

Keyifli Okumalar Dileriz

Binlerce kategoride milyonlarca PDF e-kitap, ders kitapları, dergiler ve romanlara platformumuz üzerinden ücretsiz ulaşabilirsiniz.

RESMİ WEB SİTEMİZ

<https://rantey.org>

Yedek ve Duyuru Kanallarımız

Sitemize erişim engeli gelmesi veya adres değişikliği durumunda aşağıdaki kanallardan güncel giriş adresine erişebilirsiniz:

- Telegram: <https://t.me/birkitapbir>
- WhatsApp Kanalımız : <https://whatsapp.com/channel/0029VbDHv8uE50Us4lvMoc0Y>

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

PAPAYER CİNSİ *OXYTONA* SEKSİYONUNUN TÜRKİYE’DE YETİŞEN
TÜRLERİNDE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN RAPD MARKÖRLERİ İLE ANALİZİ

İskender PARMAKSIZ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2004**

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN danışmanlığında, İskender PARMAKSIZ tarafından hazırlanan bu çalışma 16/09/2004 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı' nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Neşet ARSLAN *İmza*

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN *İmza*

Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU *İmza*

Prof. Dr. Muhsin KONUK *İmza*

Doç. Dr. Cengiz SANCAK *İmza*

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Metin OLGUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

PAPAVER CİNSİ OXYTONA SEKSİYONUNUN TÜRKİYE’DE YETİŞEN TÜRLERİNDE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN RAPD MARKÖRLERİ İLE ANALİZİ

İskender PARMAKSIZ

Ankara üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Papaver cinsi içerdiği alkaloidler bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu cins altında sınıflandırılan *Oxytona* seksiyonu türleri ise bağımlılık yapmayan ve tedavi amaçlı kullanılan alkaloidleri içermeleri yönü ile daha ayrı bir öneme sahiptir. Bu çalışmanın amacı; ülkemizdeki *Oxytona* seksiyonunun *Papaver bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* türlerine ait 53 popülasyonu temsil eden tek bitkide morfolojik, moleküler ve kimyasal incelemeler yapmaktır.

Morfolojik ve kimyasal olarak 20 karakter incelenmiş ve türler arasındaki akrabalık ilişkileri hiyerarşik kümeleme analizi ile belirlenmiştir. Buna göre; bitkiler 2 ana grupta toplanmışlar ve en yakın bitkiler *P. bracteatum*’a ait PB99 ile PB100 nolu örnekler olmuştur.

Moleküler çalışmalarda RAPD tekniği ile 10 baz’dan oluşan 15 farklı primer dizinimleri kullanılmıştır. POPGENE32 ve MEGA3 istatistik programları kullanılarak amplifikasyon ürünleri analiz edilmiştir. Amplifikasyon sonucu elde edilen 96 banttan 81’inin (%84.3) polimorfik olduğu belirlenmiştir. En yakın genetik mesafe 0.054 ile *P. bracteatum*’a ait PB5 ve PB7 örnekler arasında görülürken, en uzak olarak 0.58 ile *P. orientale*’ye ait PO181 ve 185 nolu örnekler arasında tespit edilmiştir.

Kimyasal çalışmalarda ise bitkilere ait tebain içerikleri HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. 21 bitkide 0 (veya eser) ve % 2.5 arasında tebain içeriği bulunurken 32 bitki örneğinde ise hiç tebain bulunamamıştır.

2004, 174 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: *Oxytona*, *Papaver bracteatum*, *P. orientale*, *P. pseudo-orientale*, PCR, RAPD tekniği, HPLC analizi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ANALYSIS OF GENETIC VARIATION AMONG TURKISH *OXYTONA* SECTION SPECIES OF *PAPAVER* GENUS USING RAPD MARKERS

İskender PARMAKSIZ

University of Ankara
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Genus *Papaver* is of great significance due to its alkaloid content. The *Oxytona* section species classified under this genus have a particular importance since they contain non-edictive alkaloid used in medical treatments. The aim of this study was to analyze the morphological, molecular and chemical characteristics of 53 line plant selections from 3 different species of *Oxytona* section.

Twenty morphological and chemical characters were analyzed and relationship among the species defined by hierarchical cluster. As a result, all the plants were classified into two main groups as line PB99 and PB100 of *P. bracteatum* were found to be the closest relatives.

Using the RAPD molecular marker technique, the 10-based 15 different primers were studied. By utilizing the POPGENE32 and MEGA3 statistics programs, the amplification products were analyzed based on the absence or presence of the bands on the lanes. All the amplified products generated 96 bands, of which 81 (84.3%) were polymorphic. While the closest genetic distance (0.054) was detected between the line PB5 and PB7 of *P. bracteatum* the farthest genetic distance (0.58) was observed between the line PO181 and PO185 of *P. orientale*.

The thebaine content of the plants was also determined via HPLC analysis. The 21 plants contained thebaine alcholoid ranging from 0 (trace amount) to 2.5% and no thebaine alcholoid was detected for remaining 32 lines.

2004, 174 pages

Key Words: *Oxytona*, *Papaver bracteatum*, *P. orientale*, *P. pseudo-orientale*, PCR, RAPD technique, HPLC analysis.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişme katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen değerli bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Celâl ER'e, Doğa sevgisi ve bilimsel yaklaşımı kendisinden öğrenmeye çalıştığım değerli hocam Prof. Dr. Neşet ARSLAN'a, çalışmalarım sırasında önemli katkılarda bulunan ve yönlendiren Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU'na, bilimsel çalışmaların yanında her aşamada pratik çözümleriyle bir hoca bir arkadaş olarak destek olan Prof. Dr. Bilal GÜRBÜZ, Doç. Dr. Cengiz SANCAK, Doç. Dr. Cafer S. SEVİMAY ve Doç. Dr. Hayrettin KENDİR'e, Moleküler teknikler konusunda kendilerinden çok şeyler öğrendiğim Nebraska Üniversitesi (ABD) Agronomi Bölümünden Dr. H. BUDAK ve Dr. I. DWEIKAT' a, projeler kapsamında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Semra MİRİCİ, Dr. Serkan URANBEY, Dr. Khalid M. KHAWAR, Araş. Gör. Ercüment O. SARIHAN, Araş. Gör. Mehmet ATAK, Araş. Gör. Satı ÇÖÇÜ, Araş. Gör. M. Demir KAYA, Araş. Gör. Arif İPEK ve Muhammet KAYA ile laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma ve teknisyen Hüseyin C. KALYONCU' ya, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen eşim ve çocuklarıma en derin duygularla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, "Tarımsal Biyoteknoloji AR-GE Merkezi (98K120640-DPT)", "İleri Araştırma ve Eğitim Programları (2001K120240-DPT)" ve "*Papaver bracteatum*'un Ankara ve Bolvadin Koşullarında Yetiştiriciliğinin Geliştirilmesi üzerine Bir Araştırma (TMO)" konulu projeler tarafından desteklenmiştir.

İskender PARMAKSIZ
Ankara, Eylül 2004

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ ve KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. <i>Papaveraceae</i> Familyasının Genel Özellikleri.....	6
2.1.1. <i>Papaver</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	7
2.1.1.1. <i>Oxytona</i> Seksiyonunun Genel Özellikleri (Syn: <i>Macrantha</i>).....	9
2.2. Morfolojik Markörler.....	16
2.3. Biyokimyasal Markörler (Enzim veya Protein Markörleri).....	24
2.4. DNA Markörleri.....	32
2.4.1. Hibridizasyona dayalı DNA (RFLP) markörleri.....	37
2.4.2. PCR' a dayalı DNA markörleri.....	40
2.4.2.1. RAPD (Rastgele oligonükleotid primerleri ile çoğaltılmış polimorfik DNA'lar).....	45
2.4.2.2. AFLP (çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi).....	51
2.4.2.3. STS (dizini etiketlenmiş alanlar).....	55
2.4.2.4. SSR ve mikrosatellitler (basit dizin tekrarları veya STMS).....	56
2.4.2.5. SCAR (dizin karakterli çoğaltılmış bölgeler).....	58
2.4.2.6. SSCP (tek parçalı kontrol edilen polimorfizm).....	59
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	61
3.1. Materyal.....	61
3.1.1. Araştırma yerinin iklim ve toprak özellikleri.....	61
3.1.2. Bitki materyali.....	61
3.2. Yöntem.....	63
3.2.1. Morfolojik ve kimyasal karakterler.....	63
3.2.2. İstatistik değerlendirmeleri.....	68
3.2.3. RAPD markörleri.....	68
3.2.3.1. Materyalin elde edilmesi.....	68
3.2.3.2. DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması.....	69
3.2.3.3. DNA konsantrasyonu.....	73
3.2.3.4. MgCl ₂ konsantrasyonu.....	73
3.2.3.5. Primer seçimi ve konsantrasyonu.....	73
3.2.3.6. dNTP konsantrasyonu.....	76
3.2.3.7. Taq DNA polimeraz konsantrasyonu.....	76
3.2.3.8. 10 x Taq DNA polimeraz tamponu.....	77
3.2.3.9. PCR koşullarının optimizasyonu.....	77
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi ve fotograflama.....	77

3.2.5. RAPD polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması.....	79
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	80
4.1. Morfolojik Gözlemler İçin Yapılan Çalışmalar.....	80
4.1.1. Araştırma alanının toprak özellikleri.....	80
4.1.2. Araştırma alanının iklim özellikleri.....	81
4.2. Morfolojik ve Kimyasal Karakterler.....	82
4.2.1. <i>Papaver bracteatum</i> 'un morfolojik ve kimyasal karakterler bakımından incelenmesi.....	82
4.2.2. <i>Papaver pseudo-orientale</i> 'nin morfolojik ve kimyasal karakterler bakımından incelenmesi.....	91
4.2.3. <i>Papaver orientale</i> 'nin morfolojik ve kimyasal karakterler bakımından incelenmesi.....	95
4.2.4. Doğu Anadolu Bölgesinden toplanan materyallerin morfolojik ve kimyasal karakterler bakımından incelenmesi.....	98
4.2.5. Morfolojik ve kimyasal verilerin istatistiksel değerlere çevrilmesi.....	101
4.2.6. İstatistik sonuçlarının değerlendirilmesi.....	103
4.3. RAPD Tekniğinin Optimizasyonu.....	107
4.3.1. DNA konsantrasyonu optimizasyonu.....	107
4.3.2. MgCl ₂ konsantrasyonun optimizasyonu.....	112
4.3.3. Primer konsantrasyonu optimizasyonu.....	112
4.3.4. dNTP konsantrasyonun optimizasyonu.....	114
4.3.5. Taq DNA polimeraz konsantrasyonun optimizasyonu.....	114
4.3.6. 10x Taq Tamponu konsantrasyonun optimizasyonu.....	114
4.3.7. PCR koşullarının optimizasyonu.....	114
4.3.8. Agaroz jel elektroforezi.....	116
4.4. RAPD Polimorfizmi ve Genetik Mesafenin Tespiti.....	117
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	132
5.1. Morfolojik Çalışmalar.....	132
5.2. Alkaloid Çalışmaları.....	136
5.3. Moleküler Çalışmalar.....	138
5.3.1. DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması.....	138
5.3.2. RAPD tekniğinin ve PCR koşullarının optimizasyonu.....	140
5.3.3. Agaroz jel elektroforezi ve fotoğraflama.....	144
5.3.4. RAPD polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması.....	144
KAYNAKLAR	149
EK 1.....	165
EK 2.....	167
EK 3.....	168
EK 4.....	169
EK 5.....	171
EK 6.....	172
ÖZGEÇMİŞ	174

SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (çoğaltılmış fragmentlerin uzunluk polimorfizmi)
bp	Base pair (baz çifti =bç)
BSA	Bulk Segregant Analizi
cDNA	Komplementer deoksiribonukleik asid
cM	Sentimorgan
CTAB	Cetyhrimethhylamoninmbromide
dATP	deoksi adenzin trifosfat
dCTP	deoksi sitozin trifosfat
dGTP	deoksi guanozin trifosfat
dTTP	deoksi timidin trifosfat
DNA	deoksiribonükleik asid
EDTA	Ethilendiamintetraasetik asid
kb	kilo base
MAS	Marker-Assisted Selection
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Moleküler Evrim Genetik Analizi)
mM	milimolar
MW	Molecular weight markers (Moleküler ağırlık markörleri)
ng	nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
QTL	Quantitative Trait Loci (Kantitatif karakter lokusları)
PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis (poliakrilamid jel elektroforezi)
POPGENE	Population Genetic Analysis (Populasyon Genetik Analizi)
PVP	Polivinilpirolidon
PVPP	Polivinilpolipirrolidon
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonukleik Asid
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir)
SDS	Sodyumdodesilsülfat
SSCP	Singel strand conformation polymorphism (tek zincir uygunluk polimorfizmi)
SSR	Simple Sequence Repeat (basit dizi tekrarı)
STS	Sequence target site (dizisi etiketlenmiş bölge)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris/asetat/EDTA (Buffer)
TBE	Tris/borat/EDTA (Buffer)
TE	Tris/EDTA (Buffer)

Tris	Tris(hidroksimetil) aminometan
Tris-HCl	Tris hidroklorid
UPGMA	Unweighted pair-group method analysis (aritmetik ortalamaları kullanılan ağırlıklı olmayan çift grup yöntemi)
VNTR	Variable number of tandem repeats (değişken sayıda ardışık tekrarlar)
UV	Ultraviole
µg	mikrogram
µl	mikrolitre
µM	mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	PCR'ın çalışma prensibi.....	40
Şekil 2.2.	Çift zincirli bir DNA iplikciğinden PCR sonucu oluşan toplam DNA miktarı	41
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan bitkiler ve toplama lokalitelerinin harita üzerinde görünüşü.....	63
Şekil 3.2.	DNA izolasyonunda kullanılan bitkilerin rozet (taban) yapraklarından örnek yaprak alımı.....	69
Şekil 3.3.	Taze yaprakların sıvı nitrojen içersinde fiziksel olarak öğütülmesi..	71
Şekil 3.4.	Çalışmada kullanılan Biometra T Gradient marka PCR cihazı.....	76
Şekil 3.5.	RAPD bant profillerini belirlemede kullanılan ‘‘Directload Wide Range’’ DNA markörü (Sigma).....	78
Şekil 4.1.	<i>Papaver bracteatum</i> türünde görülen morfolojik aşamalar.....	83
Şekil 4.2.	Gövde yaprak ve braktelerin genel görünüşü.....	88
Şekil 4.3.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerin kapsül görünüşleri.....	90
Şekil 4.4.	<i>Papaver pseudo-orientale</i> türünün braktersiz çiçekli örneklerinde görülen morfolojik aşamalar.....	92
Şekil 4.5.	<i>Papaver pseudo-orientale</i> türünde brakteli ve kaolin yapraklı çiçeklerde görülen morfolojik aşamalar.....	94
Şekil 4.6.	<i>Papaver orientale</i> türünde görülen morfolojik aşamalar.....	97
Şekil 4.7.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait <i>Papaver</i> türlerinde morfolojik ve kimyasal karakterlerin hiyerarşik kümeleme analizi sonucu yapılan dendogramı.....	104
Şekil 4.8.	Çalışmada kullanılan genomik DNA'ların agaroz (%1) jeldeki görüntüsü.....	109
Şekil 4.9.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPA03 primerine ait RAPD bant profilleri.....	119
Şekil 4.10.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPA04 primerine ait RAPD bant profilleri.....	119
Şekil 4.11.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPA07 primerine ait RAPD bant profilleri.....	120
Şekil 4.12.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF04 primerine ait RAPD bant profilleri.....	120
Şekil 4.13.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF05 primerine ait RAPD bant profilleri.....	122
Şekil 4.14.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF06 primerine ait RAPD bant profilleri.....	122
Şekil 4.15.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF08 primerine ait RAPD bant profilleri.....	123
Şekil 4.16.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPO02 primerine ait RAPD bant profilleri.....	123
Şekil 4.17.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPO04 primerine ait RAPD bant profilleri.....	124

Şekil 4.18.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPO19 primerine ait RAPD bant profilleri.....	124
Şekil 4.19.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan P123 primerine ait RAPD bant profilleri.....	125
Şekil 4.20.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan P166 primerine ait RAPD bant profilleri.....	125
Şekil 4.21.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan P437 primerine ait RAPD bant profilleri.....	127
Şekil 4.22.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan P443 primerine ait RAPD bant profilleri.....	127
Şekil 4.23.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde kullanılan UBC238 primerine ait RAPD bant profilleri.....	128
Şekil 4.24.	<i>Oxytona</i> seksiyonuna ait türlerde RAPD analizi sonucu oluşan dendogram.....	130

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Farklı markör sistemlerinin karşılaştırılması.....	36
Çizelge 2.2.	PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen DNA molekülü miktarı	41
Çizelge 2.3.	Polimeraz Enzimleri ve Kaynakları	44
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan bitkiler ve toplama lokaliteleri.....	62
Çizelge 3.2.	RAPD Analizinde Kullanılan Primerler, baz Dizilişleri GC (%) oranları ve Tm ısıları (°C).....	75
Çizelge 4.1.	Deneme tarlasının toprak analizi.....	780
Çizelge 4.2.	Deneme tarlasının yetiştirme dönemlerinde kaydedilen toplam yağış, ortalama sıcaklık ve ortalama nispi nem değerleri ile uzun yıllar ortalama değerleri.....	781
Çizelge 4.3.	Çalışmada kullanılan bitkilere ait morfolojik ve kimyasal karakterler.....	84
Çizelge 4.4.	Karakterlerin istatistik değerleri.....	102
Çizelge 4.5.	Çalışmada kullanılan bitkilere ait protokol numaraları ile birlikte DNA saflık değerlerinin okumaları.....	110
Çizelge 4.6.	PCR amplifikasyonu için döngü parametrelerinin optimizasyonu.....	111
Çizelge 4.7.	Çalışmada kullanılan primerler ve optimize edilen sıcaklıkları.....	113
Çizelge 4.8.	Optimize edilen reaksiyon karışımlar ve PCR koşulları.....	116
Çizelge 4.9.	RAPD sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları.....	118

1. GİRİŞ

Biyoloji alanındaki gelişmeler moleküler biyolojide dev adım kabul edilen DNA'nın yapısının açıklanmasından sonra büyük bir hız kazanmıştır. Saiki vd (1985) mevcut yöntemleri geliştirerek ve duyarlılıklarını artırarak, DNA'nın aslına sadık kalarak *in vitro* çoğaltma esasına dayalı bir teknik olan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)' ı geliştirmeleri bir çığır açmış, moleküler ve biyokimyasal alanda bitkisel ve hayvansal organizmaların gerçek orijinleri olan filogenetik (akrabalık ilişkisi) sınıflandırmaları yapılmaya başlanmıştır. Ayrıca Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerazın çalışmalara katılması ile de hızlı çoğaltma tekniği geliştirilmiştir. Bu gelişmeler sayesinde canlıların DNA dizin haritalarının çıkarılması, diğer canlılarla benzerlik ve farklılıklarının tespit edilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Gelişen bu teknikler sayesinde genom üzerinde bulunan ve karakterleri kodlayan genler belirlenmeye başlanmıştır. Belirlenen bu genlerden önemli olanlar ıslah çalışmaları ile geliştirilmesi arzu edilen bireylere aktarılmaya çalışılmaktadır.

DNA'nın yapısının ortaya çıkarılması ile başlayan ve 20. yüzyıla damgasını vuran "Gen Devrimi" pek çok disiplinde olduğu gibi tarımsal alanda da çok önemli yararlar sağlamıştır. Bakteri genetiği, genetik transformasyon, moleküler ıslah ve moleküler markör tekniklerinin birçok bitkiye uygulanabilirliği gen devrimi döneminin en önemli aşamalarındandır. Son yıllarda *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile pek çok kültür bitkisine gen aktarımı başarılmıştır (Khawar 2001, Uranbey 2002). Günümüzde bitki türlerinin tanımlanmasında ve genetik varyasyonun araştırılmasında moleküler markörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son 20 yıl içerisinde hızla gelişen moleküler markör teknolojisi, çeşitlerin birbirleri arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi, kromozom haritalamaları, gen kaynaklarının karakterize edilmesi, evrimsel gelişim analizi ve transformasyonda başarı düzeyinin belirlenmesinde yeni yöntemler ortaya koymuştur. Bu yöntemler klasik yöntemlere göre büyük avantajlar sağlamaktadır. Morfolojik ve biyokimyasal markörlerin uygulamadaki yetersizlikleri moleküler markörlerin uygulanmasıyla ortadan kalkmıştır. Moleküler teknikler, diğer tekniklere göre daha

fazla avantajlara sahip olup, çevre faktörlerinden etkilenmezler ve polimorfizm oranları yüksektir. Aynı zamanda pleotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermeyip son derece stabildirler (Soller ve Beckmann 1983, Tanksley 1983, Avise 1994, Bretting ve Widrlechner 1995).

Bitki germplasmının genetik uzaklığına dair bilgiler, spesifik bir germplasm kaynağındaki genetik ilişkinin belirlenmesi ile populasyonların tanımlanması açısından önemli bir başvuru kaynağı olacaktır. İslah programının başlangıcında genotipler arasındaki genetik ilişkiye dair bilgiler, fenotipik bilgiyi tamamlayıcı olarak ıslah populasyonlarının geliştirilmesinde kullanılabilmektedir (Santalla vd 1998). Genotipler arasındaki genetik benzerlik ya da farklılıklar, yeni genetik kombinasyonlar oluşturulurken materyal olarak ıslahçının neyi kullanacağı konusunda karar vermesine yardımcı olabilir (Hallden vd 1994).

Fenotipik özelliklere göre yapılan morfolojik-agronomik gruplamalar çevreden etkilenen az sayıda karaktere dayandığından dolayı gerçekte uzak ilişkili iki grup oldukça yakın akraba olarak görülebilir. Ayrıca bu karakterler birbirine oldukça yakın genotipler arasında sınırlı sayıda polimorfizm gösterirler (Şençiçek 2000).

Bireyler veya populasyonlar arasındaki varyasyon morfolojik özelliklere ve biyokimyasal parametrelere (izoenzim analizi ve tohum depo proteinleri) dayandırılarak da belirlenebilmektedir (Jain vd 1983). Bitki genetik haritalarının oluşturulmasında kullanılan markör sistemlerinden biri olan fenotipik markörler, yaprak veya çiçek morfolojisini etkileyen özellikler ile bitki boyu ve pigment biyosentezi gibi birçok özelliklerdir. Fenotipik markörlere dayalı genetik haritalar "klasik haritalar" olarak isimlendirilmektedir (Koornneef 1990).

Biyokimyasal parametrelerden olan enzim markörleri pratik ve bilgi verici olmasına rağmen düşük polimorfizm gösterdiği için kullanımı sınırlıdır. Isshiki ve

Umezaki (1997), kültürü yapılan 68 susam varyetesindeki genetik varyasyonu belirlemek amacı ile 7 tane enzim sistemini kullanmış, sadece bir enzim sisteminin (IDH; izoenzimsitrat dehidrogenaz) varyasyonu açığa çıkarmada yardımcı olduğunu ve izoenzim markörü ile çok düşük oranda varyasyonun belirlenebildiğini açıklamışlardır. Buna benzer başka bir çalışmada ise koca darı'da (*Sorghum bicolor*) genetik varyasyonun belirlenmesi için izoenzim markörleri kullanılmış, tüm genom boyunca genetik varyasyonun açığa çıkarılmasında etkili olmadığı görülmüştür (Aldrich 1992). Sınırlı sayıdaki izoenzim, genotipler arasındaki polimorfizmi çok düşük oranda belirleyebilmektedir.

