poaceae)*: taxonomic implication, **Can.J.Bot**, 69:1425-1432.
- Andersen, W.R., Fairbanks, 1990, D.J., Molecular markers: Important tools for plant genetic resource characterization, **Diversity**, 6:51-53.
- Apostol, B.L., Reiter, P., Miller, B.R., 1996, Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico, **Heredity**, 76:325-334.
- Barr, D.J.S., Warwick, S.I., Desaulniers, N.L., 1996, Isosyme variation, morphology and growth response to temperature in *Pythium ultimum*, **Can.J.Bot**, 74:753-761.
- Basha, S.M.M., 1979, Certification of cultivar differences in seed polypeptide composition of peanuts (*Arachis hypogea L.*) by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Pl. Physiol.** 63:301-306.
- Beckmann, J.S., Soller, M., 1986, Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species, **Euphytica**, 35:111-124.
- Bernatsky, R., Tanksley, S.D., 1989, Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilisation, **The Use of Plant Genetic Resources**, Cambridge University Press, Cambridge, 136-362.
- Borba, E.L., Felix, J.M., Solferini, V.N., 2001, Fly-pollinated *Pleurothallis* (*Orchidaceae*) species have high genetic variability: Evidence from isosyme markers, **American Journal of Botany**, 88(3): 419-428
- Boyd, R.S., Shaw J.J., Martens, S.N., 1994, Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (*Brassicaceae*) against pathogens, **American Journal of Botany**, 81: 294-300
- Britten, R.J., 1986, Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups, **Science**, 231:1393-1398.

- Brooks, R.R., Robinson, B.H., Petit, D., 1997, The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel, **Journal of Geochemical Exploration**, 59:75-86.
- Burr, B., 1994, Some concepts and new methods for molecular mapping in plants, **DNA-based markers in plants**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Chaney, R.L., Malik, M., Brown, S.L., 1997, Phytoremediation of soil metals, **Current Options in Biotechnology**, 8:279-284.
- Chen, W., Hoy, J.W., and Schneider, R.W., 1991, Comparisons of soluble proteins and isozymes for seven *Pythium* species and applications of the biochemical data of *Pythium* systematics. **Mycol. Res.** 95: 548-555.
- Cherry, J.P., 1975, Comparative studies of seed proteins and enzymes of species and collections of *Arachis* by gel electrophoresis., **Peanut Sci.** 2: 57-65.
- Crawford, D.J., 2000, Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view, **Taxon**, 49:479-501.
- Crockett, P.A., Bhalla, P.L., Lee, C.K., 2000, RAPD analysis of seed purity in commercial hybrid cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) cultivar, **Genome**, 43:317-321.
- Crouch, M.L., Sussex, I.M., 1981, Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro, **Planta**, 153:64-74.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R. and Huang, J.W., 1995, Phytoremediation of contaminated soils, **Trends in Biotechnology**, 13, 393-397.
- Das S, Rajagopal, J., Bhatia, S., 1999, Assessment of genetic variation within *Brassica campestris* cultivars using fragment length polymorphism and random amplification of polymorphic DNA markers., **J. Biosci**, 24(4):101-108
- Davis, P.H., 1965, **Flora of Turkey and Aegean Islands**, Edinburgh Univ., Vol 1-10
- Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, H., 2000, Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing, **Eur. Food. Res. Technol**, 211:322-325
- Dinelli, G., Lucchese, C., 1999, Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of *Lolium* species and cultivars, **Electrophoresis**, 20:2524-2532.
- Dunn, M.J., 1993, Gel electrophoresis: Proteins. **Bias Scientific**, Oxford, UK.

- Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 1997, Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: Implications for phytoremediation, **J. Environ. Qual.**, 26:776-781.
- Environmental Protection Agency, 2000, **Introduction to Phytoremediation**, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Engelke, D.R., Hoener, P.A., Collins, F.S., 1988, Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 85:544
- Faivre- Rampant P, Jeandroz S, Lefevre F, Lemoine M, 1992, Ribosomal DNA studies in poplars, **Genome**, 35:733-740
- Farr, C.K., Saiki, R.K., Erlich, F., Analysis of *RAS* gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 85:1629
- Gabrielli, R., Pandolfini T., Vergnano, G., 1990, Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies, **Plant Soil**, 122: 271-277
- Gaver, L., Molina, S.C., 2000, Genetic variation in natural populations of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Aquifoliaceae*) using RAPD markers, **Heredity**, 84:647-656.
- Hahn, H., Schöberlein, W., 1999, Characterization and identification of *Festulolium* hybrids by electrophoresis of seed proteins, **Seed Sci & Technol**, 27:525-542.
- Hall, C.M., Keys, R.D., Stalker, H.T., 1993, Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (*Arachnis, Fabaceae*) species, **Pl. Syst. Evol.** 186:1-15.
- Higuchi, R., Sensabaugh, G.F., Erlich, H.A., 1988, DNA typing from single hairs, **Nature**, 332:543
- Karp, A., Kresovich, S., 1997, Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies, **IPGRI Technical Bulletin No:2**, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Koch, M., Haubold, B., Mitchell, T., 2001, Molecular systematics of the *Brassicaceae*: Evidence from coding plastidic matK and nuclear *Chs* sequences, **American Journal of Botany**, 88(2):534-544.
- Klozova, E., Svachulova, J., Smartt, J., Hadac, E., T., 1983, **Biol. Plant.** 25: 266-273
- Krämer, U., Charnack, J.M., Baker, A.J.M., 1996, Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel., **Nature**, 379:635-638.

- Krishna, T.G., Mitra, R., 1987, Arachin polymorphism in groundnut (*Arachis hypogaea*), **Phytochemistry**, 26; 897-902
- Laemli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, **Nature**, 227: 680-684
- Lee, J.R., Reeves, R.D., Brooks, R.R., 1978, The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. **Phytochemistry**, 17: 1033-1035.
- Maniatis, T., Sambrook, J., 1989, **Molecular cloning, A laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Minguzzi, C., Vergnano, O., 1948, Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii*, **Atti Soc. Tosc. Sci. Nat.**, 55, 49-74
- Nedelkoska, T.V., Doran, P.M., 2000, Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining, **Minerals Engineering**, 13:549-561.
- Nocelli, E., Bioni, M., Alicchio, R., 1999, RFLP and RAPD based genetic relationships of seven diploid species of *Avena* with the *A* genome, **Genome**, 42:950-959.
- Negri, M.C. and Hinchman, R.R., 1996, Plants that remove contaminants from the environment, **Laboratory Medicine**, 27(1), 36-40.
- Olfelt, J.P., Furnier, G.R., Luby, J.J., 2001, What data determine whether a plant taxon is distinct enough to merit legal protection? A case study of *Sedum integrifolium* (Crassulaceae). **American Journal of Botany**, 88(3):401-410.
- Ozban, N., 1988, **Hücre**, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul
- Ou, C., Kwok, S.W., Mitchell, D.H., 1988, DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells., **Science**, 239: 295
- Phillips, R.L., Vasil, I.K., 1994, **DNA-based markers in plants**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Pollard, A.J., Baker, A.J.M., 1997, Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), **New Phytol**, 135:655-658.

- Potokina, E., Vaughan, D.A., Tomooka, N., 2000, Population diversity of the *Vicia sativa* agg. (Fabaceae) in the flora of the former USSR deduced from RAPD and seed protein analyses, **Genetic Resources and Crop Evolution**, 47:171-183.
- Powell, W., Waugh, R., 1992, Using RAPD markers for crop improvement, **TIBTECH**, 10:186-191.
- Prathepha, P., Baimai, V., 1999, Genetic differentiation in Thai populations of the rare species *Afgekia sericea craib* (Leguminosae) revealed by RAPD-PCR assays, **Genetica**, 105:193-202.
- Raemon-Buttner, S.M, Schondelmaier, J., Jung, C., 1998, AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L., **Molecular Breeding**, 4:91-98
- Rajagopal, J., Negi, M.S., Bhatia, S., 2000, Utility of molecular markers for assessment of genetic variation in poplars and neem, **Plant Molecular Biology Division**, Hamhard University, New Delhi, India.
- Rao, G.U., Lakshmikumaran, M., Shivanna, K.R., 1996, Production of hybrids, amphidiploids and backcross progenies between cold tolerant wild species, *Erucastrum abyssinicum* and crop brassicas, **Theor. Appl. Genet**, 92:786-790
- Saiki, R.K., Scharf, F., Mullis, K.B., 1985, Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, **Science**, 230:1350
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., 1988, Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, **Science**, 239:487
- Saraswati, R., Matoh, T., 1993, Identification of *Sesbonia* species from electrophoretic patterns of seed proteins, **Trop. Agric. (Trinidad)**, 70 (3):282-285.
- Schat, H., Verkleij, J.A.C., Lelie, D., 2000, Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils, **Environmental Pollution**, 107:225-231.
- Singh, A.K., Gurtu, S., Jambunathan, R., 1994, Phylogenetic relationships in the genus *Arachis* based on seed protein profiles, **Euphytica**, 74:219-225.
- Singh, A.K., Mengesha, H.M., Ramaiah, C.D., 1991, Phylogenetic relations in section *Arachis* based on seed protein profile, **Theoretical and Applied Genetics**, 82:593-597.