PCR ile spesifik DNA parçacıklarının çoğaltılması sağlanarak DNA polimorfizmi belirlenebilmektedir. Protein veya DNA markörlerine dayanan haritalar "moleküler haritalar" olarak adlandırılmaktadır. Birçok tarla bitkisinde genetik uzaklık, moleküler, kimyasal ve morfolojik özellikler kullanılarak belirlenebilmektedir. Organizmalar arasındaki genetik varyasyonun daha iyi anlaşılabilmesi için, bu araçların tamamına ihtiyaç duyulmaktadır. DNA dizinindeki polimorfizmin belirlenebilmesi için son yıllarda RFLP (kesilmiş parça uzunlukları polimorfizmi), AFLP (çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi), SSR (basit dizin tekrarları) ve RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) gibi moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir. Tesadüfi olarak bazı primerlerin kullanılması ile elde edilen markörler, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA'lar (RAPDs) olarak isimlendirilmektedir. Bu markörlerde herhangi bir spesifik DNA dizin bilgisine ya da spesifik primerlerin sentezine ihtiyaç yoktur. Fragmentler PCR'da primer olarak kullanılan rasgele ve çok kısa DNA parçacıklarından çoğaltılmaktadırlar. Böylece farklı bir lokusu temsil eden her bir PCR ürünü ile DNA düzeyindeki farklılık tahmin edilebilmektedir (Reiter vd 1993). Ancak, yine de farklı genotiplerden gelen parçacıkların genetik akrabalığı ve genom orijini hakkında bazı şüpheler vardır. Çünkü RAPD'ler aynı zamanda dominant genetik markörler olarak davranırlar yani, dominant RAPD markörleri ile bir DNA segmentinin heterozigot veya homozigot bir lokusdan mı çoğaldığını ayırt etmek mümkün değildir. Kodominant (heterozigot) RAPD markörleri, aynı lokusdan çoğalmış farklı

büyükte DNA segmentleri olup, çok az sayıda belirlenebilmektedir. Örneğin; *Nicotiana crassa*'nın genetik haritası yapılırken 88 RAPD markörünün 84 tanesi dominant, sadece 4 tanesinin ise ko-dominant olduğu tespit edilmiştir (Williams vd 1990). Her parçacık farklı açılım analizi ile haritalanmazsa çoğaltılan parçacığın genom lokasyonu bilinemez. RAPD markörlerinin bu özellikleri bazı germplasm grupları içindeki genetik akrabalığı belirlemek açısından etkilidir (Thormann ve Osborn 1992). Dominant markörler, kendilenmiş homozigot ebeveynlerin kullanılması durumunda genetik haritalama için uygundur. RAPD markörleri genetik haritalamada, bitki ve hayvan ıslahı uygulamalarında, populasyon genetiği çalışmalarında ve genetik farklılığı belirlemede kullanılmaktadır. Ayrıca DNA parmakizi analizlerinde, kromozom-spesifik DNA parçacıklarının hızlı belirlenmesi ve polimorfizm bakımından etkili bir yöntemdir (Newbury ve Ford-Lloyd 1993).

RAPD markörleri kullanılarak genetik haritalamanın pek çok avantajı vardır. Bu yöntemde büyük varyeteli türlerde genomik analiz için genel bir primer seti kullanılır. Bazı moleküler tekniklerde olduğu gibi klonlanmış DNA problemlerinin izolasyonu ve hibridizasyon gibi ön hazırlıklara bu teknikte ihtiyaç yoktur (Williams 1990). RAPD tekniği, basit olmasının yanında çok sayıda bitki türünde uygulanabilmesi nedeni ile yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin; buğday (Dweikat vd 1997, Akar 2002, Dilbirliği 2003), soya (Maughan vd 1996, Doldi vd 1997), mısır, pamuk, kırmızı üçgül (McDonald vd 1994), patates (Demede vd 1996), kiraz (Stockinger vd 1996) ve susam (Şençiçek 2000) RAPD tekniğinin başarı ile kullanıldığı türlerden bazılarıdır.

Türkiye çok sayıda bitki türünün gen merkezi durumundadır. Bitkilerin çeşitliliği bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Bunun en önemli nedeni ise; iklim farklılıkları, topografik çeşitlilikler, jeolojik çeşitlilikler, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükseklik farklılıkları ve ekolojik farklılıklardır (Atalay 1994, Çelik 2003). Örneğin dünyada *Papaver* cinsine ait yaklaşık 110 türün (Kapoor 1997) 39 tanesinin ülkemizde bulunduğu bildirilmiştir (Davis 1965-1988, Seçmen vd 1995). Bu cinse ait türlerde yapılacak olan genetik

karakterizasyon, ıslah çalışmalarına basamak oluşturması ve aynı zamanda genetik materyalin değerlendirilmesi açısından son derece önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı da, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış olan *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonu içersinde yer alan 3 tür (*Papaver bracteatum*, *P. pseudo-orientale* ve *P. orientale*) ve bu türlere ait 53 farklı populusyonda genetik farklılık ve benzerliklerin RAPD tekniği kullanılarak belirlenmesidir. Ülkemizde morfolojik ve farmokolojik olarak en çok araştırılan türlerden biri olan *Papaver somniferum* da dahil olmak üzere, *Papaver* cinsinde familya düzeyinde bile moleküler bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu alışma, *Papaveraceae* familyasına ait türlerde moleküler düzeyde ülkemizde ilk çalışma olması yönü ile birçok değerlere sahip olacaktır. *Oxytona* seksiyonunda yer alan tıbbi açıdan son derece değerli bazı *Papaver* türlerinin genetik karakterizasyonu yeni çeşitlerin ıslahına yardımcı olacaktır.

İhraç edilen ve dünyada yasal yolla alkaloit ihtiyaının karşılanmasında ve bu pazarda rekabet gücümüzün olabilmesi için morfin, kodein ve tebain gibi tıbbi özellik içeren maddelerin oranının yüksek olduğu türlerin ya da populusyonların tanıtılarak geniş ekim alanlarına ulaşması ve daha fazla gelir elde edilecek ıslah çalışmalarının yapılmasına öncülük edeceğinden dolayı önemli olduğu kanısındayız.

2. KAYNAK ÖZETLERİ ve KURAMSAL TEMELLER

2.1. *Papaveraceae* Familyasının Genel Özellikleri

Türkiye florası ile ilgili çok sayıdaki araştırmacının çeşitli yayınları bulunmaktadır. Bunlar arasında ilk ve en kapsamlı çalışma Boisseir tarafından 1867-1888 yıllarında yapılmıştır. Boisseir'in "Flora Orientalis" adlı eseri 6 ciltten oluşmaktadır (Boissier 1867-1888). Ülkemiz florası ile ilgili ikinci ve en önemli kaynak olan "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı 10 ciltlik eser P. H. Davis editörlüğünde 100 yıl sonra ortaya konmuştur (Davis 1965-1988). "Flora of Turkey" adlı eserin oluşturulması ve yayınlanmasında dokuzu Türk değişik milletlerden yüzden fazla botanikçinin katkısı olmuştur. Son yıllarda Türk botanikçileri yoğun çalışmalar sonucu Türkiye Florasının 11. cildini hazırlayarak bilim dünyasına sunmuşlardır (Güner vd 2000).

Flora yazımı esnasında sınırlı zaman ve sınırlı materyal ile çalışıldığından dolayı bazı cins ve seksiyonlardaki eksiklikler belirtilmiş, ancak çözüm getirilememiştir. Bu durumda olan cins ve seksiyonlar tespit edilerek daha ayrıntılı bir şekilde çalışılması gerekmektedir.

Etrafında bulunan ülkelerin birçoğundan daha zengin bir flora çeşitliliğini ihtiva etmesine rağmen hala flora için yeni takson ilaveleri devam etmektedir. Türkiye Florası'nın bitiminden sonra artan flora ve vejetasyon çalışmaları ile bitki örtüsü hakkındaki bilgiler büyük oranda tamamlanmıştır. Ancak floradaki eksikliklerin giderilmesi daha çok revizyon çalışmaları ile mümkün olacağı belirtilmektedir (Akgül 2004).

Papaveraceae familyasına ait türler genellikle Kuzey Yarıkürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yayılış göstermektedir. Bu familyada 28 cins ve yaklaşık 250 tür vardır. Ülkemizde bu familyaya ait 5 cins bulunmaktadır (Seçmen vd 1995).

Genellikle tek veya çok yıllık otsu bitkiler olup, bazen ağaç veya çalı şeklindedirler. Genel olarak tabanda odunumsu olan bu bitkiler, saydam veya renkli süt boruları taşımaktadır. Yapraklar alternat bazen karşılıklı, stipulasız (Ek 6) olup genellikle çok parçalıdır. Sepaller 2 veya 3 adet olup serbestirler. Sepaller genellikle düşüçüdür. Petaller 4 veya 6 adet, serbest veya tabanda hafifçe birleşmiş, genellikle tomurcuk içinde buruşuktur. Korolla aktinamorf veya zigomorftur. Stamenler çok sayıdan 4-6 ya kadar değişmekte olup, birkaç dairede dizilmiştir. Ovaryum üst durumlu, tek lokuluslu (bazen yalancı bir bölme ile ayrılmış 2 lokuluslu) ve 2-20 karpellidir. Meyve bir kapsül, nuks, lomentum veya silikva şeklindedir. Tohumlar birden çok sayıya (1- ∞) kadar olabilir (Davis 1965-1988, Seçmen vd 1995).

2.1.1. *Papaver* cinsinin genel özellikleri

Türkiye *Papaver* türleri bakımından oldukça zengin sayılmaktadır. Boissier' in Flora Orientalis'inde 11'i çok yıllık, 12'si tek yıllık olmak üzere 23 *Papaver* türünün yetiştiği bildirilmiştir (Boissier 1867-1888). Daha sonra 1905'de Fedde'nin yaptığı *Papaveraceae* familyası monografisinde Türkiye'de 21 çok yıllık ve 17 tek yıllık olmak üzere 38 *Papaver* türünün bulunduğu bildirilmektedir (Fedde 1909). Davis Flora of Turkey' de 19 tek yıllık ve 20 çok yıllık (2 alttür ve 7 varyete) olmak üzere toplam 39 *Papaver* türünün bulunduğunu belirtmektedir (Cullen 1965, Davis 1988, Kapoor 1997). Bunlardan 10 tür, 2 alttür ve 4 varyete Türkiye için endemiktir. *Papaver* cinsi içersindeki türler sistematik olarak 9 seksiyon altında toplanmaktadır. Bu 9 seksiyondan 3' ü çok yıllık, 4' ü tek yıllık toplam 7 seksiyona ait türler ülkemizde bulunmaktadır. 2 seksiyona ait türler ise Türkiye' de bulunmamaktadır.

Papaver L. cinsinin dünya üzerinde 110 kadar türü vardır (Kapoor 1997). Yapraklar tüysü loplulu veya tüysü parçalıdır. Çiçekler tek veya rasemus veya panikula durumunda olup gösterişlidir. Sepaller 2 veya 3 adet, serbest ve düşüçüdür. Petaller 4 nadiren 6, tomurcuk içinde buruşuk ve genellikle düşüçüdür. Stamenler çok sayıda, filamentler tek veya parçalıdır. Ovaryum tek gözlü ve çok

bölmeli, fakat bölmeler merkeze kadar inmez. Stigma 4-20 ışıklı çok kollu, tabla şeklinde ve ovaryum üzerinde bir disk şeklindedir. Meyve bu tablanın altındaki deliklerle açılan (operkulat) bir kapsula şeklindedir (Fedde 1909, Davis 1965 ve 1988, Seçmen vd 1995).

***Papaver* cinsine ait türlerin toplandığı 9 seksiyon**

- Sect. I *Argemonorhoeades* Fedde (Syn. *Argemonidium* Spach)
- Sect. II *Carinatae* Fedde
- Sect. III *Horride* Elk.
- Sect. IV *Oxytona* Bernh. (Syn. *Macrantha* Elk.)
- Sect. V *Mecones* Bernh.
- Sect. VI *Miltantha* Bernh.
- Sect. VII *Orthorhoeades* Fedde (Syn. *Papaver*)
- Sect. VIII *Pilosa* Prantl
- Sect. IX *Scapiflora* Rchb.

III ve IX nolu seksiyonlarda yer alan türler Türkiye'de bulunmamaktadır (Cullen 1965, Goldblatt 1974).

Türkiye' de bulunan tek yıllık *Papaver* türlerini içine alan seksiyonlar

- Sect. *Papaver* L. (Syn. *Orthorhoeades* Fedde)
- Sect. *Carinatae* Fedde
- Sect. *Mecones* Bernh
- Sect. *Argemonidium* Spach (Syn. *Argemonorhoeades* Fedde)

Türkiye' de bulunan çok yıllık *Papaver* türlerini içine alan seksiyonlar

- Sect. *Oxytona* Bernh. (Syn. *Macrantha* Elk.)
- Sect. *Pilosa* Prantl.
- Sect. *Miltantha* Bernh.

2.1.1.1. *Oxytona* seksiyonun genel özellikleri (Syn: *Macrantha*)

Oxytona Bernh., Linnaea 8:843. 1833. *Macrantha* Elk. Tant. Monog, *Papaver* 13.1839.

Tournefort (1718) 1701’de doğu Anadoluyu gezmiş ve “’oriental haşhaş” ı ilk kez botanikçilere sunmuştur. Bu gezide günümüzde *P. pseudo-orientale* olarak bilinen ve Erzurum ve civarında bulunan türü tanıtmıştır. Bu bitki avrupada ilk kez Tournefort tarafından tanımlanmıştır. Commelin (1706), Linnaeus (1748) ve 18. yy başlarında bazı botanikçiler ilk defa bu bitkiyi Tournefort’un Avrupa’ya getirdiğini kabul etmektedirler. Sloane koleksiyonu, Bank herbaryumdaki Miller’in koleksiyonu ve Linnaeus’un kendine ait Linnaean herbaryumdaki örnekleri *P. orientale* bitkisinin Tournefort tarafından getirildiğini ispat etmektedir. Buradan anlaşıldığına göre Tournefort değişik türlerin tohumlarını tanıdığı kişilerden alıp kendi yazılarında açıklamıştır. Daha sonra *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* tohumlarını Avrupa ya götürmüştür. Bu seksiyondaki türler çok yıllık kalıcı kazık köklü otsu bitkilerdir. Her yıl rozet oluşturur. Taban yaprakların petiolü (yaprak sapı) uzundur. Yapraklar çok sayıda, tabanda rozet şeklinde düzenlidir. Taban yaprakları petiollü, pinnatifit veya pinnatisektir. Segmentler düzensiz dişli olup akuminattır. Tüm yaprak çok hücreli sert beyaz tüylerle kaplıdır. Yapraklar ve çiçek sapları hemen hemen her sene aynı zamanda açılmaktadır. Önce yapraklar gelişip sonra çiçek sapı uzamaktadır. Gövde toprak seviyesinden çıkmaktadır. Tek (genç bitkiler ikinci yılında) veya çok sayıda ve dallanmamış (nadir haller hariç) dik ve sert, sık beyaz tüylerle kaplıdır. Tüyler gövdenin üst kısmında yatık, altta ise gövdeyle dik açı yapacak şekilde dizilmiştir. Gövdedeki yapraklar taban yapraklara benzemekte ve bitkinin üst kısmına doğru küçülmektedir. En üstteki yapraklar genellikle sapsızdır. Çiçekler tek ve gövdenin ucundadır. Çiçekler brakteli veya braktesizdir. Kaliks otsu, 2 veya 3 parçalı, yeşil, dış kısmı tüylü veya dikenimsi tüylü olup, ekseriya düşüçüdür. Petaller 4 veya 6, 2 halka oluşturacak şekilde dizilmiş, dış petaller daha geniş, tomurcuk içinde buruşuk olarak yerleşmiş ve enine obovat şekillidir. Petal renkleri koyu kırmızıdan (bazen turuncu) kiremit kırmızısına kadar değişmektedir. Stamenler çok sayıda, filamentler linear-spatulat olup tepeye doğru incelir. Anterler ince dar dikdörtgenden düz çizgiye (linear) kadar değişen şekilli, sarı ile mor arasında

değişen renklidir. Polenler küremsi, trikolpat (nadiren tetrakolpat)'dır. Ovaryum obovatdır. Stigma tablası düzden konik şekle kadar değişir. Stigma ışınları 10-25 kadar olup, yumuşak tüylüdür. Kapsül obovat odunsu, stigma uzantılarının altındaki deliklerle açılır. Tohumlar çok sayıda ufak böbrek şeklindedir. Temel kromozom sayısı $n=7$ dir (Goldblatt 1974).

Oxytona seksiyonu *Papaver* cinsine ait olup, çok yıllık türleri içermektedir. Yayılım olarak orta ve doğu Türkiye, kuzey ve kuzey batı İran, Kafkas ve Trans Kafkas bölgelerinde bulunmaktadır. Bu familyaya ait monograflar Fedde (1909) ve Medwedev (1918) ile başlamış en son Goldblatt (1974) tarafından yapılmıştır.

Grossheim (1950), tarafından Popov'un çalıştığı bölgeden 5 tür çıkartılıp 3 tür; *P. bracteatum*, *P. pausifoliatum* ve *P. orientale* ile *P. intermedium* DC ve *P. lasiothrix*'i tanımlanmıştır. *P. intermedium* DC ve *P. lasiothrix* bugün de *P. orientale*'nin varyetesi olarak kabul edildiği bildirilmektedir.

Goldblatt (1974)'e göre Fedde 4 tür ve 3 varyete tespit etmiştir. Bunlar; *P. orientale* var. *proliferum* ve *P. bracteatum* var. *monopetalum*'un *monstrosities* olduğu bilinmektedir. Geri kalan 5 takson *P. orientale*, *P. bracteatum* ve onun varyeteleri *P. pseudo-orientale*, *P. lasiothrix*, ve *P. pausifoliatum*' dur. Ama bu türe ait birkaç bölgesel inceleme vardır ve o incelemelerin Fedde ve Medwedev sistemleriyle karşılaştırma yapılıncı farklar çok açık olarak ortaya çıkmaktadır. Popov (1937) 'SSCB flora of USSR' de 5 takson bildirmiştir. Bu taksonların hepsi de Fedde'nin takson olarak kabul etmiş olduğu türlerdir. Onlara *monstrosities* dahil değildir. *P. bracteatum* var. *pseudo-orientale*'yi *P. intermedium* DC. olarak vermiştir. Bu sınıflandırmanın doğru olmayıp, hatalı ve yanlış olduğunu belirtmektedir. Cullen (1965) Türkiye florasında 5 takson tanımlamıştır. Bunlardan 4'ü Fedde'nin verdiği gibidir. Ancak Cullen *P. orientale*'yi 2 varyeteye bölmüştür. Birincisi; var. *parviflorum* Busch (1905), diğeri *P. pseudo-orientale* (*P. intermedium* DC)'ye ait bitkileri hem *P. bracteatum* hemde *P. orientale* içine koymuştur. Cullen in İran Florasında ki (1966) ifadesi de buna benzer fakat ne *P. pausifoliatum* ve ne de *P. orientale* var. *parviflorum*'un İran'da olup olmadığı bildirilmemiştir. *P. pseudo-orientale* (*P. intermedium* DC.) en tartışılacak

konudur. Belli seviyede doğru isimlendirmede karmaşıklık vardır. Bunu bazen tür bazen *P. orientale* veya *P. bracteatum*'un bir varyetesi ya da *P. bracteatum* içine koymuşlardır. İkinci tartışılacak konu *P. orientale*'ye yakın akrabalık gösteren *P. pausifoliatum*'dur. Bunu bir tür olarak, bir varyete olarak kabul ya da tamamen ihmal etmektedirler. *P. orientale* var. *pausifoliatum* bazen de tanımlanmaktadır. Ama genel olarak *P. pausifoliatum*'un eşanlamlısı (sinonim) olarak kabul edilmektedir ve doğrusu nomenklatüre göre sinonimi olmalıdır. Burada *P. pausifoliatum* *P. orientale*'ye aittir ve taksonomik muamelelerde onun altına konulduğu bildirilmektedir.

Philipson vd (1981), *Oxytona* seksiyonunda yer alan türler üzerinde yaptığı bir çalışmada Türkiye' de *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* türlerinin yetiştiği, *P. bracteatum* olarak bilinen türün ise *P. pseudo-orientale* türünün bir ırkı olduğu ileri sürülmüştür.

Şenol (1988), Türkiye' de yetişen *Oxytona* seksiyonundaki türler ile ilgili olarak yaptığı arazi çalışmaları ve alkaloitleri üzerindeki araştırmalarda *P. bracteatum* olarak bilinen türün *P. pseudo-orientale* türünden gerek morfolojik ve gerekse kimyasal bakımdan önemli farklar gösterdiği, daha önceki yayınlara dayanarak belirtilmiş olduğundan *P. bracteatum* türünün *P. pseudo-orientale* türünün içine alınmasının uygun olmadığı görüşü benimsenerek çalışmalarında *P. bracteatum* türünü ayrı bir tür olarak ele almıştır.

İlk defa 1909 da Fedde tarafından yapılan monografda, bu seksiyonda 4 tür olduğu bildirilmiştir. Daha sonra muhtelif botanikçiler Fedde'nin kabul ettiği *Oxytona* seksiyonunun 4 olan tür sayısını bazan azaltmışlar, bazan da arttırmışlardır. Fedde'nin ve daha sonraki botanikçilerin *Oxytona* seksiyonuna dahil ettikleri türler kronolojik olarak aşağıda verilmiştir.

Fedde'ye göre (Pflanzenr. 40 (IV. 104): 366 (Fedde 1909))

1. *P. orientale* L,
2. *P. bracteatum* L. var. *bracteatum*
var. *pseudo-orientale* Fedde

3. *P. lasiothrix* Fedde
4. *P. paucifoliatum* (Trautv.) Fedde

Medwedeu'e göre (Bull. Mus. Cauc. II: 204, 1918) (Medwedeu 1918),

1. *P. orientale* L.
2. *P. pseudo-orientale* (Fedde) Medw.
3. *P. bracteatum* Lindl.

Popov'a göre (Flora of U.S.S.R., 1937). (Komarov 1970).

1. *P. bracteatum* Lindl.
2. *P. lasiothrix* Fedde
3. *P. intermedium* DC.
4. *P. orientale* L.
5. *P. paucifoliatum* (Trautv.) Fedde

Grossheim'e gre (Flora Caucasus, 1950).

1. *P. bracteatum* Lindl.
2. *P. orientale* L. var. *orientale*
var. *intermedium* DC. (*P. pseudo-orientale* (Fedde) Medw.).
3. *P. paucifoliatum* (Trautv.) Fedde

Cullen'e gre (Flora of Turkey, 1965) (Cullen 1965).

1. *P. bracteatum* Lindl.
2. *P. orientale* L. var. *orientale*
var. *parviflorum* Busch.
3. *P. lasiothrix* Fedde
4. *P. paucifoliatum* (Trautv.) Fedde

Bu seksiyon zerinda çalışma yapan botanikçi Peter Goldblatt'a göre (Annals of Missouri Botanical Garden, 1974).

1. *P. bracteatum* Lindl.
2. *P. orientale* Fedde

3. *P. pseudo-orientale* (Fedde) Medw,

Oxytona seksiyonuna ait bitkilerin tür tespitinde kullanılan teşhis anahtarı

1. Çiçekler brakteli

2. Çiçekler koyu kırmızı; brakteler 3-8; Kaliks tüylü olup, kaliks tüyleri tabanda üçgen şeklinde ve dik.....1. *P. bracteatum*

2. Çiçekler turuncu (turuncu kırmızı); brakteler 1-4 arasında, kaliks tüyleri ince, ...3. *P. pseudo-orientale*

1. Çiçekler braktesiz

3. Kaolin (gövde) yapraklar çiçek sapının yukarısında bulunmaz. Tomurcuk eğik, petaller genellikle lekesiz yada açık mor ile beyaz arası lekeli.....2. *P. orientale*

3. Kaolin yapraklar gövdenin üstten 2/3 sine kadar uzanır. Tomurcuklar dik, nadiren eğik, petaller genellikle dikdörtgen şeklinde, siyah lekeli, nadiren lekesiz 3. *P. pseudo-orientale*

***Papaver bracteatum* Lindl., Coll. Bot., t. 23 (1821)**

Syn : *P. lasiothrix* Fedde.

P. bracteatum 1818'de Avrupa'ya Fischer tarafından Kraliyet Botanik Bahçesi (Imperial Botanical Garden)'ne muhtemelen Kafkaslardan tohum koleksiyonu ile götürülüp, Batı Avrupa'ya dağıtılmış ve Lindley tarafından 1821'de tanıtılmıştır.

Oxytona seksiyonunun en büyük bitkisidir. Aynı lokalitede her zaman var olan önemli taksonomik özellikleri ile uniformdur. Bir metreye kadar boylanabilir. 15 kadar çiçek açan gövdesi vardır. Yapraklar 45 cm kadar uzayabilir. Pinnatisect olup, orta damara kadar derin bir yarıkla sonlanabilir. Yaprak kenarları düzensiz dentat ya da bidentatdır. Gövde çok tüylü, tüyler aşağı doğru yönde olup, yatık değildir. Kaolin (gövde) yaprak sayısı 5–7 adettir. En üst yaprak gövdenin 2/3'ün den daha yukardadır. Çiçek brakteleri 3-8 kadar olabilir. Brakteler 1.5-3 cm uzunluğunda olup, kenarları düzensiz dentat ya da düz tarak şeklindedir. Gelişme süresince tomurcuk dik ve oval olup, açmadan önce

oblongdur. Kaliks genel olarak 3 paçalı, üzerindeki tüyler kalın ve yatık, 5 mm kadar uzunlukta olup, üçgen tabanlıdır. Büyük koyu kırmızı petallerin ölçüleri sezondan sezona ve yerden yere değişebilir. Petaller 6 nadiren 4-8 adet koyu kırmızı renktedir. Petallerin üzerinde bulunan koyu renkli uzun ve geniş lekeler tabana kadar uzanmaktadır. Flamentler 1.5 cm'ye kadar uzayabilmektedir. Anterler linear, 3-5.5 mm uzunluğunda koyu mor renktedir. Polenler 24-27 µm çapındadır. Ovaryum 1.2-2 cm yüksekliğinde olup ovaldir. Kapsüller yaklaşık olarak 3 cm genişliğinde 4 cm yüksekliğindedir. Kapsül üzerinde bulunan disk düz, konkav ya da konikaldır. Disk üzerindeki ışın sayısı 12-24 arasındadır. Somatik kromozom sayısı $2n = 14$ 'dür (Goldblatt 1974).

Habitat: 1700-2500 m arasında açık, yarı kuru yamaçlarda, nadiren gölgeli derelerde, sel yatakları ya da sulama bendlerinin çevresinde çok yoğun *Astragalus*, *Thymus*, dikenli bitkiler ve *Ferula* türleri ile beraber bulunurlar (Cullen 1965, Goldblatt 1974).

Yayılışı: Erzurum Kop dağı. Bayburt Aşkale arası 2050-2100 m. Kars, Kayseri Erciyes dağı, Sivas, Ulaş, Erzincan Karadağ 1960 m. Van, Çatak, Ağrı, Büyük Ağrı dağı, Niğde, Pertek 2000 m (Cullen 1965, Goldblatt 1974).

***Papaver orientale* L., Sp. Pl. 508 (2753). Ic. Bot. Mag., 2: t. 57 (1794).**

Syn: *P. paucifoliatum* (Trautv) Fedde; *P. orientale* var. *paucifoliatum* Trautv.; *P. orientale*. var. *parviflora* Busch.

Kuzey batı İran ve kuzey doğu Türkiye de yayılış gösteren ince narin bitkidir. *P. orientale* 1800 m'nin genelde üzerinde bulunmasına rağmen bazan altında da Türkiye ve İran'da bulunabilmektedir. *P. bracteatum*'a göre daha nemli ve sulu alanlarda, açık dağ eğimlerinde ve güneşi az alan kuytularda bulunmaktadır. Genel olarak kuytu alanlardaki bitkiler diğer alanlardakilere oranla daha iri yapılıdır. *P. orientale* genellikle Haziran'dan önce çiçeklenmez ve yüksek rakımlarda Ağustos sonuna kadar çiçeklenme devam eder.

P. orientale'de bitki boyu *P. bracteatum* ve *P. pseudo-orientale*'den daha kısadır. Yapraklar ve çiçek sapları hemen hemen her sene aynı zamanda açılmaktadır. Önce yapraklar gelişip sonra çiçek sapı uzamaktadır. Her sap çıkışta basit ve yoğun beyaz tüylerle kaplıdır. Her sapta tek çiçek bulunmaktadır. Yukarıdaki yapraklarda petiol küçüktür. Yaprakların yerleşimi taxonomik özelliklerde bir önem taşımaktadır. Bu seksiyona ait yapraklarda biraz varyasyon olup, *P. orientale*'ye ait yaprakların kenar dişleri daha küçük ve dardır. Kenar dişleri farklı derinliklerdedir. *P. orientale*'de en üstteki yapraklar birbirine yakın olup, gövdenin orta alanında bulunmaktadır. Bu özelliği ile bitkinin *P. pseudo-orientale*'den ayrılması için yeterli çiçek özellikleri olmadığı durumlarda dahi teşhis yapılabilir. Çiçek tomurcuklarının gelişimleri özel ve kaliks tüylüdür. *P. orientale*'de tomurcuklar gelişme süresince eğik ve çiçek açmadan önce sap dikleşmektedir. Tomurcuk oval genel olarak uca doğru incelmektedir. *P. orientale* petalleri kiremit kırmızısı olup bazılarının üzerinde beyaz ya da sarı mavi lekeler bulunmaktadır. Bu tip *P. orientale*'ler Türkiye'nin kuzeyinde yaygın olarak bulunmaktadır. Kaliks ve petallerin sayısı *P. orientale*'de azdır. Ancak bu durum dış şartlardan etkilenmektedir. Somatik kromozom sayısı $2n = 28$ 'dir (Goltdblatt 1974).

Habitat: Türkiye' de 1800 m'nin genelde üzerinde bulunmasına rağmen bazan altında da bulunabilmektedir. *P. bracteatum*'a göre daha nemli ve sululu alanlarda, açık dağ eğimlerinde ve güneşi az alan kuytularda bulunmaktadır (Cullen 1965, Goltdblatt 1974).

Yayılışı: Orta ve Doğu Anadolu, Ağrı, Erzurum, Erzincan, Kars, Kayseri, Sivas, Tunceli ve Van çevresi (Cullen 1965, Goltdblatt 1974).

***Papaver pseudo-orientale* (Fedde) Medw.**

Syn: *P. intermedium* DC.; *P. bracteatum* var. *pseudo-orinale* Fedde.

Genel olarak İran ve Türkiye'nin nemli yerlerinde bulunmaktadır. Literatürde yaygın olduğu bildirilmektedir. Bu tür arazide kendini belirgin bir şekilde göstermektedir. Bitkide diğer iki türe kıyasla değişiklik vardır. Bunlar; dik tomurcuk, ince narin yayılmış kaliks tüyleri, koyu kiremit kırmızısı petaller, koyu siyahımsı lekeler ve

brakteli çiçeklerdir. 1600-2200 m arasında nemli yerlerde bulunmaktadır. Genel olarak akarsu kenarlarında, tabandan su çeken ıslak zeminlerde ya da bol miktarda yeşil olan bölgelerde bulunmaktadır. Kurak bölgelerde bitki boyu küçülmektedir. Kuzey Batı İran ve Batı Türkiye de bol miktarda bulunmaktadır. Çiçeklenme 15 Haziran'dan Temmuz sonuna kadar devam etmektedir.

Bitkiler orta büyüklükte olup 40-60 cm nadiren 80 cm boydadır. Taban yapraklar 45 cm ye kadar uzun derin pinnatisekt olup, tabanda birleşir ve kenarları düzensiz dentatdır. Gövde tüylü, tüyler aşağı doğru yatık nadiren yayılmıştır. Gövde (kaolin) yaprakları 5-6, adet ve gövdenin 1/3'ün den daha yukarıya yerleşmiştir. Floral brakteler var ya da yok, küçük 1-4 adet, kenarlar düzensiz dentat ya da bütünleşmiştir. Tomurcuk gelişme döneminde dik, genellikle oval. Ana kökten en fazla 10 çiçek gelişmektedir. Kaliks 2 ya da 3 parçalı, tüyler ince ve subpatentdir. Petaller 4-6 adet, koyu kiremit kırmızısı, tabana kadar dikdörtgen şeklinde koyu siyahımsı lekeler vardır. Flamentler 1,3 cm ye kadar uzunluktadır. Anterler linear 2.0-3.5 mm uzunluğunda, koyu mordur. Polenler 27.8-30.1 µm çapındadır. Ovaryum 1.5-1.8 cm uzunluğunda olup ovoiddir. Disk biraz konveks olup, sitigmatik ışınlar 9-19 adettir. Kapsüller düz disk ile birlikte 2.5 cm kadardır. Somatik kromozom numarası $2n=42$ 'dir (Golldblatt 1974).

Habitat: 1600-2200 m yükseklikte nemli yerlerde, nemli kayalar arasında ya da küçük akarsu kenarlarında rastgele dağılmış ve *P. orientale* ve *P. bracteatum* gibi kalabalık şeklinde olmayan popülasyonlardır (Golldblatt 1974).

Yayılışı: Çoruh, Erzincan, Erzurum, Muş, Ağrı, van, Niğde, Hakkâri çevresinde dağılım göstermektedir (Golldblatt 1974).

2.2. Morfolojik Markörler

Nyman ve Bruhn (1979)'a göre *Papaver somniferum* ve *Papaver setigerum* kolayca tanınabilmektedir. *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale*'yi *P. bracteatum*'dan ayırmak özellikle vejetatif dönemde çok zordur. *P. pseudo-orientale* ve *P. orientale* süs bitkisi olarak yetiştirilmekte ve çiçekleri pembe, kırmızı ve dik pedisellidir. Histolojik özellikler yani çiçek rengi, petallerdeki siyah

lekeler ve yaprak özellikleri üzerine araştırmalar yapmışlardır. Ayrıca ilaç sanayisinde *P.bracteatum*'un afyon haşhaşı (*P. somniferum*) için iyi bir alternatif olabileceği öne sürülmüştür.

Digby ve Kempton (1987), bir çoklu değişken analizi uygulamalarında, her birey üzerinde çok sayıda değişken ölçümü yapılmıştır. Araştırmacının bu değişkenlerin hepsini kullanıp kullanmayacağını belirlemek zorunda olduğunu bildirmişlerdir. Çünkü araştırmacının elindeki çalışma için hangi bulguların önemli olduğundan emin olmaması veya düzenleyeceği anketin pahalı ve zor olmasından dolayı bu gibi durumlarda bütün veri setinin analizi ile ilgili üç ana sorun olduğunu bildirmiştir;

1. Bazı değişkenler istenilen amacın tamamen dışında olabilir ve diğer verilerin gerçek etkilerini örtebilir.
2. Çok değişken olunca istenilen düzeyde güvenilir parametre tahminleri elde etmek için gerekli örnek büyüklüğü gerçekçi büyüklükten yüksek olma ihtimali vardır.
3. Çok değişkenin var olması problemde çok sayıda parametreye yol açar. Bu da örnekleme değişkenliğinden dolayı daha çok karmaşıklığa neden olabilir.

Bu yüzden çoğu problemlerde, analizde kullanılacak en iyi değişkenlerin önceden seçilmesinin gerektiğini ve böyle bir seçimin çoklu değişken analizi problemlerini azalttığını açıklamışlardır. Araştırmacılar, hiyerarşik kümeleme yöntemlerinin standart gösteriminin dendogram olduğunu, dendogramda sağdan sola gittikçe kümelerin daha küçük kümelere bölündüğünü ve yatay eksenin kümelerin birleştiği benzerliği gösterdiğini bildirmişlerdir.

Özhatay vd (1989), *Oxytona* seksiyonuna ait Tütkiye de yetişen türlerinin kromozom, alkaloit ve morfolojik karakterlere göre değerlendirmesini yaptıkları çalışmada; Türkiye de *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* türlerinin olup, *P. bracteatum* türünün bulunmadığını bildirmişler. *P. bracteatum* olarak bilinen türlerin *P. pseudo-orientale* olduğunu ve bunların da kendi aralarında 3 gruba ayrıldığını belirtmektedirler.

Ojala vd (1990), *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* türleri arasında gerçekleşen melezlerdeki tohumların verimliliğinin açık tozlaşmayla elde edilen tohumların verimliliği ile hemen hemen eşit olduğunu savunarak *Oxytona* seksiyonunda kendine uyumsuzluk nedeni ile kendilendikleri zaman çok az sayıda tohum elde edildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada tüm hibritlerde morfoloji, alkaloit analizi ve mayotik eşleşme konularını ele almışlardır. Sonuçlara dayanarak farklı bir genom evrimi modelini önermişlerdir. Önerdikleri genomik yapı daha çok *P. bracteatum* (AA), *P. orientale* (AA B₁B₁) ve *P. pseudo-orientale* (AA B₁B₁ B₂B₂) şeklindedir. B₁ ve B₂ genomlarının birbirleri ile eşleşebilirliğini belirlemişler. Ancak eşleşmede kendi cinslerini tercih ettiklerini de vurgulamışlardır. Bu açıklama hem melezlerde mayoz bölünme esnasında kromozomların eşleşme davranışını hem de seyrek olsa bile multivalentlerin nasıl oluştuğunu da daha anlaşılır bir temele oturtmaktadır. Bir yandan *P. orientale*' de otosentetik eşleşme, diğer yandan da triploit ve tetraploid melezlerdeki multivalentlerin oluşması, A ve B genomlarının kromozomları arasında seyrek eşleşmenin olabilirliğini gösterdiğini belirtmektedirler. Bu modelin *P. pseudo-orientale*' nin morfolojik açıdan ara bir form olduğu gerçeğine de destek verdiğini savunmaktadırlar. (*P. orientale* X *P. pseudo-orientale*) sonucunda elde edilen Melezde morfoloji açısından ana-baba bitkilere oldukça yakın olmasını da bu modelin kabul görülmesinde önemli bir etken olarak değerlendirmişlerdir.

Perry ve McIntosh (1991), germplasm koleksiyonunun artışı ve devamlılığının oldukça önemli olduğunu bildirmişlerdir. 78 ülkeden *Hordeum vulgare*, *Triticum turgidum*, *Carthamus tinctorius* ve *Oryza sativa*' nın 2250 bireyinde yapılan çalışmada fenotipik farklılık tanımlanmıştır. 17 morfolojik özellik kullanılarak ırklar içinde ve arasında varyasyon belirlenmiştir.

Singh vd (1991), 306 yerel *Phaseolus vulgaris* arasındaki genetik farklılığı morfolojik ve agronomik karakterleri kullanarak belirlemişlerdir. Bu değişkenler çoklu değişken analizi kullanarak analiz edilmiştir. Araştırmacılar, öncelikle normalite analizi yapmışlardır. Yaptıkları analiz sonucu tüm değişkenler yaklaşık bir normalite vermiştir. Ancak hipokotil ve çiçek rengi, büyüme şekli, tohum parlaklığı, ilk çiçeğe kadar olan boğum sayısı, mozaik virüsüne, yaprak biti,

bakteriyel hastalık, anthraknoza ve köşeli yaprak beneklerine reaksiyon gibi kesikli değişkenler normaliteden ayrı tutulmuşlardır. Analiz, normalite yapılan değişkenlerle yapılmıştır. Ancak numara verilerek değerlendirmesi yapılan kalitatif değişkenler ve kantitatif değişkenlerin birlikte kullanılarak yapılan kümeleme analizinde de herhangi bir farklılık bulunamamıştır.

Weber ve Wricke (1994)' e göre fenotipe bakılarak en kolay tanımlanabilen markörler genellikle olgun bitki döneminde alınabilmektedir. Bu nedenle bu markörleri tespit edebilmek için çok fazla populasyonlar yetiştirilmelidir. Birçok durumda albinizm, cücelik gibi mutant negatif karakterleri yöneten genlerin kullanılması gerekebilir ve bu da iyi uyum sağlamış ıslah materyali için bir dezavantajdır.

Bretting ve Widrlechner (1995)' e göre morfolojik markörler en eski ve en yaygın kullanılan genetik markörlerdir. En önemli avantajları ucuz olmaları, hızlı ve basit bir şekilde tanımlanabilmeleridir. Hatta herbaryum materyali ve ölü dokularda bile tanımlanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Ganesh ve Thangavelu (1995)' e göre çeşitlerin geliştirilmesi için kullanılan saf hat seleksiyonu yanı sıra, verim artışında bir değişimin sağlanması için başvurulmuş heterosis ıslahı kendine ve yabancı döllenmiş bitkilerde hibritlerin gelişimi için önemlidir. Genellikle farklı coğrafik orijinli genotiplerden oluşan hibritler benzer orijinli hibritlerden daha yüksek verimli olmaktadır.

Royo vd (1995), 18 ülkeden elde ettikleri 299 buğday çeşidinde çalışmışlardır. Araştırmada 23 farklı gözlem alınarak çeşitlere ait veriler temel bileşenler analizi ve kümeleme analizi ile değerlendirilmiştir. Veriler önce standardize edilmiş ve daha sonra temel bileşenler analizi uygulanacak veriler arasındaki varyabilite tayin edilmiştir. Daha sonra UPGMC (Unweighted pair-group method of centroid) kullanılarak kümeleme analizi yapılmıştır. Hem kümeleme hem de temel bileşenler analizi gruplar arasındaki farklılığı belirlemede etkili olmuştur.

Staub vd (1996)' e göre morfolojik markörler; sayılarının az olması, çevre faktörlerinden etkilenmesi, epistatik ve pleotropik etkilere maruz kalması, genellikle resessif olmaları ve birçoğunun mutasyonlar sonucu oluşması gibi olumsuz özellikleri nedeniyle kullanılışları sınırlı olmaktadır.

Tathdil (1996), gözlem veya ölçüm yoluyla elde edilen özelliklerin analizinin klasik istatistik teknikleri ile yapılamadığını, değişken adı verilen bu özelliklerin analizinde çok değişkenli analiz (multivaryete analizi) tekniklerinin geliştirildiğini belirtmiştir. Çok değişkenli analiz adı verilen bu tekniklerin amacının, bilimsel çalışmaların sayı ile ifade edilen sonuçlarının özetlenmesi, yorumlanması ve karar verilirken kullanılmasının sağlanması olduğunu belirtmiştir. Ayrıca araştırmacının geçerli ve güvenilir sonuçlar elde etmek için ele aldığı konuyu tüm yönleri ile değerlendirmek zorunda olması nedeni ile çok değişkenli veri ve bunların analizinin gerektiğini açıklamıştır.

Ahmad vd (1997), korolla rengi, gövdedeki antosiyanin, stipul şekli, çiçek rengi gibi morfolojik markörleri kullanarak *Lens* cinsindeki türleri sınıflandırmışlardır. *Lens* cinsine ait 22 örnekte morfolojik karakterlerle genetik ilişkiler araştırılmış ve *Lens culinaris* ssp. *orientalis*, *Lens nigricans* ve *Lens odemensis*'in aynı grupta toplandığı fakat *Lens ervoides* ve *Lens culinaris* ssp. *culinaris*'in ayrı ayrı gruplarda toplandığı belirtilmiştir.

Harch vd (1997), farklı ülkelerden toplanan yerfıstığını morfolojik özellikleri açısından değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar verilerin ortalama ve varyans analizlerinden sonra 9 kantitatif değişkenin normallik testlerini yapmışlardır. Kantitatif verilerin ortalamaları 0 ve varyansları 1 olarak standardize edilmiştir. Standardizasyonun özellikle kantitatif verilere dayanan çok değişkenli analizlerde oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra temel bileşenler analizi ve kümeleme için hiyerarşik kümeleme metodu kullanmışlardır.

Loi vd (1997), İtalya, İspanya, Fransa, Fas ve Yunanistan'dan toplanan 29 *Biscerula pelecinus* L. popülasyonunu 15 morfolojik özelliği ile değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda multivaryete analizlerinin germplasmin değerlendirilmesinde faydalı olduğu ve *Biscerula*'nın değerlendirilmesinde de coğrafik orijini aynı olan popülasyonlar benzer gruplarda yer almıştır.

Shoyama vd (1998), Japonya da morfin üretiminde kullanılan *Papaver somniferum* ve *Papaver setigerum* gibi *Papaver* türlerinin haşhaş kanunu ile kontrol altına alındığını bildirmişlerdir. *Papaver somniferum* ve *Papaver setigerum* kolayca tanınabilmektedir. *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale*'yi *P. bracteatum*'dan ayırmak özellikle vejetatif dönemde çok zordur. *P. pseudo-orientale* ve *P. orientale* süs bitkisi olarak yetiştirilmekte ve çiçekleri pembe, kırmızı ve dik pedisellidir. Çiçek rengi, petallerdeki siyah lekeler ve yaprak özellikleri araştırılmıştır. Golblatt (1974) *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale*'yi morfolojik görünüm ve kromozom sayısı ile 3 gruba ayırmıştır. Yakın zamanda her 3 türün de hibriti bulunduğundan *P. bracteatum* ve hibritlerinin kanun dışı yetiştirilmesi Japonya'da yaygınlaşmaktadır. Bu yüzden *Papaver* türlerinin kemotaksonomik ve morfolojik sınıflandırmasının zor olduğunu ifade etmektedirler.

Escribano vd (1998), 66 Amerikan orijinli yerel fasulye çeşidinde 14 kantitatif ve 5 kalitatif değişken kullanarak kümeleme analizi ile 11 gruba ayırmışlardır. Bu sonuçlara göre Meso ve Andean Amerikan gruplarından, Andean Amerikan çeşitleri 8 gruba ve Meso Amerikan çeşitleri ise 3 gruba ayrılmıştır.