- Shokraii, E.H., Esen, A., Mozingo, R. W., 1985, Relation of 36.000- dalton arachin subunit to blanchability in peanuts (*Arachis hypogaea* L.), **J. Agric. Food Chem.**, 33: 1114-1116
- Smith, J.S.C., 1988, Diversity of United States Hybrid Maize Germplasm: Isozyme and Chromatographic Evidence, **Crop Science**, 28:63-69.
- Southern, E.M., 1975, Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis, **J. Mol. Biol.** 98:503-517
- Stuber, W.C., 1992, Biochemical and molecular markers in plant breeding., **Plant Breeding News**, 9:36-61.
- Subramanian, V., Gurtu, R.C., Rao, N., 2000, Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay, **Genome**, 43:656-660.
- Tskalidou, E., Zoidou, E., Kalantzopoulos, G.,1992, SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of cell proteins from *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* strains isolated from yoghurt and cheese, **Milchwissenschaft**, 47(5):296-298.
- Tzuri, G., Hillel, J., Lavi, U.,1991, DNA fingerprinting analysis of ornamental plants, **Plant Science**, 76:91-97.
- Vogler, D.R., Cobb, F.W., Nelson, D.L.,1996, Isosyme diversity among hard pine stem rust fungi in the western United States, **Can. J. Bot.**, 74:1058-1070.
- Yamada, T., Aibara, S., Morita, Y., 1980, Accumulation pattern of arachin and its subunits in maturation of groundnut seeds, **Pl. Cell Physiol.** 21:1217-1226
- Wenzel, W., Smith, R.D., Salt, D.E.,1997, The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thiaspi goesingense* Hálácsy., **Plant Physiol.**, 115:1641-1650.
- Welch, R., 1995, Micronutrient nutrition of plants, **Critical Reviews in Plant Sciences**, 14(1), 49-82.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, **Nucleic Acids Research**, 18:7213-7218.
- Whitkus, R., Doebley, J., Wendel, J.F.,1994, Nuclear DNA markers in systematics and evolution, **DNA- based markers in plants**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J.,1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, **Nucl. Acids. Res.**, 18: 6531-6535
- Wilson, H.D., 1988, Quinoa biosystematics 1: Domesticated populations, **Economic Botany**, 42: 461-477.
- Wolf, K., Rijini, J.,1993, Rapid detection of genomic variability in *Chrysanthemum* using random primers, **Heredity**, Vol:71:335-341.
- Wough, R., Powell, W.,1992, Using RAPD markers for crop improvement, **TIBTECH**, 101: 186-191
- Zebeau, M., Roberts, R.J, 1979, The role of restriction endonucleases in molecular genetics. **In: Molecular Genetics III**, Academic Press, New York



**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BİTKİ MANTARYON MERKEZİ**

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Kahramanmaraş' ın Elbistan ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Mersin Piri Reis İlköğretim Okulunda, lise öğrenimini İçel Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladı. Yüksek öğrenimine 1995 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi bölümünde başladı, 1999 yılında buradan mezun oldu. 2000 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yine 2000 yılından itibaren aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Bildiği yabancı dil İngilizcedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