Türker ve Türker (1999), veri tabloları oluşturulurken değişkenler üzerinde yapılan ölçümler, değişik ölçü birimlerinde olabildiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle, değişkenler arasındaki uzaklıkların hesabında yanlış yorumlamayı ortadan kaldıracak basit bir dönüşümle, veriler standartlaştırılabilir.

Akar (2002), morfolojik karakterlerin günümüzde de kullanılan çok yararlı bir yöntem olduğunu belirtmiştir. Ancak, incelenen özelliklerin çevre koşullarından

etkilenmeleri, her tür için morfolojik varyasyonun yeterli düzeyde olmayışı, çalışılan karakterlerin bir lokusla sınırlayıcı oluşu ve bazı karakterlerin ortaya çıkması için generatif döneme kadar beklenmesi bu yöntemi genetik varyasyonu ortaya koymada çoğu kez başarısız kıldığını belirtmektedir.

Carolan vd (2002), *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale* türlerini morfolojik, sitolojik ve fitokimyasal özellikleri ile ayırt edilebilmektedir. Fakat bunlar arasındaki farklılıkların her zaman net olmadığını ve türler arasındaki değişikliklerin birbirine geçiş yapabildiğini belirtmektedir. Yani interspesifik hibridizasyon olmaktadır. Fenotipik benzerliklerden dolayı hücre kültürlerinde kullanılan bitkilerde yanlış teşhis çok yaygın olmaktadır. Bu seksiyon içindeki türlerin teşhisi problemli olup çok sayıda süs ve bahçe çeşitleri oluşturulmuştur.

Deniz (2003), bazı *Papaver* türlerinde çiçek tozlarının *in vitro* çimlenmesini etkileyen faktörler üzerine araştırmalar yapmıştır. Çalışmada *Papaver orientale*, *P. pseudo-orientale*, *P. bracteatum* ve *P. somniferum* türlerine ait çiçek tozlarının *in vitro* çimlenme ve gelişimini etkileyen abiyotik faktörleri belirlemek amacıyla yürütmüş olup, farklı şeker, borik asit, potasyum nitrat, magnezyum sülfat, kalsiyum nitrat ve PEG dozlarını test etmiştir. *Papaver* türlerinin çimlenme oranı, çim borusu oluşturma oranı ve çim borusu uzunluğu bakımından kullanılan besin ortamlarına tepkisinde önemli farklılıklar olduğunu belirtmektedir. Ortam konsantrasyonları içerisinde en yüksek çiçek tozu çimlenme oranı %85, çim borusu oluşturma oranı %34 ve çim borusu uzunluğu 169 µm olarak *P. pseudo-orientale* türünden elde edildiğini bildirmektedir.

Arslan (2003) ve Krausch (2003)'ın bildirdiklerine göre ilk kez Tournefort'un 1700'lü yıllarda Gümüşhane ve Erzurum civarından topladığı *Oxytona seksiyonu*'na ait örnekler Paris'de yetiştirilerek Hollanda ve diğer Avrupa ülkelerine dağıtılmıştır.

Rezaei Osalou (2004), yapmış olduğu çalışmada Doğu Anadolu bölgesinden Ağrı, Hakkari ve Van bölgelerinden toplanan 66 farklı populasyon kullanılmıştır. Araştırmacı *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde sitolojik incelemelerde bulunmuştur. İnceleme

sonucunda her populasyonun kromozom sayısına göre türünü belirlemiştir. Buna göre araştırma sonucunda büyük bir çoğunlukla örneklerde 42 kromozom ve sadece 1 örnekte 28 kromozom bulunmuştur. Karışık veya tek olarak inceledikleri örneklerde *Papaver bracteatum*'a ($2n=14$) rastlayamadıklarını belirtmiştir.

Morfolojik markörlerin yararları:

- Genellikle dominanttır. Dominant bir geni resesif genden ayırmada kullanılır.
- Sayı bakımından çok azdırlar. Herbir çaprazlamada birkaç tane bulunur.
- Herbir lokusta 2 allel bulunur.
- Analizleri çok kolaydır.
- Haritalama populasyonunda yapılacak bir gözlemle kolayca belirlenirler. Örneğin; genetik haritalamada kullanılan bazı morfolojik markörler arasında, arpa'da gövde mumluluğu, kılçığın kaba veya düz olması, "rachila" tüylülüğü gibi (Kleinhofs vd 1993, Yıldırım ve Kandemir 2001).

Morfolojik markörlerin sakıncaları:

- Heterozigotları belirleyemezler.
- Mutasyonlarla oluşmuş olabilir.
- Çevresel faktörlerden etkilenirler.
- Epistatik veya pleiotropik etkilere maruz kalırlar.

2.3. Biyokimyasal Markörler (Enzim veya Protein Markörleri)

Morfolojik karakterlerin çevreden etkilenmelerini ortadan kaldırmak için geliştirilen protein markörleri, doğrudan gen ürünleri oldukları için çok önemli üstünlüklere sahiptirler. Eşbaskın (ko-dominant) markör oluşları ve birim başına maliyetlerinin düşük olması kullanım alanlarını artırmıştır. Ancak üzerinde çalışılacak lokus sayısının azlığı ve varyasyon oranının düşük oluşu bu tekniğin kullanımını sınırlamaktadır.

Tanksley (1983)' e göre enzim markörleri gen ürünü oldukları için DNA markörlerine göre sayıca azdır, dokulara ve gelişme dönemlerine göre değişkenlik gösterirler ve çevre faktörlerinden etkilenmelerinden dolayı kullanımları sınırlıdır.

Tanksley ve Orton (1983)' a göre enzim markörleri bitki türlerinin tanımlanmasında uzun yıllardan bu yana sıkça kullanılmaktadır. Örneğin, Rick vd. (1974), domateslerde izoenzim çalışmalarına 1973 yılında başlamışlar ve *Lycopersicon esculantum* ile Andean çeşitleri arasındaki genetik benzerliği araştırmada izoenzim metodunu kullanmışlardır. Bu çeşitler arasında ve *L. cerasiforme* ve *L. pimpinellifolium* arasında da Ge^P allelinin yaygın olduğunu belirtmişlerdir.

Bachmann (1993)' a göre önceki çalışmalar bitki enzimlerinin çok değişik formlarda olduğunu ortaya koymuştur. İzoenzimler genellikle eşbaskın allele sahip tek genle yönetilir ve lokus/allel modelleriyle açıklanabilirler. İzoenzim analizlerinde bitkilerin çeşitli organ ve dokuları kullanılabilmekte olup, analiz yöntemleri çok karışık değildir. İzoenzimlere ilaveten tohum depo proteinleri de birçok türde tanımlamalarda kullanılmıştır. Tohum depo proteinlerinin kullanılmasının önemi; tohumun saklanması kolay olması, tohumun toplam proteininden elektroforez yapılması ve izoenzimlerden kolay olmasından kaynaklanmaktadır. Enzimler ile DNA markörleri arasındaki farklardan birisi DNA markörlerinin sayıca çok fazla olmasıdır. Teorik olarak DNA markörleri genomun

tümünü kaplamaktadır. Bir başka deyişle, genom üzerinde kodlama yapan, kodlama yapmayan, tek kopya veya DNA dizi tekrarlarının da bulunduğu bölgelerin hepsinde DNA polimorfizmi meydana gelebilir. Oysa enzimi kodlayan lokuslar genom boyunca rastgele dağılım göstermemektedirler. Diğer bir ifadeyle, alloenzim markörleri genel olarak genlerin kodlama yapan dizilerindeki farklılıklarla ve fonksiyonel enzim gruplarıyla sınırlıdır. Bu nedenle de tüm genomu kaplamazlar.

Bretting ve Widrlechner (1995)' e göre bazı izoenzimler nötr olmadıklarından elektroforezde sadece amino asit dizisinde bulunan gerçek farklılığın sadece bir kısmını tespit ederler. Genetik çeşitlilik çalışmalarında aynı enzimatik aktiviteye ve elektroforetik yürüme oranına sahip izoenzimlerin homolog oldukları varsayılmasına rağmen amino asit analizi yapılmadan bu varsayım geçerli olamaz.

Spooner vd (1996), *Solanum tuberosum* ve *S. palustre*'ye ait 15 bireyde ve *S. fernandezianum*'un 4 bireyinde genetik uzaklıkların belirlenmesi için RAPD, RFLP, kloroplast DNA'sı ve izozim analizi yaparak değerlendirmişlerdir. Üç tür arasında izozim, RFLP ve RAPD sonuçları genel olarak uyumlu bulunmuştur. Kloroplast DNA'sı ise *S. tuberosum* ve *S. palustre*'nin *S. fernandezianum*'dan daha fazla birbirlerine benzediklerini göstermiştir. Türler arasında benzerlik ise izozimlerle daha düşük olmuş ve bunu sırası ile RAPD ve en yüksek RFLP olarak izlemiştir. Türler içinde ise RFLP en düşük ve RAPD en yüksek varyasyon göstermiştir.

Staub vd (1996)' nin bildirdiğine göre enzim markörleri genlerin ürettikleri proteinlerdir. İzoenzimler farklı olarak yüklenmiş protein molekülleridir. Elektroforez tekniği kullanılarak kolayca ayrılabilirler. Enzimler özel biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görülmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir. Renkli ürünler jel üzerinde görülür bantlar oluşturur. Bu bantlar genetik temellere sahiptir ve kodominant markör olarak genetik bilgi sağlar. Bununla birlikte morfolojik karakterlere göre çok daha yaygın

kullanılmakla birlikte izoenzim lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması kullanımlarını sınırlamaktadır.

Golembievski vd (1997), *Agrostis stolonifera* çeşitlerini belirlemek için izozim elektroforez metodunu kullanmışlardır. İzozim elektroforezde sınırlı sayıda izozim içermesinden dolayı oldukça yakın genotipler arasında çok az polimorfizm belirlenmiştir. Her izozim analizi için taze bitki örneklerinin kullanılması gerektiği, ayrıca izozim analizi için kullanılan proteinin RAPD için gereken DNA'dan daha stabil olduğunu belirtmiştir.

Erişen (1998), Güneydoğu Anadolu'da 5 farklı lokasyondan toplanan yabani buğday (*Triticum* sp. ve *Aegilops* sp.) türlerine ait populasyonlarla yapmış olduğu izoelektrik fokuslama, A-page ve SDS-page analizleri sonucunda populasyon içinde ve populasyonlar arasında zengin varyasyonların olduğunu tesbit etmiştir.

Crawford (2000)' a göre biyokimyasal markörlerin ilk grubunu enzimler oluşturmakta olup, enzimlerde izoenzimler ve alloenzimler olarak iki grupta toplanabilmektedir. İzoenzim farklı bir lokus tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formları olarak tanımlanabilir. Alloenzimler ise aynı lokustaki farklı alleller tarafından kodlanan bir enzimin farklı moleküler formlarıdır. İzoenzimler bitkilerde 1960'larda kullanılmaya başlanmıştır. İzoenzim verileri poliploidiyi araştırmada çok değerli olup, poliploidlerin orijinini ve evrimini araştırmada teşvik edici bir rol oynamıştır. Enzimlerin çok iyi bilinen sınırlılıklarına rağmen onların kullanımları hem genetik düzeyde hem de organizma düzeyinde olmakla birlikte, sistematik ve evrim ile ilgili sorular üzerinde yoğunlaşmıştır. Azalan ilgiye rağmen, enzim elektroforezi bitki sistematığına önemli bir etki yapmıştır ve bu alandaki önemini korumaktadır.

Kumlay vd (2000), protein ve DNA polimorfizmine dayanan moleküler teknikler, seleksiyonda etkili olan markörlerin kullanılabilmesini sağladığını belirterek bu

teknoloji sayesinde, yeni çeşitlere gidilmeden bitkinin genetik olarak modifikasyonu mümkün olabildiğini belirtmektedirler.

Yıldırım ve Kandemir (2001), enzim markörleri kendi içinde alloenzim ve izoenzim (izozim) olarak iki ana grup altında incelenmektedir. Alloenzim, birbirinden ayırt edilebilen allelleri bulunan enzimleri ifade etmektedir. Alloenzimler aynı genin farklı allelleri tarafından meydana getirilmektedir. Ancak pratikte bu kavram için yanlışlıkla izoenzim tabiri kullanılmaktadır. İzoenzim, farklı genler tarafından üretilen, ancak birbirine çok benzeyen enzimleri ifade etmektedir. Bu kavram kargaşası literatürde çok yaygın olarak bulunmakta ve birbirleriyle yer değiştirilerek kullanılmaktadır. Alloenzim veya izoenzimlerin birbirinden ayırt edilmeleri için de elektroforez tekniği kullanılmaktadır.

Enzim Markörlerinin Avantajları:

- Kodominant markörlerdir.
- Analizleri çabuk, ucuz ve güvenilirdir.
- Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmezler.
- Morfolojik markörlerden sayıca fazladır (<10) .

Enzim Markörlerinin Dezavantajları:

- Sayıları çok azdır.
- Bazı izoenzimlerin ancak özel dokularda ve belli bir gelişme periyodunda gözlemlenebilmesidir. Örneğin: Esteraz ve peroksidazlarda olduğu gibi.
- Çok azda olsa bazen epistatik etki gösterirler.

Biyokimyasal markörlere ek olarak spektrofotometrik ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemlerle alkaloit analizlerinin verileri *Papaver* cinsi için oldukça önemlidir. Çünkü *oxytona* seksiyonu alkaloitlerce zengindir. Ancak en fazla araştırılan türü *P. bracteatum*' dur. İlk kez, İran' da yetişen türde yüksek oranda tebain elde edilmiştir. Daha sonra Türkiye'de yetişen türde de araştırmalar yapılmıştır. Bunlar;

Sarıyar (1977), *P. bracteatum*'un Türkiye orijinli olanlarında major alkaloit salutaridin ve tebain olup, neopin, norsalutaridin, salutaridin N-oksit, tebain N-oksit gibi alkaloitler tespit etmiştir.

Phillipson vd (1981), *Papaver orientale* ve *P. pseudo-orientale* türlerine ait Türkiye orijinli materyaller üzerinde yapmış oldukları alkaloit araştırmalarına göre bu türler daha çok Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde bulunmaktadır. Türler göre majör alkaloit tespiti sonucunda *P. orientale* türüne ait bitkilerde genellikle oripavin ve bir bitkide ise mekambridin tespit edilirken, *P. pseudo-orientale* türüne ait bitkilerde salutaridin, izotebain ve alpigenin belirlenmiştir. Diğer yandan aynı araştırmacılar incelenen türler içersinden bazı *P. orientale*' ye ait bitkiler de ve inceledikleri *P. pseudo-orientale* türünün tamamına yakınında tebainin varlığından söz etmektedirler.

Palavitch ve Levy (1983), *Papaver bracteatum* Lindl. türünde tebain verimini etkileyen kültürel ve genetik faktörler üzerinde çalışmışlardır. *P. bracteatum*'un Lindl. genellikle ekiminden sonraki, ikinci gelişme yılında çiçeklenen çok yıllık bir tür olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada, erken sonbahar ekimi veya seçilmiş bir hattın doğrudan dikimi ile ilk gelişme yılında yüksek çiçeklenme oranının (% 96) sağlanabileceği vurgulanmıştır. Ekim zamanının gecikmesi halinde; ilk yılda elde edilen çiçeklenme oranı ve kapsül verimlerinin düştüğü belirtilmiştir. Sonbahar ekimlerinin köklerden tebain üretimi için kullanılabileceği, bitki sıklığının yoğun olması durumunda 2 g/m² tebain elde edilebileceği ifade edilmiştir. Kapsüllerden elde edilen tebain oranının köklerden elde edilene göre çok daha düşük olduğu ve kapsüllerden gelişme döneminin ilk yılında 0.69 g/m², ikinci yılında 0.7 g/m² tebain elde edilebileceği vurgulanmıştır. Bitki sıklığının artması durumunda, elde edilen bitki başına kapsül sayısı ve ağırlığının

azaldığı, ancak birim alandan elde edilen tebain verimini önemli derecede etkilemediği belirlenmiştir. Türlerdeki mevcut kendine uyumsuzluk sisteminden ve tebain içeriğinin oldukça yüksek kalıtımından yararlanılarak, yüksek verimli hibrit çeşitlerin geliştirilebileceği de bu çalışma da ifade edilmiştir.

Mc Nicholas ve Martin (1984), *P.bracteatum* 'un kapsülleri ve kökü önemli miktarda tebain içerdiğini belirtmişlerdir. Bu alkaloid kodein'in yapımında, üstelik morfinin rakibi sayılan alkaloidlerin sentezinde doğal bir önmadde olarak kullanılmaktadır.

Şenol (1988), tarafından yapılan bir çalışmada Türkiye'de Munzur dağlarında yetişen *Papaver bracteatum* ile Göynük/Toklular (Bingöl)'da yetişen *P. fuqax* kapsüllerinde tebain, Tutak/Bozdağ (Ağrı) ve Aktuzla-Malazgirt'te yetişen, *P. cylindricum* türünün kapsüllerinde ise narkotin miktar tayini yapmıştır. Türkiye kökenli *P. bracteatum* kapsüllerinin taşıdığı tebain miktarını, İran kökenli *P. bracteatum* kapsüllerindeki tebain miktar ile karşılaştırmak amacı ile bu iki örneğin aynı şartlarda tebain miktar tayini yapmıştır. Türk kökenli (Munzur dağ) *P. bracteatum* kapsüllerindeki tebain miktarı % 1.43, İran Kökenli (Arya II) olanında ise % 4.11 olarak gerçekleşmiştir. Tebain ile birlikte salutaridin alkaloidinin Türk kökenli *P. bracteatum* kapsüllerinde bulunmasının ekstraksiyon için bir engel teşkil etmediği görüşünde olduklarını bildirmiştir. Zira salutaridinden tebain elde edildiği bilindiğinden bu alkaloidin de kodein sentezinde kullanılması mümkündür. İkincisi ise salutaridin fenolik yapısı ile tebainden ayrılmakta ve bu da ekstraksiyonda bu alkaloidin ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. *P. fugax* türünün kapsüllerinde tebainin % 0.76 oranında bulunması türün bu alkaloidin elde edilmesinde kullanılabileceğini, ancak *P. bracteatum* türünden sonra düşünülebileceğini belirtmiştir. Ancak türde sadece tebainin ana alkaloid olarak bulunması bu türe üstünlük sağlayabilir. Ayrıca her iki türün kültür denemelerinin de yapılması gerektiği görüşünü belirtmektedir. *P. bracteatum* türünü İran orijinli ve Türkiye orijinli olarak ikiye ayırmış olup alkaloid kompozisyonunun farklılığını bildirmiştir. Buna göre İran orijinli *P. bracteatum* 'da bulunan major alkaloid tebain olup, alpinigenin, alpinin, braktamin, braktein, kodein, koptisin, koripalin, epialpinin, floripavidin, 1,4 β-hidroksikodein, 1,4 β-

hidroksikodeinon, izotebain, mekambridin, neopin, N-metikoridaldin, o-metilkoripallin, o-metilflavinantin, orientalidin, oripavin, oksisanguinarin, protopin, papaverrubin B, D, E, salutaridin, tebain, tebaine N-oksit, tebain metohidroksit, tebaol gibi alkaloidler bulunmuştur (Santavy 1970-1979, Preininger 1986, Thenuns vd 1987). Türkiye kökenli *P. bracteatum* türünde ise; neopin, salutaridin, norsalutaridin, salutaridin N-oksit, tebain, tebain N-oksit (Sarıyar 1977) gibi alkaloidler tespit edilmiştir.

Palevitch and Levy (1990), bir tebain kaynağı olarak *P. bracteatum*' un ıslahı üzerine çalışmalar yürütmüşlerdir. Morfinin yokluğu ve yüksek tebain içermesi sebebiyle *P.bracteatum* bağımlılık yapmayan ilaçlar ile kodein üretiminde ham madde kaynağı olması açısından bir öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Yasa dışı morfin ve eroin üretimi için oldukça karmaşık olduğu düşünülen kimyasal işlemlerin aksine, tebainin, nispeten basit kimyasal işlemlerle kodeine dönüştürülebildiği vurgulanmıştır. Araştırmacılar İsrail'de bu yabancı türlerin; modern kültürel uygulama ve ıslah teknikleri ile geliştirilmesi için bir dizi çalışmalar yürütmüşlerdir. İran'ın iki farklı bölgesinden temin edilen yabancı populasyonlar içerisinde tebain içeriği bakımından geniş bir varyasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Tebain veriminin düşük kalıtım gösterdiği, bu yüzden düşük seleksiyon tepkisine sahip olduğu vurgulanmıştır. Ancak kapsüllerin tebain içeriğinin yüksek bir seleksiyon tepkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Kolkisin ile tetraploidleştirilen bitkilerde kapsüldeki tebain içeriğinin önemli derecede arttığı ancak, bu bitkilerin kapsül sayısının düşük olması sebebiyle toplam tebain veriminde az da olsa bir azalmanın olduğu belirtilmiştir. Kışları soğuk geçen bölgelerde yapılan seleksiyonla, erken yapılan dikim ve yetiştiricilik sonucu; bu çok yıllık bitkilerin yüksek çiçeklenme oranına sahip oldukları ortaya konulmuştur. Yapraktan GA₃ uygulamasının da çiçeklenmeyi arttırdığı belirtilmiştir. Özellikle de geç çiçeklenen klonlarda GA₃ uygulamasının çiçeklenmeyi arttırdığı saptanmıştır. Tebain içeriğini etkilemeksizin bitki başına tebain veriminin; kapsül sayısındaki ve biyolojik verimdeki artma sebebiyle artış gösterdiği vurgulanmıştır. Ayrıca köklerde tebain içeriğinin çiçeklenme başında en yüksek olduğu da belirtilmiştir.

Arslan (1991), *Papaver bracteatum* hatlarının kapsülleri üzerinde yapmış olduğu çalışmada tebain oranının varyasyon gösterdiğini ifade etmiştir. 1987 yılında 88 *Papaver bracteatum* hattından elde edilen kapsüllerde ortalama tebain oranı %1.54 (0.17-3.35) iken, 1988 yılında deneme sonucunda 74 bitki ve bu hatlara ait 206 bitkide ortalama tebain oranı %1.82 (0.69-3.36) olarak tesbit etmiştir.

Levy and Milo (1991), yaptıkları çalışmada *P. bracteatum* ve *P. pseudo-orientale* türleri ile birlikte bu türlerin arasında oluşturulan hibrit bitkiler, alkaloit profili ve morfolojik değerler açısından dikkate alınmıştır. Çoğu karakter konusunda hexaploit olan *P. pseudo-orientale*'nin baskın olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın amacının majör alkaloitlerin kalıtımının açıklanması olduğunu belirtmişlerdir. Majör alkaloit *P. bracteatum*'da tebain ve *P. pseudo-orientale*'de izotebain olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu alkaloitlerin biyosentetik sırları ve türlerin ıslahı da tartışılmıştır.

Shoyama vd (1998), HPLC ile araştırılmış örneklerde kantitatif tebain analizi yapmışlardır. *P. bracteatum* kuru sakızında (latex) % 40 tebain bulunmuştur. Önceki çalışmalarda *P. bracteatum*'da % 26-45 tebain olduğu görülmüştür (Sharghi 1967, Lalezari 1973, Nyman vd 1979). *P. pseudo-orientale* belirtilen limitin altında görülmüştür. F1 hibritlerde % 8-11 arasında tebain bulunmuştur. Diğer taraftan bir önceki makalesinde Nyman vd (1979) kuru yaprak örneklerinde 0.02-0.37 tebain olduğunu bildirmiştir. Latex ile karşılaştırınca tebain içeriği 1/1000 dir. Bundan dolayı *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver* türleri tebain miktarı ile teşhis edilebildiğini bildirmişler. ELISA ve HPLC ile alkaloit tayini, kromozom sayısı, RAPD analizleri ve morfolojik özellikler *Papaver* türlerinin tanımlanmasında güvenli bir şekilde kullanılabilir.

Carolan (2002), *Oxytona* seksiyonuna ait türlerdeki/hatlardaki alkaloit analizi; tebain, izotebain, oripavin ve salutaridin referans standart R_f değerleri sırayla 0.54, 0.57, 0.42 ve 0.46 bulunmuştur. *In vitro* gelişen ve rejenere olan bitkilerde en fazla alkaloit miktarı (R_f 0.57) olarak izotebain tesbit etdirmesinin yanında birçok bilinmeyen alkaloit bulunmuştur. Örneğin *Papaver bracteatum* 22. 30 ve 31 ile *P.*

pseudo-orientale'nin 36. ve 40. hatlarında dominant alkaloid izotebain (R_f 0.57) olarak bulunmuş olup, aynı tür ve hatlarda tebainenin de (R_f 0.54) bulunduğunu bildirmiştir. Ancak *P.orientale*'nin 35. hattında oripavin (R_f 0.42) dominant alkaloid olarak bulunmuştur.

Sarıyar (2002), *P. orientale* türünde major alkaloidin oripavin olduğunu, ancak mecambridin, isotebain, salutaridin, oripavin, tebain, mecambridin, orientalidin, alpinin gibi alkaloidlerde bulunduğunu bildirmiştir. *P. pseudo-orientale*'de major alkaloid olarak izotebain, mecambridin ve orientalidin olup, alpinigenin, alpinin, bracteolin, papaveroksin, papaveroksinolin, papaveroksidin, salutaridin gibi alkaloidleri bulmuştur. *P. bracteatum*'da ise tebain ve salutaridin major alkaloid olarak belirlenmiş olup, tebain-N-oksid, izotebain, oripavin gibi alkaloidler bulunmuştur. Bu çalışmada *P. pseudo-orientale*'de ilk olarak macrantalın, makrantaldehid, makrantoridin, narkotindiol, papaveroksin, papaveroksinolin, papaveroksidin ve *P. bracteatum*'da salutaridin-N-oksid alkaloidi belirlenmiş olduğunu bildirmektedir.

2.4. DNA Markörleri

En basit hücre diyebileceğimiz canlılar bile karmaşık bir yapıya sahip olup, çeşitli moleküllerden oluşmaktadır. Bu nedenle, öncelikle ilgilenilen molekül grubunu hücredeki diğer kısım ve moleküllerden ayırmak ve daha sonra da, yapılacak çalışmaların durumuna göre saflaştırma işleminin yapılması gerekmektedir. Moleküler biyolojideki araştırmalar, büyük ölçüde, saflaştırılmış moleküllerle yapılan çalışmalara dayanmaktadır.

Nükleik asit temeline dayalı genetik markörlerin genom analizlerinde kullanımı ıslahçılar için ihtiyaç duyulan bir alandır. Bu markörler kullanılarak genetik varyasyon araştırılabilir. Örneğin birbirine çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlaması yapıp, filogenetik akrabalıkları bulunabilir (Lowe vd 1996). Soyağacı analizleri, bağlantı

haritalamaları ve seleksiyon programlarında kullanılabilir. DNA polimorfizmi, klasik morfolojik veya biyokimyasal markörlerden daha fazladır. Bu markörler kullanılarak çaprazlamaları oldukça zor olan türlerin kromozom haritalamaları yapılabilir. Moleküler markörlerin buna benzer pek çok avantajı vardır.

Doğadaki yabani varyetelerin toplanması ve moleküler düzeyde tanımlanması ekonomik değeri olan çeşitlere yeni ve üstün özellikler kazandırılması açısından önemlidir (Bothmer vd 1991). Bu varyetelerin genitör olarak kullanımı ve moleküler yöntemlerle istenilen tiplerin seçimi klasik ıslah yöntemlerindeki güçlüklerin aşılmasına yardımcı olmaktadır.

Bütün bir genomun analiz edilebileceği DNA'yı elde etmek için az miktarda bitki dokusu yeterli olmaktadır. Bitkiden alınan herhangi bir kısım DNA izolasyonu için kullanılabilir (Botstein vd 1980). DNA markörleri stabildirler, tüm dokularda ortaya çıkabilirler, ekolojik koşullardan etkilenmezler (Williams vd 1990). Epistatik ve pleiotropik etkilere hassas değildirler, kodominant ya da dominant özellikte olabilirler, kalıtımı basit ilkelere sahiptir.

Tüm yüksek yapılı organizmaların (ökaryotlar) genomlarındaki bir veya daha fazla özelliğin karakterizasyonu DNA bantlarının ortaya koyulması ile olur. Farklı büyüklükte ve farklı sayıdaki DNA bantlarının analizi her birey için spesifiktir. Bu bantların ortaya koyulması ile her birey için DNA parmakizi elde edilmiş olur.

DNA profillerinin çıkarılması ve spesifik DNA parmakizlerinin elde edilmesi şu şekilde sıralanabilir;

- Bitkisel materyalin temini,
- Bitkisel materyalden DNA izolasyonu,

- Kullanılacak yönteme göre, genetik materyalin çoğaltılması (PCR),
- Bireyler arasındaki polimorfizimin farklı moleküler markör teknikleri ile belirlenmesi (RAPD, RFLP, SSR, AFLP, SCAR, SSCP...),
- DNA bant profillerinin spesifik bir programda analiz edilmesi

RAPD-PCR metodu PCR'a dayalı önemli metodlardan birisi olup, tesadüfi bir dizilime sahip 10 bazlık primerleri kullanarak *in vitro* şartlarda enzimatik yollarla DNA'nın çoğaltılması esasına dayanır.

Melchinger (1990)' e göre önemli agronomik özelliklerin fenotipik seleksiyonu, ıslah çalışmalarında zaman alan bir yöntemdir. Morfolojik markörler yardımıyla seleksiyon gibi geleneksel yöntemlerde; markörlerin azlığı, pleiotropik ve epistatik etkilerin bulunması ve çevre koşullarının değişken olması gibi sorunlarla karşı karşıya kalınmaktadır. Moleküler markörler yardımıyla seleksiyon ise, bu tür sorunlardan kaçınmak ya da çözmek için bir potansiyeldir. İki ebeveynin melezlemesinden oluşturulan bitki populasyonlarından yararlanılarak yürütülen çalışmalarda, istenilen genlerle ilişkili markörler tespit edilerek bunları ıslah çalışmalarında erken seleksiyon kriteri olarak kullanmak veya bu markörlerden hareketle ilgili genlerin klonlanmasını sağlamak amaçlanmaktadır.

Michelmore vd (1991), markörler yardımı ile seleksiyonda başarı sağlamak için gene bağlı olan özelliğin tanımlanmasının gerektiğini belirtmektedir. Bunun için ıslahçının ilgili gen için "ayrılmış-segregating" populasyonun oluşturulmasına ihtiyaç vardır. Hedeflenen gen ile markörler arasında ilişki Bulk Segregant Analizleri (BSA) ile de tanımlanabilir.

Knapp (1994), ayrıca markörler yardımıyla seleksiyon (MAS), kantitatif özelliklerin seleksiyonu ve kalıtım mekanizmasının araştırılmasında, moleküler

bağlantı haritalarının oluşturulmasında ve tamamlanmasında da potansiyel olarak karşımıza çıktığını belirtmektedir.

Wilson ve Walker (1994)’ DNA çok kolay bir şekilde kırılabilir. Bu kırılmaların sebepleri arasında DNaz’lar ve izolasyon sırasında uygulanan fiziksel güç olabilmektedir. DNA izolasyonu sırasında dokuları ezmek için sıvı azot kullanılmadığından dolayı dokuların parçalanmasıyla aktif hale geçen DNaz’lar DNA’nın kırılmasına neden olabilmektedir.

Boskovi ve Tobutt (1996), moleküler markör teknolojileri, bitki ıslahı ve gen kaynaklarının korunması konusunda çalışanlara pek çok türde yeni ufuklar açtığını bildirmektedir. Bununla beraber bu teknolojilerin çok yüksek maliyetlerde olması tüm dünyada bazı türler için ortak projeler yapılarak istenilen hedeflere ulaşılmasını kolaylaştırmıştır (Beaver ve Lezzoni 1993). Markörler yardımı ile seleksiyon (MAS), QTL analizleri (Beckman ve Soller 1986), karşılaştırılmalı haritalama (Powell vd 1996), gen izolasyon stratejileri (Vos vd 1995), gen kaynaklarının karakterizasyonu, filogenetik analizler ve kültür çeşitlerinin tanımlanması gibi analizlerde kullanılan moleküler markörler, izelge 2.1’ de kategorize edilmiştir. Her markör sistemi için önemli olabilecek özellikler karşılaştırılmalı olarak belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı markör sistemlerinin karşılaştırılması.

2.4.1. Hibridizasyona dayalı DNA (RFLP) markörleri

DNA molekülünün iki zincirinin birbirinin tamamlayıcısı olması özelliği nedeniyle DNA/DNA veya DNA/RNA arasında melez moleküller oluşturulması temeline dayanan bu yöntem, istenilen DNA parçalarının genomdaki yerlerinin belirlenmesini sağladığı gibi bu parçaların nükleotid dizilerinin araştırılmasında da kullanılmaktadır. Ayrıca homoloji derecesine bakılarak farklı organizma gruplarına ait genlerin ya da DNA parçalarının nükleotid dizisi benzerlikleri araştırılarak, bu organizmaların yakınlık dereceleri moleküler düzeyde tespit edilebilmektedir.

Nükleik asit hibridizasyonu, DNA'nın kromozomda yerleşim biçimini bozmadan *in situ* yapılabildiği gibi daha çok jel elektroforezinde ayırımı yapılmış DNA ya da RNA'nın bir filtreye aktarılması ("Southern" veya "Northern blotting") ve daha sonra herhangi bir şekilde işaretlenmiş tamamlayıcı bir nükleik asit parçası (prob) kullanımıyla sağlanmaktadır.

Kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi denilen ve çeşitli şekillerde kesici enzimler (restriksiyon enzimleri) ile kesilerek etiketlenmiş DNA parçalarının (prob) araştırılan DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişdeki DNA hibridizasyonuna dayalı bir sistemdir. Kesilen DNA parçacıklarının jel elektroforez yöntemi ile koşturularak ayrıştırılmasını ve bu parçacıkların membrana emdirilmesi (blotting) sonucunda prob DNA hibridizasyonu olaylarını içermektedir.

RFLP (kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi) tekniği kesim enzimlerinin tanıdığı bölgedeki tek nükleik asit baz değişikliğini dahi tanır. Tanıma yerlerinin baz diziliş değişikliği farklı genotipler rasındaki polimorfizmin sebebi olabilir. Ancak bu polimorfizm daha yaygın olarak kesici enzimlerinin tanıdığı iki kesim bölgesi arasında parça eklenmesi (insertion) veya çıkarılmasından (deletion) kaynaklanmaktadır.

Botstein vd (1980)'e göre RFLP markörleri genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri kullanılarak spesifik bölgelerden kesilmesini sağlar ve çok sayıda DNA bandı elde edilebilir. Southern blot yapılarak DNA bantları elde edildikten sonra elektroforezde ayrılarak nitrosellüloz ve naylon membrana transfer edilir. DNA filtre edilerek sabitleştirilir ve radyoaktif olarak etiketlenmiş probe DNA ile hibridize olmaya hazır hale getirilmiş olur.

Tanksley vd (1989), moleküler tekniklerden ilki Botstein ve arkadaşları tarafından (1980) ortaya konan ve hibridizasyona dayalı olan kesilen parçaların uzunluk polimorfizmi (RFLP) tekniğidir. RFLP'ler türlerin tanımlanması, genetik haritalama, markör yardımıyla seleksiyon gibi moleküler biyoloji konularında yaygın olarak kullanılmıştır.

Bretting ve Widrechner (1995), RFLP tekniğinin; DNA amplifikasyonuna dayalı moleküler tekniklere göre pahalı olması (Rafalski ve Tingey 1993), radyoaktiviteye ihtiyaç duyması, zaman alıcı ve fazla miktarda DNA gerektirmesi ve uygulamasının zor olması gibi dezavantajlarının olduğu belirtilmektedir.

Bark ve Havey (1995)'e göre RFLP markörleri kodominant markörlerdir. Herbir lokusta çok sayıda allel vardır. Sayıları morfolojik ve enzim markörlerinden çoktur (genellikle <100). Bu markörlere dayalı haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görülebilir (Walton 1993). Ancak buna rağmen sıkça kullanılmaktadır. Özellikle kültür bitkilerinde genetik çeşitlilik tespitinde, yabani türler ve populasyonlarda ve *Allium* (soğanlar) türlerinde kullanılmaktadır.

RFLP analizlerinin bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Bunlar;

RFLP tekniğinin avantajları:

- Türler, cinsler hatta familyalar arasında transferi mümkündür. Bu özelliklerinden dolayı bir bitki türünde RFLP markörü birkez haritalanırsa

akraba olan birçok bitki sistemi için o haritalama bölgesinde potansiyel bir markör bulunuyor demektir. Bu olay birçok tahıl ürününde rutin hale gelmiş durumdadır.

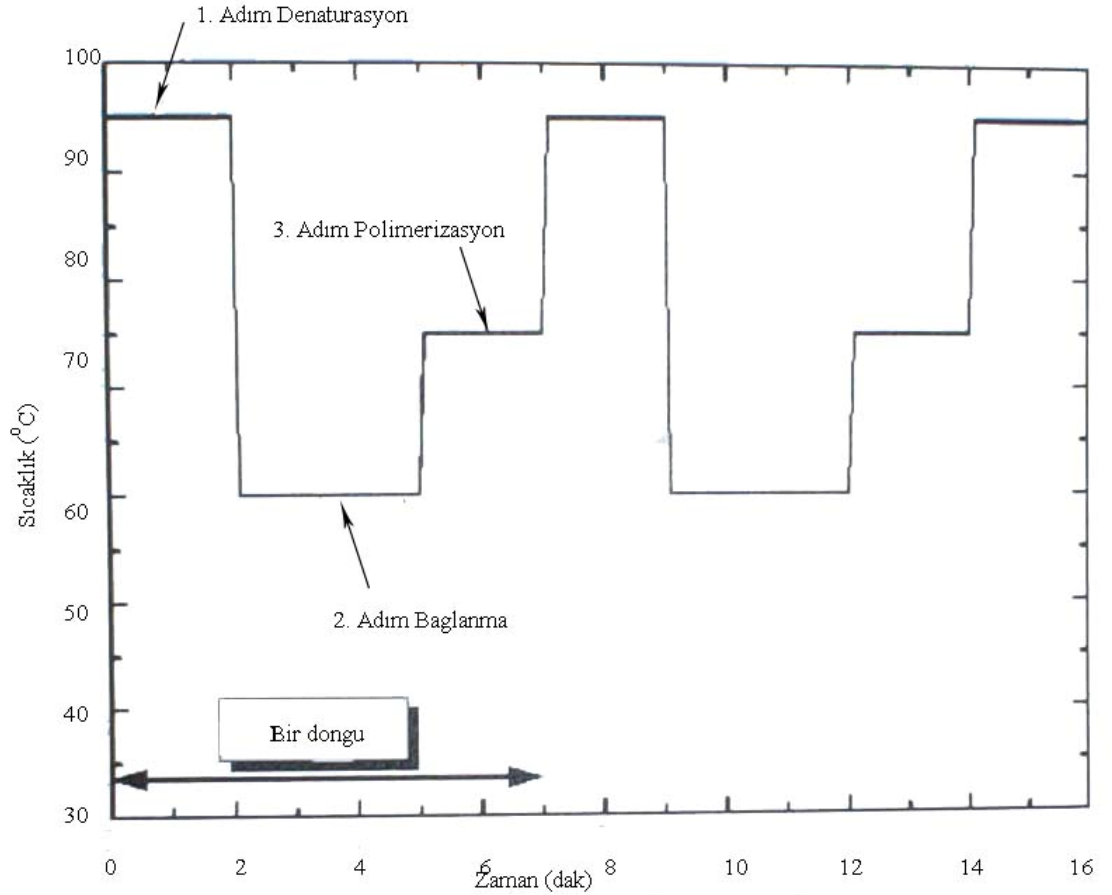
- Güvenilirdir. Farklı laboratuvarlarda ve farklı araştırmacılar tarafından aynı sonuçlara ulaşılabilir.
- RFLP markörleri kodominant özellikte oldukları için heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonlarında kullanılmaktadırlar.
- Orta düzeyde polimorfizm göstermektedirler.

RFLP tekniğinin dezavantajları:

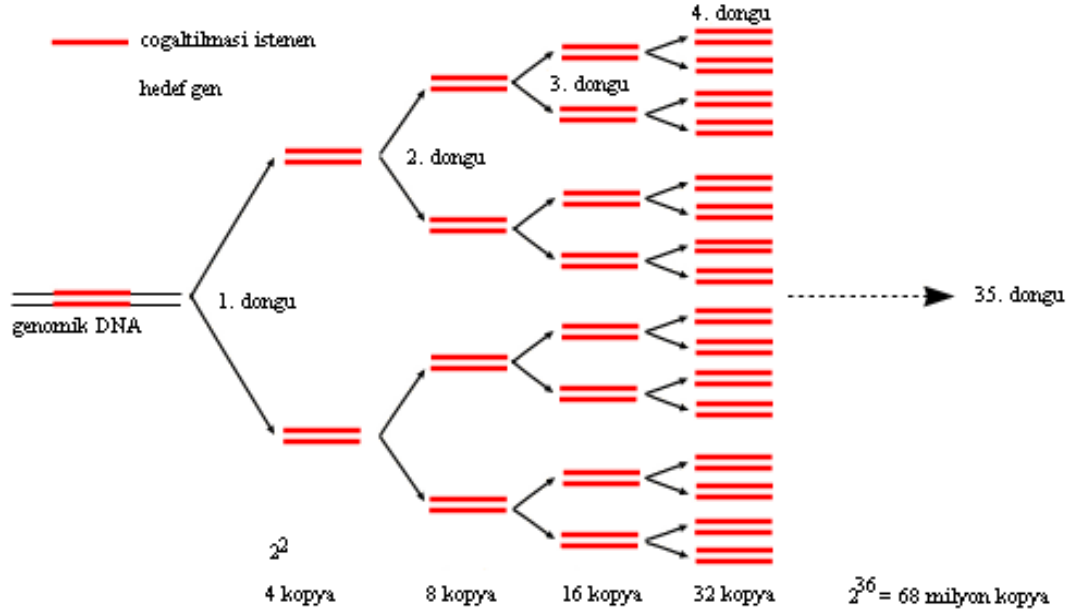
- Analizleri pahalı, fazla zaman alıcı ve çok fazla iş gücü gerektirmektedir.
- Çoğu durumlarda yaygın olarak radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmaktadır.
- Yüksek kalitede DNA'ya ihtiyaç vardır (10-20 µM).
- Az kopye edilen dizilişlerin genomlarda belli noktalarda kümelenmelerinden dolayı RFLP markörleri genom üzerinde rastgele dağılım göstermezler. Buda haritalamayı olumsuz yönde etkilemektedir. Çünkü haritalarda büyük boşluklar görülebilir (Watson vd 1992, Yıldırım ve Kandemir 2001).

2.4.2. PCR' a dayalı DNA markörleri

PCR (Polimeraz zincir reaksiyonları) Hücrede normal şartlar altında gerçekleşebilen doğal DNA replikasyonunun laboratuvar şartlarında özel cihazlar "termocycler" yardımı ile gerçekleşmesi olayına denir. Burada nükleik asit dizilerinin kalıp DNA' ya göre çoğaltılması gerçekleştirilir. Ancak, bu eşleme ve çoğaltım çok hızlı bir şekilde ve çabuk olduğundan az miktardaki bir DNA parçasından çok fazla miktarda (2^n sayıda, n=döngü sayısı) DNA oluşturulmaktadır (Şekil 2.1 ve Çizelge 2.3).



Şekil 2. 1. PCR' ın çalışma prensibi (<http://orion.ufgrs.br/depbiot.uyarlanmistir>)



Şekil 2. 2. Çift zincirli bir DNA iplikciğinden PCR sonucu oluşan toplam DNA miktarı ([http://orion.ufgrs.br/depbiot. uyarlanmıştır](http://orion.ufgrs.br/depbiot.uyarlanmiştir))

Çizelge 2.2. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen DNA molekülü miktarı (Watson vd 1992)

Döngü NO	Elde Edilen DNA Molekülü Sayısı	Döngü NO	Elde Edilen DNA Molekülü Sayısı	Döngü NO	Elde Edilen DNA Molekülü Sayısı
1	2	11	2048	21	2. 97152
2	4	12	4096	22	4. 94304
3	8	13	8192	23	8.388608
4	16	14	16384	24	16.777.216
5	32	15	32768	25	33.544.432
6	64	16	65536	26	67.108.864
7	128	17	131072	27	134.217.728
8	256	18	262144	28	268.435.456
9	512	19	524288	29	536.870.912
10	1024	20	1.048576	30	1.073.741.824

Botstein vd (1980), a göre Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin ortaya koyulması ile RAPD (Random/Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) markör sistemleri de geliştirilmiştir.

PCR, Kary Mullis (K. B. Mullis, U.S. patent 4 683 195, Temmuz, 1987) tarafından geliştirilmiş olup, moleküler biyolojinin hızlı bir şekilde gelişmesinde katalizör

olmuştur (Steffan ve Atlas, 1991). PCR metodu adli tıptan ekolojiye ve DNA diagnostik çalışmalarından temel araştırmalara kadar her alanda uygulanma fırsatı bulmuştur. PCR tekniğinin hızlı bir şekilde kabul görmesinin sebebi onun basitliği, kolaylığı ve hızından dolayıdır (Kumar 1989). PCR'ın çalışma prensibi ise çok az miktardaki (genellikle ng düzeyindeki) kalıp DNA'da istenen bölgelerin *in vitro* koşullarda enzimatik yollarla milyonlarca kez çoğaltılıp, jelde yürütüldükten sonra boyanarak görüntülenmesi şeklindedir. PCR tekniğinin uygulanması thermocycler içinde *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmekte olup, gerekli reaksiyon karışımı kalıp DNA'yı, nükleotid karışımını (dNTPs), bir ya da iki tane oligonükleotid primeri, DNA polimeraz enzimini, tampon çözeltisini ve $MgCl_2$ içerir. Çalışmada kullanılacak kalıp DNA incelenecek organizmalardan çeşitli yöntemlerle elde edilir. Primerler kalıp DNA da çoğaltılmak istenen bölgeye özeldirler ve PCR primerleri genellikle 10-33 adet baz içermektedirler. PCR tekniğinde günümüzde en yaygın olarak kullanılan polimeraz enzimi Taq polimerazlardır. Bu enzim optimum $72^{\circ}C$ sıcaklıkta çalışmakta olup, $94^{\circ}C$ gibi yüksek sıcaklığa da dayanıklıdır.

Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, oligonükleotid primer, Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarları, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı gibi termalcycler parametreleri DNA amplifikasyonunu etkiler. Bundan dolayı kritik parametreler moleküler tekniklerden herhangi birisinin çalışmalarına başlamadan önce optimize edilmelidir

PCR'ın çalışma prensibi ard arda tekrarlanan üç basamaktan oluşur;

- Çoğaltılacak DNA'nın yüksek sıcaklıklarda denatürasyonu ve bu işlem sonucunda tek sarmallı polinükleotid zincirinin oluşturulması,
- Kullanılan primerlerin oluşturulan bu tek zincirli DNA molekülünde hedef

bölgelere bağlanması,

- DNA polimeraz enzimi kullanılarak primerlerin DNA zincirini tamamlayacak şekilde uzatılarak tekrar çift zincirli DNA oluşturulmasıdır.

PCR tekniğinde yapılan bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve döngü sayısı 25-60 kez tekrarlanır.

PCR tekniğinin kullanım alanları

- Tanı ve Teşhis
- Genetik Yapısı Değiştirilen Bitki veya Mikroorganizmaların Tespiti
- Moleküler Klonlama (DNA Klonlaması)
- DNA Baz Dizilişlerinin Belirlenmesi
- Genetik Akralık Tesbiti ve Adli Tıp Vakalarının Tesbiti

Polimeraz enzimleri

İlk termostabil DNA polimeraz sıcak su kaynaklarında yaşayan *Thermus aquaticus*'dan izole edilerek saflaştırılan Taq polimerazdır. Bu enzim 110 kD ağırlığında olup, 95 °C daki yarı ömrü yaklaşık 40 dakika kadardır. G + C' lerce zengin bazlara sahip hedef DNA'lar amplifikasyonda daha etkili olmaktadır. Bu enzim aynı zamanda geniş bir Mg⁺ iyon konsantrasyonunda (2-10 mM) aktiftir. Böyle bir durum, aynı reaksiyon tüpünde 2 veya daha fazla ve farklı hedef DNA sekanslarında aynı reaksiyon ortamında amplifikasyonu sağlamaktadır (Multipleks PCR).

Son yıllarda birçok termostabil enzim izole edilmiş ve denenerek başarılı sonuçlar alınmıştır. Bunlar arasında *Thermococcus litoralis*'den Vent polimeraz, *Thermus thermophilus*'dan Tht polimeraz ve *Pyrococcus furiosus*'dan da Pfu polimeraz enzimleri elde edilmiştir (Çizelge 2.3). Bu üç termostabil enzimin birbirinden ve Taq polimerazdan bazı üstünlükleri bulunmaktadır. Şöyleki; Taq polimerazın 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi bulunmamaktadır. Bu nedenle DNA'nın amplifikasyonu sırasında yanlış bazların sıraya girmesi halinde (her 1000 bazda bir baz) bunları tanıyarak çıkaramamakta, böylece sentez devam etmekte ve uygun olmayan bir polimerizasyon gerçekleşmektedir. Bazların bu yanlış dizilmesi problemi ortama katılan baz sayısının ve MgCl₂ iyon konsantrasyonunun azaltılması ile giderilmeye çalışılmıştır. Vent polimeraz'ın 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi ve yanlışlıkları düzeltme özelliği bulunmakta olup, ortamda fazla dNTP ve MgCl₂ iyonları bulunması durumunda Taq polimeraz'dan daha iyi sonuç vermektedir.

Çizelge 2.3. Polimeraz Enzimleri ve Kaynakları (<http://orion.ufgrs.br.depbiot.>)

DNA Polimeraz	Doğal veya Rekombinant	Kaynak
Taq	Doğal	<i>Thermus aquaticus</i>
Amplitaq®	Rekombinant	<i>T. aquaticus</i>
Amplitaq (Stoffel fragment)®	Rekombinant	<i>T. aquaticus</i>
Hot Tub™	Doğal	<i>Thermus flavus</i>
Pyrostase™	Doğal	<i>T. flavus</i>
Vent™	Rekombinant	<i>Thermococcus litoralis</i>
Deep Vent™	Rekombinant	<i>Pyrococcus GB-D</i>
Tth	Rekombinant	<i>Thermus thermophilus</i>
Pfu	Doğal	<i>Pyrococcus furiosus</i>
ULTma™	Rekombinant	<i>Thermotoga maritima</i>

TM: Ticari Marka R: Kayıtlı ve Tescilli Marka

Arı (1999), termostabil DNA polimeraz enziminin PCR' da kullanılmaya başlanması araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağladığını belirtmektedir. Önceleri kullanılan *Escherichia coli*'nin DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti sıcaklığa

dayanıklı olmadığı için, her PCR döngüsünde denatürasyon aşamasından sonra yeniden enzim ekleme zorunluluğu duyulmaktaydı. Ancak günümüzde kullanılan termostabil DNA polimerazlarla bu sorun ortadan kalktığından enzimin amplifikasyonun başlangıcında tüplere konulması yeterli olmaktadır.

2.4.2.1. RAPD (Rastgele oligonükleotid primerleri ile çoğaltılmış polimorfik DNA'lar)

6-10 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı (primer) DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Bir primer kullanılır. Ancak, bunlar her iki iplikte de 5'→3' yönünde çalışır. Dolayısıyla kullanılan primerin DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye yapışabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır.

PCR (polimeraz zincir reaksiyonları)'ın keşfi ile DNA polimorfizimini araştıran yeni markör sistemleri ortaya koyulmuştur. Bunlardan biri olan RAPD markörleri Williams vd (1990) ve Welsh ve Mc Clelland (1990) tarafından; basit, kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın tesadüfi olarak dağılmış segmentlerle amplifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Amplifikasyon ürünleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezde ayrılabilir ve etidyum bromid ya da gümüş nitrat boyaması ile görüntülenebilmektedir. RAPD tekniği markör teknolojisinde uygulanmasındaki kolaylık, sentetik oligonükleotidlerin çok fazla sayıda bulunması ve kolay olması, RFLP'nin tersine düşük miktarda ve düşük kalitede DNA'ya gereksinim duyulması gibi nedenlerden ötürü tercih edilen markörlerdir.

Devos ve Gale (1992), diğer PCR esaslı teknikler gibi RAPD tekniği de haritalama ve karakterizasyon çalışmalarında daha az zamana, çalışmaya ve gidere gereksinim duyulması nedeniyle daha çok tercih edildiğini bildirmektedir. Özellikle RAPD yöntemi çok az bir DNA parçasına gereksinim duymalarından ötürü birçok bitki türünde beklenen düzeyde sonuçlar vermiştir.

Dweikat vd (1993), tahıl türlerine ait çeşitlerin pedigri analizlerinin RAPD-DGGE ile incelenmesine yönelik bir araştırmada; Denature Gradient Jel Elektroforezin (DGGE) RAPD analiziyle kombine edilmesi sonucunda çok yakın çeşitler arasında bile tekrarlanabilir DNA polimorfizminin elde edilebileceğini, bir ya da iki primerle ekmeklik buğdayları sertlerden; iki sıralı arpaları, 6 sıralılardan ayırt edebilmişler ve DGGE-RAPD tekniğinin DNA' daki polimorfizmi belirlemek için RFLP, Agaroza-RAPD ya da poliakrilamid-RAPD yöntemlerinden daha güvenilir sonuç verdiğini ileri sürmüşlerdir.

Kubota vd (1993), RAPD analizi *Papaver* cinsi *oxytona* seksiyonu türleri ve fl hibritlerini kolay teşhis için Japonya da yaygınlaşmakta olduğunu ve kanun dışı yetiştirilmiş *Papaver* türlerini tanımda kullanıldığını bildirmektedir.

Barriga vd (1994), RAPD'in genetik belirleyici olarak kullanabilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada genomik DNA'dan seçilmiş primerler ve optimize edilen reaksiyon koşullarında tekrarlanabilir amplifikasyon ürünleri elde ettiklerini, bunu etkileyen faktörlerin ise DNA, Mg ve polimerizasyon yoğunluğuna ek olarak yapışma (annealing) ve polimerizasyon süresi döngüleri olduğu belirtilmişlerdir.

Hallden vd (1994), *Hevea* sp. klonları arasında morfolojik varyasyonlar çok farklı olmadığı için morfolojik özelliklere dayalı fenotip belirlenmesindeki zorluğun RAPD markörleri ile giderildiğini belirtmişlerdir.

Lavi vd (1994), RAPD markörleri zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen, dominant markör olmaları nedeni ile yorumlanmasının zorluğu, kompleks olması ve tekrarlanamaması, hatta bazı durumlarda tekrarlanan büyük bantların kullanıldığı durumlarda bile varyasyonun genetik ya da değişik mikroorganizma kökenli kontaminasyon veya amplifikasyon sırasında meydana gelen bir sorundan mı kaynaklandığının tespit edilememesi bu markörlerin olumsuz yönleri olduğunu bildirmişlerdir.

McDonald vd (1994), mısır, pamuk, soya fasulyesi, buğday ve kırmızı üçgülün tanelerinden ekstre ettikleri DNA'lardan RAPD yöntemiyle DNA ürünlerini elde ettiklerini ve bu yöntemin yetişmekte olan bitkinin dokusuna gereksinim duyulmadan yapılan, ucuz, basit ve hızlı bir yöntem olduğunu ve diğer türlere de uygulanabileceğini kanıtlamışlardır.

Karp ve Edwards (1995), RAPD markörleri; genetik bağlantı haritalarının oluşturulması, gen işaretleme, çeşit tanımlaması, yerel çeşitler arası genetik çeşitlilik ve filogenetik araştırmalarda kullanıldığı gibi, RFLP tekniğiyle karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde polimorfizm belirlenmesinden dolayı özellikle tür içi genetik çeşitlilik çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mouzeyar vd (1995), RFLP ve RAPD markörleri yardımı ile ayçiçeğinde mildiyö hastalığına dayanıklılığı temsil eden P/1 lokusuna bağlı markörleri bulk segregant analizi (BSA) ile belirlemişlerdir. Mildiyö hastalığına dayanıklı ve hassas hatlar arasından yapılan melezlemeden elde edilen F₂ döllerinden 135 bitkide 2 RFLP ve 1 RAPD markörünün P/1 lokusu ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Vos vd (1995)' nin bildirdiğine göre daha sonra RAPD-PCR metodun prensiplerinden yararlanılarak AFLP, SSR gibi bir çok moleküler metotlar ortaya konmuştur. AFLP ve SSR tekniklerinin üretilebilirlikleri ve polimorfizm düzeyi RAPD-PCR metoduna göre daha yüksektir. RAPD-PCR metodunun, genetik varyasyonun araştırılmasında, bitkilerin genetik haritaların çıkarılmasında ve markör yardımıyla seleksiyonda yoğun olarak kullanılmasının nedeni, metodun diğer moleküler metotlara göre daha ucuz, daha az DNA gerektirmesi ve otomasyona uygun olduğunu bildirmişler.

Weising vd (1995), yapmış oldukları çalışmada RAPD-PCR yönteminde DNA'nın temiz olması önemli olup, az miktardaki parçalanması PCR ürün profilinin değişmesine sebep olmaktadır. DNA'da meydana gelecek yüksek miktarda parçalanma ise amplifikasyonun yapılamamasına yani PCR ürününün oluşmamasına neden olmaktadır.

Demede vd (1996), RAPD markörlerini kullanarak 28 patetes genotipinin genetik farklılığını araştırmışlardır. 12 primer aracılığı ile 158 DNA fragmenti amplifiye olmuştur. Bu fragmentler 490-3200 bp büyüklüğündedir. Bu çalışmada 158 amplifikasyon ürününden 30 tanesinin polimorfik olduğu tesbit edilmiştir.

Maughan vd (1996), moleküler markörleri kullanarak soyada tohum ağırlığını kontrol eden kantitatif özellik lokuslarının (QTL) tanımlanması, tohum ağırlığının genetik temelini karakterize edilmesinin, soyanın börülce ve yeşil börülce ile tohum ağırlığını kontrol eden genleri paylaşp paylaşmadığını belirlemek amacı ile RAPD, RFLP ve SSR gibi markör tekniklerini kullanarak 91 polimorfik genetik markör ile analiz yaparak, soyanın börülce ile tohum ağırlığı genini paylaştığı belirtmişlerdir.

Stockinger vd (1996), markörler yardımıyla seleksiyonda genelde fazla sayıda bireyle çalışıldığı için PCR'a dayalı markörler tercih edildiğini belirtmektedirler. Yaptıkları çalışmada, Emperor Francis kiraz çeşidinin mikrosporlarından elde edilmiş olan kallus kültürlerinden kısmi bağlantı haritaları oluşturulmuştur. Kallus kültürleri ile 2 alloenzim ve toplam 79 adet RAPD primeri kullanılarak 90 RAPD markör elde etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda 10 bağlantı (linkage) grubu üzerinde 89 markör haritalanmıştır.

Doldi vd (1997), Orta Avrupa'da yetişen 18 soya genotipinde protein içeriği yüksek genotiplerin seçimi için genetik farklılığı RAPD ve mikrosatellit (SSR) teknikleri kullanarak araştırmışlar. Burada elde edilen sonuçta RAPD ve SSR'ın ikisi birlikte kullanılınca çok güvenilir sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir.

Dweikat vd (1997), DNA tabanlı markörlerle seçimin artık uygulanabilir olduğunu, RAPD markörlerinin buğday ıslahında tek ya da çok genli sap arılarına dayanıklılık genlerinin seçiminde çok önemli bir strateji olduğunu bildirmişlerdir.

Menkir vd (1997), kültürü yapılan 190 *Sorghum bicolor* çeşidinde taksonomik ilişkiyi ve genetik farklılığı belirlemek için RAPD markörleri kullanmışlardır. Kültürü yapılan genotipler arasında yüksek oranda varyasyon belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 82 primerden 53 tanesi 220 RAPD bandı oluşturmuştur. Polimorfizm oranı %74 olarak bulunmuştur.

Parani vd (1997), *S. alatum*' da ki Phyllody hastalığına dayanıklılığını *S. indicum*'a aktarmak için yaptıkları melezleme sonucu elde ettikleri hibritleri test etmek amacı ile protein, izozim ve RAPD markörlerini kullanmışlardır.

Eser (1998), *Aegilops speltoides* ve *Aegilops mutica*'dan küllemeye dayanıklılık için aktarılan genlerin mayotik davranışlarını sitolojik ve moloküler belirleyicilerle (RAPD ve izozimler) izlemiştir. Bunun için yaptığı çalışmada, RAPD analizi sonuçlarına göre *A. speltoides*'e özgü 8 ve *A. mutica*'ya özgü ise 6 bandın belirlendiğini ve bunların küllemeye dayanıklılık için potansiyel belirleyiciler olabileceğini ileri sürmüştür.

Shoyama vd (1998), *Papaver* cinsine ait; *Papaver somniferum*, *P. setigerum*, *P. bracteatum* ve *P. pseudo-orientale* türleri ile *P. bracteatum* ve *P. pseudo-orientale* türlerinin hibritlerini parmak izi karakteri olarak RAPD analizi ile incelemişlerdir. F1 hibritlerin genetik olarak ana-baba bitki karakterinin ortasında olduğu tesbit edilmiştir. 18 primer kullanarak 14 DNA örneğinden 120 bant elde edilerek RAPD parmak izi gösterilmiştir. Değişik primerler kullanılarak ebeveynler ve hibritler arasındaki genetik mesafe hesaplanmıştır. Nei ve Li yöntemleriyle her tür arasındaki mesafe matrisi hesaplanarak gösterilmiştir. Her iki ana-baba arasında genetik mesafe 0.427 ancak F1 hibrit ve ana-baba arasındaki mesafe 0.338 ve 0.215 olarak belirlenmiştir. Bundan dolayı F1'lerin ana-baba arasında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen dendrogram *Papaver setigerum* ve *P. somniferum*'u diğer tür ve hibritlerden ayırmaktadır.

Cao vd (1999), RAPD tekniğinin yanlış sınıflandırılmış örneklerinin yeniden sınıflandırılmasında kullanılabilirliğini araştırdıkları çalışmada; RAPD analizi sonuçları doğrultusunda elde edilen benzerlik katsayısını kullanarak yapılan dendogramlara göre 5 *T. diccicum* benzeri, 1 *T. timophevi* benzeri ve 6 *T. monoccocum* benzeri örneklerin ayırt edildiğini açıklamışlardır. Bu sonuçların sitolojik çalışmalarla da doğrulandığını, araştırma sonuçlarına göre RAPD analizinin genetik materyalin sınıflandırılması ve bazı türlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini bildirmektedirler.

Şençiçek (2000), susamda fenotipik olarak farklı olan 52 populasyon arasındaki morfolojik ve genetik farklılığı tespit için 13 farklı morfolojik karakter kullanarak 38 populasyona kadar indirmiş olup, bunları da RAPD markörleri kullanarak değerlendirmiştir. Morfolojik markörler ile oluşturulan dendogram RAPD markörleri ile oluşturulan dendogramla karşılaştırılınca RAPD markörlerinin daha güvenilir sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Dilbirliği (2003), moleküler teknikleri kullanarak buğday kromozomları üzerinde hastalık genlerini fiziksel ve genetik olarak haritalamıştır. Buğday bitkisinde mevcut bilinen 269 hastalık geni bulunmuştur. RAPD, AFLP, STS, SSR ve RFLP markörleri kullanarak genetik olarak haritalamıştır. 110 hastalık geni DNA parmakizi ve biyoinformatik metotlar yardımıyla klonlamış ve haritadaki yerlerini fiziksel olarak belirlemiştir.

Budak vd (2004), tohum ve vejetatif *Buchloe dactyloides* (manda çimi) biyotipleri ile yaptıkları çalışmada; 30 farklı primer kullanarak biyotipler arasındaki farklılıkları SSR, ISSR, SRAP ve RAPD yöntemi ile belirlemişlerdir. Buna göre; ortalama genetik benzerlik SSR’ da 0.52, ISSR’de 0.51, SRAP’ de 0.62 ve RAPD’ de 0.57 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu (ISSRs, SSRs, RAPDs ve SRAPs) 4 farklı markör tekniğinde kendi aralarında karşılaştırılırken RAPD ve SRAP indekslerinde yüksek korelasyon $r: 0.73$, RAPD ve SSR arasında $r: 0.24$ ve ISSR ve SSR arasında $r: 0.63$ olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu verilerin yakın akraba çeşitlerde genetik benzerliği ifade etmede güvenle kullanılabileceğini

bildirmişlerdir.

RAPD analizlerinin bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Bunlar;

RAPD tekniğinin avantajları:

- Çabuk sonuç vermesi, ucuz olması ve az iş gücü gerektirmesi,
- Az miktarda DNA'nın yeterli olması ve
- Polimorfizm oranının yüksek olmasından dolayı otomasyona uygunluk göstermesidir.

RAPD tekniğinin dezavantajları:

- Güvenilirliğin sınırlı olması,
- Farklı laboratuvarlarda farklı sonuçlar hatta bir "termocycler" cihazından diğerine farklı sonuç vermesi,
- Dominant markör vermesi ve bu yolla elde edilen markörlerin diğer haritalara transfer edilemeyişi gelmektedir.

2.4.2.2. AFLP (çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi)

Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA fragmentlarının seçici amplifikasyonu temeline dayanır. Çoklu bantlar, tesadüfî bölgelerde DNA markörleri içeren amplifikasyon reaksiyonunda oluşturulur. DNA analizleri, her örnekten 50 ile 100

bant elde edilecek şekilde sonuçlanır. AFLP analizleri ile heterozigot ve homozigot bireyler arasındaki farklılık tespit edilebilmektedir.

Russel vd (1997), kültürü yapılan 18 arpada genetik varyasyonu belirlemek için RFLP, AFLP, RAPD ve SSR gibi moleküler teknikler kullanmışlardır. Bu dört markör tipinde polimorfizmi belirlemede farklı etkilerinin olduğu tesbit edilmiştir. AFLP ve RFLP' nin sonuçları birbirlerine benzerlik göstermesine rağmen SSR düşük, RAPD ise daha düşük sonuç vermiştir.

Yee vd (1999), *Vigna angularis*' de yaptıkları çalışmada iki farklı gen havuzundaki bireylerin genetik benzerliğini tesbit için AFLP ve RAPD markör sistemlerini kullanmışlardır. 58 birey arasında 214 AFLP ve 57 RAPD bantı genetik farklılığı belirlemiştir. RAPD primerleri ile ortalama 3.2 polimorfik bant belirlenirken, AFLP primerleri ile reaksiyon başına ortalama 11.3 polimorfik bant tesbit edilmiştir. AFLP değerleri RAPD değerlerinden daha önemli ve kesin sonuçlar vermiştir.

Ergül (2000)' e göre AFLP tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte DNA önce birisi 6, diğeri 4 taban taşıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların ucuna nükleotid dizilişi bilinen sentetik DNA'lar eklenir. Bu sentetik DNA'nın nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'ların kullanımı ile kısmen spesifik olan DNA çoğaltılır. Bu çoğaltma işlemi iki aşamada gerçekleşir. I: Her iki uçdan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim. II: Asıl üretimde ön üretimden elde edilen parçaların kullanımı ile kesim enzimi tanıma yerinden sonraki 2. ve 3. nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizisini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda gerçekleşmiş olur. Üretilen parçacıklar bir baz uzunluğunun farkını dahi ayırt edebilen poliakrilamid jelde yürütülerek farklılık gösteren parçacıklar tesbit edilmiş olur.

AFLP tekniği aşamaları kısaca aşğıdaki gibi sıralanabilir (Ergöl 2000).

- DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi (EcoRI / Mse I) ve biyotinle işaretlenmiş 2 adaptör kullanılarak restriksiyon fragmentlerinin uygun bir DNA ligaz ile birleşmesi,
- Birleştirilen bu adaptörlere uygun primer ile restriksiyon fragmentlerinin preamplifikasyonu,
- Bu fragmentlerin özel oluşturulan ve radyoaktif işaretlenmiş primerlerle gerçek amplifikasyonu ve poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) de koşturulması.

Hodkinson vd (2000)' e göre AFLP parmak izleri genomik DNA yı parçalayarak kesilmiş bölgeleri amplifiye edecek şekilde yapılmaktadır. Elde edilen parmak izleri tekrarlanabilir ve genomda değişik lokuslarda yaygın informatik markörler sağlanmakta olduğu belirtilmiştir.

Carolan (2002), *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonuna ait türlerden *Papaver bracteatum*' a ait *in vitro* kültür hatlarında gelişen ve olgunlaşmış bitkilerden gelişen kallus kültürlerinde AFLP ile genetik varyasyonu bulmaya çalışmıştır. Rejenere bitkiler morfolojik ve fitokimyasal olarak ana bitkilerden değişiklik göstermişlerdir. *Papaver bracteatum*' da bulunan dominant alkaloidlerden tebain, olgunlaşmış hatlardan gelişen bitkilerin kapsüllerinde bulunamamıştır. Bundan dolayı genetik uniform yapı bozulmuştur. Onun yerine *Papaver pseudo-orientale*' de bulunan izotebain bulunmuştur. AFLP tekniği ile *oxytona* seksiyonu soyağacı ilişkisinde 3 tür olarak ayırdedilmektedir. Fakat *in vitro* çalışılan bitkiler *Papaver pseudo-orientale*' ye benzemektedir. Fitokimyasal ve kromozom sayısı çalışmaları tohumların hibrit olduğunu göstermekte olup, *in vitro* çalışmaların somaklonal varyasyon olmayıp genetik üniform kaybı tohumdan kaynaklanmaktadır. AFLP parmakizi analizi metod olarak *oxytona*' ya ait türleri ayırmak ve alloploidiyi

bulmak için kolaylık sağladığını bildirmiştir. AFLP tahıllarda ve diğer bitkilerde klonal varyasyonu bulmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Mackill vd 1996; Paul vd 1997; Waugh vd 1997; Hodgkinson vd 2002). *Phyllostachys* gibi birçok yüksek bitkide kullanılmış (Hodgkinson vd 2000) olup, *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver* türlerinde ilk kez kullandıklarını belirtmektedir. AFLP de kullanılan iki primer kombinasyonu ile 254 polimorfik markör elde edilmiş olup, 146 sı polimorfizm göstermiştir. AFLP analizinden NJ den elde edilmiş olup genetik benzerlik gösteren hatlar belirtilmiştir. *Oxytona* seksiyonuna ait 3 türde 3 grup görülmüştür (*Papaver bracteatum*, *Papaver orientale* ve *Papaver pseudo-orientale*). *In vitro* gelişen bitkiler *Papaver pseudo-orientale* hatları ile benzerlik göstermiştir. Primerlerin her setinden (grubundan) oluşan dendogram her iki primerden oluşan dendogram ile benzerlik göstermiştir.

AFLP tekniğinin avantajları:

- RAPD'den yavaş RFLP'den hızlıdır.
- Masraf, iş gücü ve güvenilirlik açısından RAPD ve RFLP arasındadır.
- Çok sayıda aynı anda etkili bir şekilde tarama yapması nedeni ile parmak izi analizine çok uygundur.
- Sayıları RAPD ve RFLP'den daha fazladır.
- Genomik DNA'nın bilinmesine gerek yoktur.
- Polimorfizm oranı çok yüksektir.
- Bu özelliklerinden dolayı otomasyona uygundur.

AFLP tekniğinin dezavantajları:

- Çoğunlukla dominant markör verirler. Ancak son zamanlarda kodominant markörde verdiği bildirilmiştir.
- Farklı genetik haritalar arasında transferleri güçtür.

2.4.2.3. STS (dizini etiketlenmiş alanlar)

STS tekniği RFLP güvenilirliğini ve PCR kolaylığını biraraya getiren bir tekniktir. Nükleotid dizilişi bilinen az kopyalı RFLP problemlerinden yeterli uzunlukta (16-24 nükleotid) başlatıcı DNA'lar geliştirilmektedir. Başlatıcı DNA'lar ile genomik DNA üzerinde çok spesifik şartlarda DNA üretimi yapılması ile RFLP probunun temsil ettiği lokus çoğaltılmaktadır.

Farklı genotiplerden üretilen DNA'ların 4 nükleotid taşıyan bir seri kesim enzimi ile kesilmesi sonucu üretilen parçaların içindeki tek nükleotid değişikliği bile tanımlanabilmektedir.

STS tekniğinin avantajları:

- Çoğunlukla kodominant özellikte markör üretmektedirler.
- Kullanımı RFLP'ye göre çok daha kolay, ucuz ve hızlıdır.
- RAPD gibi az miktarda DNA yeterlidir.
- Başlatıcı DNA'ların iyi seçilmesi şartı ile farklı haritalar arasında transferi mümkündür.

- Teknik otomasyona uygundur.

STS tekniğinin dezavantajları:

- İlgili RFLP probunun nükleik asit dizilişinin bilinmesini ve buna göre bir çift başlatıcı DNA geliştirilmesini gerektirmesidir.
- Polimorfizm oranı orta düzeydedir.

2.4.2.4. SSR ve mikrosatellitler (basit dizin tekrarları veya STMS)

Ökaryotik genomlarda bulunan ardışık tekrarlanan 2-6 nükleotitli gruplara mikrosatellit denir. $(AT)_n$, $(GT)_n$, $(ATT)_n$ ve $(GACA)_n$ gibi. Burada n ardışık tekrar sayısıdır.

SSR primerlerinin üretiminde genel olarak 3 farklı yaklaşım tercih edilmektedir. Bunlar; I. Genomik DNA kütüphanelerinin SSR oligonükleotidlerinin hibridizasyonu yolu ile gözlemlenmesi, II. DNA veri bankalarında SSR'ların araştırılması, III. Akraba bitki türlerinde geliştirilmiş olan SSR'da spesifik primerlerin kullanımıdır.

Tekrarlanan bir dizi klonlanır ve bu tekrarlanan diziyi çevreleyen nükleotidler belirlenir. Buna primerler yapılır. 11-60 bazlık tekrarlara VNTR'lar da denir. Basit dizi tekrarları kodominant markörler olup her bir lokusta çok sayıda allel bulunur. Dizi analizi gerektirir, ancak bir çok türün gen bankalarında türlerin belirlenen dizi tesbitleri gün geçtikçe artmaktadır.

SSR ilk olarak insanlarda tanımlanmış (Litt ve Luty 1989, Weber ve May 1989) aynı bulgular hızlı bir şekilde memelilerden farelerde yapılan çalışmalar ile bunu izlemiş (Love vd 1990) daha sonra domuzlarda (Johansson vd 1992) ve sığırlarda

(Kemp vd 1993) yapılan çalışmalarla devam etmiştir. Bu potansiyel ile bitkilerde birçok tür için oldukça önemli olan bu markörlerin başarılı olarak izole edilmesi ve uygulanması başlamıştır.

Bitkiler âleminde ilk çalışmalar tarla bitkileri ile olmuş; soya (Akkaya vd 1992, Morgante ve Olivieri 1993), pirinç (Wu ve Tanksley 1993, Zhao ve Kochert 1993), arpa (Saghai Maroof vd 1994) ve buğday (Roder vd 1995) gibi bitkiler ile oldukça yakın zamanda SSR'ların karakterizasyonu bahçe bitkileri türlerinde üzüm (Thomas ve Scott 1993) ile meşe (Dow vd 1995), okalüptüs (Byrne vd 1996), *Swietenia humilis* (White ve Powell 1997) gibi orman ağaçlarında başlamıştır.

SSR markörleri 1-4 arasında tekrarlanan nükleotid motifleri içerir (Braaten vd 1988, Vergnoud 1989). Bu bölgeler "mikrosatellit" olarak adlandırılır (Litty ve Luty 1989) ve PCR (Saiki vd 1988) da bireysel olarak amplifiye olurlar. (GT)_n veya (CT)_n gibi birbiri arkasına tekrar eden 2 den 10 a kadar tekrarlı olabilen dizinlerdir.

Lui vd (1995), *Paspalum vaginatum*'un 46 ekotipi arasındaki polimorfizmi belirlemek amacı ile SSR analizini kullanmışlardır. Mikrosatellit lokusunda meydana gelen farklı bir allel tekrarlanan nükleotid sayısındaki ve tekrarlanan bölgenin uzunluğundaki değişim farklı allellerin oluşumuna neden olduğunu bildirmektedirler.

Yamamoto vd (2001)' e göre her SSR lokusu özellikle tek bir lokusu temsil edecek şekilde düzenlendiği için analitik olarak basittir. Genom boyunca homojen olarak dağılmıştır. Bu markörler PCR' a dayalı markörler olması nedeniyle az miktarda DNA' ya ihtiyaç duyulmaktadır. Her SSR lokusu bir çift primer ile tanımlanır bu nedenle laboratuvarlar arası primer değişimi kolaydır (Gianfranceschi vd 1998). Bu primerler tür içi ve türler arası kullanılabilir. Örneğin, *Brassica* (Szewc-McFadden vd 1996), *Actinidia* (Weising vd 1996) ve *Prunus* türlerinde (Cipriani vd 1999, Downey ve Lezzoni 2000, Cantini vd 2001)

türlerarası amplifikasyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Fakat cinslerarası ve familyalar arası kullanımı ile ilgili çok az referans vardır. Bu tip markörler türlerin bireysel olarak genotiplerini ortaya koyarlar (Powell vd 1996). Bu nedenle çeşit tanımlamasında önemli bir yere sahip olduklarını belirtmektedirler.

SSR tekniğinin avantajları:

- Oldukça polimorfiktirler. Bundan dolayı bitkilerde yüksek oranda bilgi vermektedirler.
- Bitki genomunda oldukça bol olup uniform bir dağılım gösterirler. Örneğin; Buğday genomu her 704 kb'da bir (GT)_n grubu ve her 440 kb'da bir (GA)_n grubu içerir.

SSR tekniğinin dezavantajları:

Yeni markör geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problarla hibridizasyon yolu ile bulunması, nükleotid dizilerinin belirlenmesi ve yanyana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerinden özel başlatıcı DNA'lar geliştirilmesi gerekmektedir. Buda oldukça fazla iş gücü gerektiren pahalı bir işlemdir

2.4.2.5. SCAR (dizin karakterli çoğaltılmış bölgeler)

Bir polimorfik RFLP veya RAPD klonlanır ve dizi analizi yapılır. Bu spesifik fragmente göre 2-24 nükleotidlik PCR primeri sentezlenir. PCR'de çoğaltılmış spesifik primerleri bir kesim enzimleri ile kesilir. Sonuçta DNA'daki büyüklük değişimi tesbit edilir.

SCAR tekniğinin avantajları:

- Kodominant markörler olup sayıları fazladır.
- Her bir lokusta çok sayıda allel vardır.
- SCAR'ların üretilebilirliği RAPD'den daha iyidir.
- Bu markörler RFLP'den daha kolay ve hızlı bir şekilde tespit edilebilir.

SCAR tekniğinin dezavantajları:

- RAPD bantları tekrarlanan DNA dizileri ile hibridize olma ihtimalinden dolayı spesifik bir klonu çıkarmak mümkün olmayabilir.
- Uzun zaman alır ve işçiliği fazladır.

2.4.2.6. SSCP (tek parçalı kontrol edilen polimorfizm)

SSCP tek zincirli DNA'nın molekül içi etkilişimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılmasıyla değişik konformasyonların oluşmasına ve poliakrilamid jelde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir. Mutasyon içeren DNA molekülü tek baz bile farklı olsa normal dizide değişik bir yapı oluşturacağından farklı yerlerde bandlaşma gözlenmektedir. Normal ve incelenen örnek arasında fark olması mutasyonun varlığını göstermektedir.

Nokta mutasyonlarının DNA dizi analizi ile kesin olarak teşhis edilebilmesine rağmen taranacak DNA fragmenti büyüdükçe teşhis süresi ve analiz maliyeti artmaktadır. Bunu önlemek amacıyla mutasyon içeren gen, kısa DNA parçacıkları (200 bp) halinde amplifiye edilip SSCP yöntemiyle taranarak mutasyonun bulunduğu fragment belirlenir.

Böylece, büyük bir genin tümünü analiz etmek yerine sadece mutasyon içeren parçanın incelenme sürecini kısalttığı gibi maliyeti de azaltmaktadır. Burada asıl amaç mutasyonun bulunduğu bölgeyi belirlemektir.

Seifert vd (1997), tür düzeyinden daha alt seviyede SSCP yönteminin kullanılabileceğini bildirmiştir.

Banke vd (1997), *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin tür altı düzeyde teşhisinde SSCP ya da heterodubleks analiz metodlarını kullanmıştır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yerinin iklim ve toprak özellikleri

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında yürütülmüştür. Deneme tarlasının toprak analizleri Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde yapılmıştır.

Denemenin kurulduğu 2000-01, 2001-02 ve 2002-03 bitki yetiştirme dönemi boyunca kaydedilen deneme yerine ait iklim faktörleri; aylık toplam yağış (mm), aylık ortalama sıcaklık (°C) ve aylık ortalama nispi nem (%) değerleri ile uzun yıllar ortalama değerleri Meteoroloji Genel Müdürlüğünden temin edilmiştir.

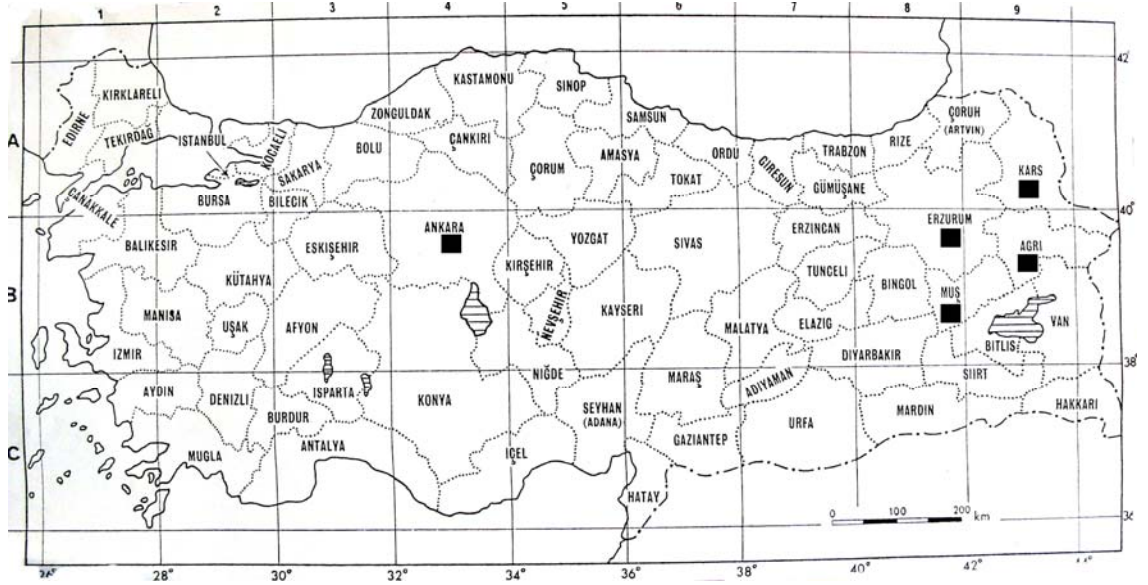
3.1.2. Bitki materyali

Çalışma materyali iki ana gruptan oluşmaktadır. Birincisi; çoğunlukla Doğu Anadolu Bölgesinde A8, A9, B5, B6, B7, B8, B9, B10 ve C5 karelerinde bulunan *Oxytona* seksiyonuna ait türler farklı lokalitelerden toplanarak Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasına ekimi yapılan örneklerden oluşmuştur. Materyallerden 24'ü adı geçen karelerden toplanan 192 farklı lokalite içersinden tek bitkiler seçilerek sağlanmıştır. İkincisi ise; Ankara Üniversitesi öğretim elemanlarının 1972-73 yıllarında Petter Goldblatt ile birlikte Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplayarak Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasına ekimi yapılan ve halen yetiştirilen 264 bitkiden 29 tek bitki seçilerek alınmıştır. Toplanan materyallerin lokaliteleri Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkiler ve toplama lokaliteleri

Sıra No	Kütük (Protokol) No	Toplanan Bölge
1	PB1	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası Rakım 858 m
2	PB2	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
3	PB3	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
4	PB4	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
5	PB5	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
6	PB7	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
7	PB9	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
8	PB10	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
9	PB99	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
10	PB100	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
11	PB101	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
12	PB246	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
13	PB248	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
14	PP60	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
15	PP70	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
16	PP121	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
17	PP122	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
18	PP141	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
19	PP147	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
20	PP249	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
21	PP251	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
22	PO73	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
23	PO74	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
24	PO169	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
25	PO170	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
26	PO180	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
27	PO181	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
28	PO240	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
29	PO244	A.Ü.Z.F. Deneme Tarlası
30	1	Kars, Akyaka, Kayaköprü-Demirkent Köyü, Karsçayı Rakım 1568 m
31	3	Kars, Arpaçay, Taşdere köyü, Çirişli 1 Rakım 1951 m
32	12	Kars, Sarıkamış, Yağbasan 1 Rakım 2044 m
33	19	Kars, Sarıkamış-Horasan, Soğanlı 10 Rakım 2220 m
34	22	Kars, Merkez, Melik Köy A3 Rakım 1739 m
35	47	Ağrı, Tutak, Hamur 7 Rakım 1887 m
36	59	Kars, Sarıkamış, Yağbasan 3 Rakım 2044 m
37	83	Erzurum, Tortum-Narman, Kireçli 6 Rakım 2229 m
38	84	Erzurum, Tortum-Narman, Kireçli 7
39	121	Erzurum, Merkez, Palandöken B3 Rakım 2177 m
40	124	Erzurum, Merkez, Palandöken C2
41	136	Erzurum, Pasinler, Hamam Deresi 1 Rakım 1849 m
42	139	Erzurum, Pasinler, Hamam Deresi 4
43	144	Erzurum, Pasinler, Hamam Deresi 9
44	147	Erzurum, Pasinler, Hamam Deresi 12
45	148	Erzurum, Pasinler, Hamam Deresi 13
46	149	Erzurum, Horasan-Eleşkirt, Sarıcan 1 Rakım 2216 m
47	155	Erzurum, Horasan-Eleşkirt, Sarıcan 7
48	157	Erzurum, Horasan-Eleşkirt, Sarıcan 8
49	159	Ağrı, Tutak-Hamur, Hamur 1 Rakım 1817 m
50	163	Ağrı, Tutak-Hamur, Hamur 4
51	169	Muş, Bulanık, Hayat Yaylası 2 Rakım 1746 m
52	178	Muş, Bulanık, Hayat Yaylası 4
53	185	Muş, Bulanık, Hayat Yaylası 11

PB: *Papaver bracteatum*, PP: *Papaver pseudo-orientale* ve PO: *Papaver orientale*



Şekil 3. 1. Çalışmada kullanılan bitkiler ve toplama lokalitelerinin harita üzerinde görünüşü

3.2. Yöntem

3.2.1. Morfolojik ve kimyasal karakterler

Çalışmada kullanılan bitki materyallerinin morfolojik karakterlerinin belirlenmesinde Türkiye florası (Davis 1965-1988) ve bu konuda yazılmış olan kaynaklar (Goldblatt 1974, Bernath 1998) dikkate alınmıştır. Tespit edilen en belirgin karakterler genel olarak şunlardır; bitki boyu, yaprak boyu, çiçek sapının kaçınca yapraktan geliştiği, tomurcuk görünümü, brakte varlığı, sepal sayısı, çiçeklenme zamanı, petal sayısı, petal rengi, petal eni, petal boyu, petalde leke varlığı, lekenin eni, lekenin boyu, kapsül boyu, kapsül eni, kapsüldeki iğn sayısı, tepcecik şekli, tepcecik üzerinde alkaloit sızması ve tebain alkaloitinin olup olmadığı gibi özelliklerdir.

Bu özellikler bazı bitki örneklerinde tespit edilebilirken bir kısmında iklim şartlarından dolayı 2000-2001 döneminde bitki çıkışı olmadığı için tespit edilememiştir. Bitkilerde tarla çıkışı eksik olması ve bu konuda Sangwan vd (2000)' nin yapmış oldukları çalışma doğrultusunda direk tohumların kullanılması

düşünülerek DNA izolasyonu yapılmıştır. Bitkinin yabancı tozlaşma potansiyelinin yüksekliğinden dolayı bu yöntemden vazgeçilmiştir. Daha sonra 2001-2002 döneminde ise bu ve benzeri iklime bağlı faktörler dikkate alınarak alternatif üretim şekli olan kasalarda yetiştirme ile bu dezavantajlar giderilmiştir.

Bitkiler yaklaşık olarak % 30-40 civarında yabancı tozlaşma gösterdiklerinden dolayı tamamı tek bitki tohumlarından yetiştirilerek elde edilmiştir. Dolayısıyla tarla şartlarına bağlı olan çalışmamızda 2001-2002 de bütün olumsuz şartlar ortadan kaldırılmış olup, çalışma materyalleri yeniden gözden geçirilmiştir. Buna göre; *Papaver bracteatum* türünden 13, *P. pseudo-orientale* türünden 8, *P. orientale* türünden 8 ve Doğu Anadolu Bölgesinden toplanan tür teşhisi yapılmamış olan bitkilerden de farklı bölgelerden (lokalite) 24 farklı breylerden oluşan popülasyonda (Çizelge 3.1) morfolojik ve moleküler çalışmalar yapılmıştır. Morfolojik incelemede aşağıda belirtilen karakterlerin ölçüm ve gözlemleri 2002-2003 döneminde yapılmıştır (kullanılan latince terimlerin açıklamaları Ek 6 da verilmiştir).

Bitki boyu (cm): Bitki boyu toprak seviyesinden kapsül tepesine kadar olan kısım olarak belirlenmiş olup metre ile ölçülmüştür. Bitki çok yıllık olmasından dolayı ikinci yıldan itibaren bir bitkide birden fazla gövde bulunabilmektedir. Hepsinin ölçülmesi sonucu bitki boyu belirlenmiştir.

Yaprak boyu (cm): Yaprak ölçümü tabanda bulunan ve ilk çıkış gösteren rozet yaprakların gelişmesinden oluşan ana yapraklarda yapılmıştır.

Çiçek sapının kaçınıcı yapraktan geliştiği (adet): Çiçek sapı üzerinde bulunan yapraklar sayılarak her yaprağın bulunduğu yer (boğum) tespit edilerek belirlenmiştir. Son yaprak bitki sapının çıktığı yer olarak kaydedilmiştir. Ancak kapsülün dibinde bitişik olarak bulunan kaolin yapraklar sayılmamıştır. Bunun nedeni ise kaolin yapraklar seksiyonda ki bütün türlerde bulunmadığı için dikkate alınmamıştır.

Tomurcuk görünüşü: Tomurcuklar çiçek açmadan birkaç gün önceki görünüşleri ile kaydedilmiştir.

Brakte sayısı (adet): Tomurcuğun dibinde kaolin yapraklardan küçük, kaliksle kaolin (gövde) yapraklar arasında bulunan pulsu yaprakların sayılması ile belirlenmiştir.

Kaliks (sepal) sayısı (adet): Tomurcukta petallerin üzerinde koruyucu olarak bulunan yeşil renkli çanak yaprakların sayılması ile tespit edilmiştir.

Çiçeklenme zamanı: Çiçeklenme zamanı, tomurcukların açılmasından hemen sonra petallerin buruşuklukları düzleşirken tespit edilip kaydedilmiştir.

Petal sayısı (adet): Petal sayısı, incelediğimiz bitkilerin çiçeklerindeki korolla (petaller) parçaları sayılarak tespit edilmiştir.

Petal rengi: Petal rengi, incelediğimiz bitkilerin çiçeklerinde renk tonu farklılıkları normal gözle tespit edilerek kaydedilmiştir.

Petal eni (cm): Petallerin eni bir cetvel yardımıyla ölçülerek belirlenmiştir.

Petal boyu (cm): Petallerin boyu bir cetvel yardımıyla ölçülerek belirlenmiştir.

Petal leke şekli: Petal leke şekli, bitkilerde lekenin petal üzerindeki konumu (yok veya var, var olanlar; ortada veya tabana kadar) görsel olarak belirlenmiş ve kaydedilmiştir.

Petal leke eni (cm): Petal üzerinde leke varsa bu lekelerin eni bir cetvel yardımı ile ölçülerek kaydedilmiştir.

Petal leke boyu (cm): Petal üzerinde leke varsa bu lekelerin boyu bir cetvel yardımı ile ölçülerek kaydedilmiştir.

Kapsülde lateks (süt) sızması: Kapsülde alkaloit sızmasının varlığı petaller döküldükten sonra belirginleşmeye başlamaktadır. Kapsül üzerindeki stigmatik ışınların arasında ve üzerinde nokta şeklinde lekeler lateks sızması olarak kabul edilerek kaydedilmiştir.

Kapsül eni (mm): Kuru olan Kapsülün en geniş kısmı kumpasla ölçülerek bitkide var olan bütün kapsüller sayılmış ve her bitki için ortalama değer tespit edilerek kaydedilmiştir.

Kapsül boyu (mm): Sapın sona erdiği boğum ile stigmanın en üst noktası arası kumpasla ölçülmüştür. Bitkide var olan bütün kuru kapsüller ölçülmüş ve her bitki için ortalama değer tespit edilerek kaydedilmiştir.

Kapsül ışın sayısı (adet): *Papaver* cinsine ait bitkilerde stigmatik ışınların her biri kapsül içindeki plesantaya karşılık gelir. Kapsülde plesanta sayısını belirlemek için tepecikde bulunan ışın sayısı tespit edilmiştir. Her bir bitkide var olan kuru kapsüllerdeki ışınlar sayılarak ortalamaları alınmış ve kaydedilmiştir.

Kapsül tepecik şekli: Tepecik şekli her bitkide normal çıplak gözle yapılmış olup, gerekli notlar alınarak kaydedilmiştir. Buna göre kuru kapsül tepesi; düz, dış bükey, iç bükey, ortası hafif sivri, ortası sivri uçları yukarı ve uçları yukarı içi düz şeklinde gruplandırılmıştır.

Tebain alkaloitin varlığı (%): Kimyasal bir özellik olan alkaloit içeriği; kuru kapsüllerin tamamının öğütülmesi ile elde edilen toz materyalden TMO (Toprak Mahsulleri Ofisi) Bolvadin Alkaloit fabrikasında HPLC yöntemi ile tespit edilmiştir.

HPLC yöntemi ile *oxytona* seksiyonuna ait bitkilerde tebain miktar tayini

1. 0.5 mm büyüklüğünde öğütülmüş numuneden 200 mg hassas olarak tartılmıştır.
2. %5 lik asetik asitle ısıtılarak bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. Pamuklu kolundan geçirilerek %5 lik asetik asitle 50 ml ye tamamlanmıştır.
Tamamlanan numune renkli şeşelere doldurulmuştur.
4. 50 ml ye tamamlanan ekstraktan 10 ml alınıp ve amonyak ile pH 9'a getirilmiştir.
5. pH 9' a ayarlanan ekstraktan 10 ml kloroforma çekilmiştir (1:1).
6. Kloroform fazı TLC ye spotlanmıştır.
7. Numuneden 20 µl, 1:1 lik standartdan 1 µl spotlanmıştır.
8. Önce morfin banyosuna konmuş (metilen klorid 84, metanol: 14 %10 luk Amonyak 2) kurutulduktan sonra yabancı alkaloit banyosuna konmuştur (Benzen 80: Etanol 20: Amonyak 0.3).
9. 15 cm yüksekliğe gelince yabancı alkaloit banyosundan çıkarılır ve %60 lık konsatre sülfürik asit püskürtülmüştür. Eğer TLC üzerinde sarı spot lekeleri oluşmuş ise tebain var demektir.
10. Daha sonra TLC 15 dakikalığına 105 °C deki etüve konmuştur. Etüvden çıkarıldıktan sonra;
 - Morfin mor menekşe renk
 - Narkotin kahverengi mor menekşe renk
 - Codein kırmızımsı mavi renk
 - Tebain açık mor menekşe renk
 - Papaverin gri renk
 - Narkotin (Noskapin) mat kırmızı renk vermektedir.
11. Tebain olduğu tespit edilen numuneler (artan 40 ml numunelerden) HPLC de analiz yapılmıştır.

HPLC 1050

8.2 g NaAc 2 lt saf suda çözüldükten sonra adi süzgeç kağıdından süzülmemektedir. Glasial asetik asit ile pH 3.6' ya ayarlanmıştır. 1760 ml alınır ve bunun üzerine ; 180 ml Asetonitril, 60 ml Etanol ve 60 ml THF konarak miktar tayini yapılmıştır.

Kolon: 300 mm x 3.9 mm Bundapak C18

Akış : 1.5 ml/dk

Standart: 0.1 mg/ml

3.2.2. İstatistik değerlendirmeleri

Çalışmada kullanılan 53 bitki örneğinde 20 farklı morfolojik ve kimyasal özellik incelenmiştir. İncelenen özelliklerin farklılık veya yakınlığını ortaya koymak amacıyla hiyerarşik kümeleme analizi programı (SPSS 11.0 for windows) kullanılarak istatistik analizler yapılmıştır.

3.2.3. RAPD markörleri

3.2.3.1. Materyalin elde edilmesi

Doğal floradan toplanan bitki örnekleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasına ekilmiştir. Morfolojik gözlemler için gelişmeleri takip edilmiş olup, gelişen bitkilerden 15 Nisan tarihinde uygun şartlarda (Şekil 3.2), genç yapraklar DNA izolasyonu için küçük poşetlere alınarak buz kapları ile laboratuvara taşınmıştır. Daha sonra sıvı nitrojene (-196.6 °C) daldırılıp -80 °C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 2. DNA izolasyonunda kullanılan bitkinin rozet (taban) yapraklarından örnek yaprak alımı

3.2.3.2. DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması

Bu işlemde DNA'nın kimyasal ve fiziksel etkilere maruz bırakılması ile diğer moleküllerden ayrılması sağlanmaktadır. DNA bulunduran biyolojik materyalin kimyasal bir değişikliğe uğramasına fırsat vermeden sıvı nitrojen (sıvı azot) ile fiziksel olarak öğütme işlemi gerçekleştirilmektedir (Şekil 3.3). DNA kimyasal olarak çöktürülebilir ve bu işlem için en çok kullanılan kimyasal madde etanoldur. Ayrıca çökelmeyi artırıcı izopropanol gibi bazı kimyasallar da bu işlemde yer almaktadır. Fiziksel uygulamada ise santrifüj kullanılmıştır. Santrifüj dönme hızı, ayrılması istenen molekülün ağırlığına göre değişkenlik göstermektedir. Çalışmada kullanılan tüm çözeltilerin içeriği Ek 1' de verilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkilerden iki şekilde DNA izole edilmiştir;

Tohumdan DNA izolasyonu

DNA, tohumdan modifiye yöntemler kullanılarak izole edilmiştir.

1. Tohumlar (0.10 g) mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilerek üzerlerine 400 µl ekstraksiyon tamponu (Ek 1) eklenerek 30 dk bekletilmiştir.
2. Tohumlar ezildikten sonra 400 µl daha ekstraksiyon tamponu ve 80 µl %2'lik

SDS eklenerek iyice karıştırılmıştır.

3. 65 °C'de 30 dk bekletilmiştir.
4. Örnekler 0 °C'de 15000 rpm'de 15 dk santrifüje edilip, üstte kalan kısım (süpernatant) alınmıştır.
5. Süpernatanta 500 µl 5 M potasyum asetat eklenerek karıştırılıp 30 dk buz üstünde bekletilmiştir.
6. 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüplere alınarak üzerine 1:1 oranında kloroform izoamilalkol (24:1) solüsyonu eklenip karıştırılmıştır.
7. 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüplere transfer edilmiştir.
8. Üzerine 500 µl etanol (%96) ve 250 µl 0,3 M Sodyum asetat solusyonu ilave edildikten sonra 20-40 dk -20 °C'de bekletilmiştir.
9. Sonra örnekler 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve çökelti 400 µl buzda soğutulup, %70 etanol ile yıkandıktan sonra 15000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
10. Vakumda kurutulan örnekler 50 µl TE (Ek 1) içinde çözülmüştür.
11. Elde edilen DNA'ların saflık konsantrasyonları ölçülerek +4 °C'de veya -20 °C'de saklanmıştır.

İzole edilen DNA'da RNA bulaşıklığı olduğu durumlarda RN_{az} A eklenerek protokolde

6. maddeden sonraki kısım tekrar edilmiştir.



Şekil 3. 3. Taze yaprakların sıvı nitrojen içersinde fiziksel olarak öğütülmesi

Genç ve taze yapraklardan DNA izolasyonu

Genç ve taze yapraklardan DNA izolasyonu için Sangwan vd (2000) nin modifiye ettikleri CTAB (cetil three metil amonyum bromid) yöntemi uygulanmıştır.

1. Sıvı nitrojenle toz haline getirilen yaprakların üzerine 2 x CTAB (Ek1) tampondan (3 buffer: 1 yaprak olacak şekilde) ekleyerek sıcak su banyosunda 65 °C’de 30 dak hafifçe alt-üst ederek bekletilmiştir.
2. Daha sonra tüpler 10.000 rpm devirde 15 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni tüplere alınmıştır.
3. Süpernatant miktarınca kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenerek 4000 rpm devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüplere alınmıştır.
4. 3. maddedeki işlem 1/10 hacimli 55°C %10 CTAB solüsyonu ile tekrarlanmıştır.

5. Süpernatantın 1.5 hacmi kadar CTAB (Ek 1) yoğunlaştırıcı üzerine dökülerek yavaşca karıştırılmıştır. Oluşan DNA'lar 4000 rpm devirde 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
6. Dipte oluşan DNA' lar 100 µl %80 etanol ile yıkanarak saflaştırılmıştır (eğer DNA kirli ise yıkama işlemi birden fazla tekrarlanabilmektedir).
7. Alkol vakumla uçurularak pellet STE (Ek 1) de çözülmüştür.
8. 1 miktar DNA, 2 miktar etanol ve 1/10 hacim 3 M sodyum asetat solüsyonu ilave edilmiştir.
9. 25-50 µl pellet LTE (Ek 1) de çözülerek 100 mg/ml 1-2µl DNA'sız RN_{az} A ile 35 °C de 30 dk inkübe edilmiştir.
10. Kloroform izoamilalkol (24:1) ve 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ile ekstraksiyon yapılmıştır.
11. DNA miktarının iki katı %90' lık etanol eklenerek yoğunlaştırma ve temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir.
12. Daha sonra pellet vakumda kurutularak alkol uzaklaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış DNA 50 µl LTE de çözülerek RAPD reaksiyonlarında kullanılmak üzere istenilen konsantrasyonda seyreltilebilmeleri için DNA yoğunlukları ölçülmek üzere +4 °C ve -20 °C de saklanarak hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.3. DNA konsantrasyonu

DNA' nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmiştir. 1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml' ye karşılık gelmektedir. Bu çalışmada izole edilen DNA çift iplikli olduğundan miktar tayininde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD (Absorbans değeri)} \times \text{sulandırma oranı} \times 50$$

DNA miktarı ve temizliği Eppendorf marka spektrofotometre (BIOPHOTOMETER) de ölçülmüştür. DNA miktarı RAPD reaksiyonları için 50 ng'a seyreltilmiştir.

3.2.3.4. MgCl₂ konsantrasyonu

Hazır halde gelen ve içersinde 25 mM MgCl₂ bulunan stoktan çalışmada; 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 ve 6.0 µl şeklinde MgCl₂ kullanılmıştır.

3.2.3.5. Primer seçimi ve konsantrasyonu

Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuarlardan elde edilmektedir. Gen çoğaltılması dahil PCR' ın birçok uygulamaları için kalıp DNA' ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primer tasarımı yapmak için bilgisayar programları da geliştirilmiş olmakla beraber, çoğu zaman araştırmacılar ilgilendikleri genleri ya da DNA parçalarını çoğaltmak için kendileri primer tasarımı yapmak durumundadırlar. Tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilmektedir. Sonucu olumsuz etkileyici istenmeyen

oluşumları en aza indirmek için önem verilmesi gereken bazı noktalar vardır. Bunlar;

- Primerlerin polipürin, polipirimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi,
- Primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır.

Çalışmada 45 adet primer kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Bu primerlerin konsantrasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalarda stok solusyondan her μl 'sinde 10 pmol 10 mer'lik primerden 200 nM olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu stok solusyondan 1, 1.5 ve 2 μl kullanılarak bant oluşumları gözlenmiştir.

Ayrıca primerlerin Tm değerlerinin hesaplanması gerekmektedir. Tm değerlerinin hesaplanması için kullanılan çeşitli formüller vardır. Bu çalışmada aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$[(A+T \text{ lerin sayısı}) \times 2^{\circ}\text{C} + (G+C \text{ lerin sayısı}) \times 4^{\circ}\text{C}]$$

Çizelge 3.2. RAPD analizinde kullanılan primerler, baz dizilişleri, GC (%) oranları ve Tm ısıları (°C)

	Primer ismi	Primer Dizini (5'..3')	% GC Oranları	Tm Sıcaklıkları (°C)
1	RAPD1	CGC AGT ACT C	60.0	29.4
2	RAPD2	GTC CTA CTC G	60.0	29.7
3	RAPD3	CTA CAC AGG C	60.0	23.9
4	RAPD4	GTG CTT AGC G	60.0	27.3
5	RAPD5	GTC CTC AAC G	60.0	28.1
6	RAPD6	CTA CTA CCG C	60.0	23.4
7	RAPD7	CAG CAC CCA C	70.0	31.4
8	RAPD8	CAG GCC CTT C	70.0	33.5
9	RAPD9	CTG ATC GTA C	50.0	28.9
10	RAPD10	TCC TCA CTA G	50.0	34.9
11	MA1	CCA GCA TCA G	60.0	29.5
12	MA2	TGA TGC TGT C	50.0	27.5
13	MA3	GGA AGT CCA C	60.0	28.5
14	MA4	GTC CAC ACG G	70.0	34.5
15	MA5	CCG GCA TAG A	60.0	31.1
16	MA6	GCG GTG ACT A	60.0	31.8
17	MA7	CCA GTA CTC C	60.0	31.8
18	OPA 01	CAG GCC CTT C	70.0	33.5
19	OPA 02	TAG CGA GCT G	60.0	32.0
20	OPA 03	AGT CAG CCA C	60.0	32.0
21	OPA 04	AAT CGG GCT G	60.0	32.0
22	OPA07	GAA ACG GGT G	60.0	32.0
23	OPF 04	AGG GGT CTT G	60.0	32.0
24	OPF 05	CCG AAT TCC C	60.0	32.0
25	OPF 06	GGG AAT TCG G	60.0	34.0
26	OPF 08	GGG ATA TCG G	60.0	32.0
27	BC 374	GGT CAA CCC T	60.0	32.0
28	P 443	GGC GTG ATA G	60.0	32.0
29	UBC 238	CTC TCC AGC A	60.0	32.0
30	B 379	GGG CTA GGG T	70.0	34.0
31	BC 340	GAG AGG CAC C	70.0	34.0
32	OPB 06	TGC TCT GCC C	70.0	34.0
33	OPB 07	GGT GAC GCA G	70.0	34.0
34	OPB 09	TGG GGG ACT C	70.0	34.0
35	OPB 10	CTG CTG GGA C	70.0	34.0
36	OPC 07	GTC CCG ACG A	70.0	34.0
37	OPC 08	TGG ACC GGT G	70.0	34.0
38	OPC 09	CTC ACC GTC C	70.0	34.0
39	OD 8	GTG TGC CCC A	70.0	34.0
40	P-437	CGG ATC GAC A	60.0	32.0
41	OPO-02	ACG TAG CGT C	60.0	32.0
42	OPO-04	AAG TCC GCT C	60.0	32.0
43	OPO-19	GGT GCA CGT T	60.0	32.0
44	P-123	GGG ATT CGA C	60.0	32.0
45	P-166	GTG ACG GAC T	60.0	32.0

Primerlerin Tm sıcaklıklarının optimizasyonu Biometra Tgradient (TG) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Burada Tm sıcaklığının -5 ve +5 °C aralıkları denenerek en ideal yapışma (annealing) sıcaklıkları tespit edilmiştir.



Şekil 3. 4. Çalışmada kullanılan Biometra T gradient marka PCR cihazları

3.2.3.6. dNTP konsantrasyonu

Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanmaktadır. Optimum dNTP konsantrasyonu;

- $MgCl_2$ konsantrasyonuna,
- Reaksiyon koşullarına,
- Primer konsantrasyonuna,
- Çoğaltılmış ürünün boyuna ve
- PCR döngü sayısına bağlıdır.

Yapılacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmektedir. Çalışmada μl 'sinde 200 μM dNTPs olacak şekilde ayarlanan stok solusyondan 1 ve 2 μl çekilerek denemeler yapılmıştır.

3.2.3.7. Taq DNA polimeraz konsantrasyonu

Çalışmada Taq DNA polimeraz (promega) (5U/ μl)'dan 0.5, 1 ve 1.5 ünite enzim kullanılmıştır.

3.2.3.8. 10 x Taq DNA polimeraz tamponu

Çalışmada kullanılan 10 x buffer, Taq Polimeraz enzimi ile birlikte gelmiş olup, her tüp için 2.5 µl olacak şekilde kullanılmıştır.

3.2.3.9. PCR koşullarının optimizasyonu

PCR döngüsü ve süresi optimize edilmek amacı ile Shoyama vd (1998)'nin kullandığı aşağıdaki döngü parametreleri kullanılmıştır;

- 94 °C ---15 saniye
 - 32 °C ---30 saniye
 - 72 °C ---60 saniye
- 
- 60 döngü
- 72 °C -----8 dk
 - 4 °C -----bekleme sıcaklığı

Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, primer, Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarı, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı gibi termalcycler parametreleri DNA amplifikasyonunu etkiler. Bundan dolayı kritik parametreler RAPD çalışmaları için başlamadan önce optimize edilmiştir.

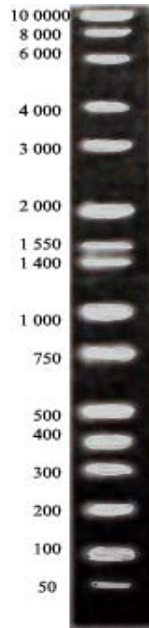
3.2.4. Agaroz jel elektroforezi ve fotograflama

10 x TBE tampondan seyreltilerek yapılan 1 x TBE tamponu içinde kaynatılan agaroz oda sıcaklığında soğutulularak jel tepsisine dökülmüştür. 200 ml jel tepsiye

dökmeden önce 14 µl etidyum bromüd eklenerek karıştırılmıştır. 200 ml'lik jel tepsilerine iki adet 28'lik tarak kullanılmıştır. PCR ürünlerini jelde yürütmek için 20 µl örnek için 4 µl yükleme tamponu (loading buffer) ilave edilip yükleme yapılmıştır. PCR ürünleri % 1.8'lik agaroz (3:1 Sea Kem LE: Nuisieve) jelinde elektroforeze tabi tutulmuştur. 90 Volt akım verilerek 2-2.5 saat yürütülmüştür.

Yürütme tamamlandıktan sonra DNA bantları UV translimünatörü altında gözlenerek RAPD profillerinin fotograflanması ile sonuçların alınması sağlanmıştır. Fotoğraf çekimleri görüntüleme sisteminde (UVP Laboratory Products) gerçekleştirilmiştir.

RAPD bantlarının büyüklüklerini belirlemek için 16 fragment içeren 'Directload Wide Range' DNA markörü kullanılmıştır (Şekil 3.5). Bu fragmentler 50-10.000 baz çifti arasındadır. Bu markör jelde yürütüldüğünde yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla; 10.000, 8000, 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1400, 1000, 750, 500, 400, 300, 200, 100 ve 50 baz (bp) çifti verecek şekilde fragmentlere ayrılmaktadır. Amplifikasyon sonucu oluşan RAPD bantlarının büyüklükleri DNA markörlerindeki bantların büyüklükleri ile kıyaslanarak yapılmıştır.



Şekil 3. 5. RAPD bant profillerini belirlemede kullanılan 'Directload Wide Range' DNA markörü (Sigma)

3.2.5. RAPD polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması

RAPD bantları 1 ve 0 olarak kayıt edilmiş olup, '1' bantın varlığını '0' ise bantın yokluğunu göstermektedir. Materyaller arasındaki genetik mesafe POPGENE32 versiyon 1.32 (Population Genetic Analysis) ve MEGA versiyon 3.0 (Kumar vd 2004) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programları ile analiz edilmiştir. Programdaki genetik benzerlik ve genetik mesafe Nei (1972, 1979) formülüne dayandırılmaktadır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Morfolojik Gözlemler İçin Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Araştırma alanının toprak özellikleri

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında yürütülmüştür. Deneme tarlasının toprak analizleri T.C. Başbakanlık Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Tarla toprağının su ile doymuşluk oranı % 55-60 arasında olup, toplam tuz oranı % 0.063-0.076 arasındadır. Deneme tarlası tekstür bakımından killi-tınlı bir yapıya sahiptir. pH değeri çok hafif alkalidir. Organik madde % 1 civarında olup, bitkilere yarayışlı besin maddeleri bakımından yeterli olduğu görülen tarla toprağında, tuzluluk sorunu bulunmamaktadır.

Çizelge 4.1. Deneme tarlasının toprak analizi

Toprak Özellikleri		Toprak örneğinin alındığı derinlik (cm)	
		0-20	20-40
pH		7,33	7,26
CaCO ₃ %		9,00	10,0
Organik Madde %		1,14	1,02
Toplam Tuz %		0,063	0,076
Kum %		39,99	35,31
Kil %		22,18	24,35
Silt %		37,83	40,24
Bitkilere Yarayışlı	P ₂ O ₅ kg/da	5,3	4,5
	K ₂ O kg/da	140	122

4.1.2. Araştırma alanının iklim özellikleri

Denemenin kurulduğu 2000-01, 2001-02 ve 2002-03 bitki yetiştirme dönemi boyunca kaydedilen deneme yerine ait iklim faktörleri; aylık toplam yağış (mm), aylık ortalama sıcaklık (°C) ve aylık ortalama nispi nem (%) değerleri ile uzun yıllar ortalama değerleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi denemenin yapıldığı yıllarda özellikle ortalama yağış ve sıcaklık değerlerinde uzun yıllar ortalamalarına göre oldukça düzensiz değerlerin olduğu görülmektedir. Yağış bakımından 2001-02 döneminde tüm yıl belirgin düzensizlikler görülürken, 2000-01 ve 2002-03 dönemlerinde özellikle bahar dönemindeki düzensizlikler dikkati çekmektedir. Yine 2001-02 döneminde kış aylarının oldukça soğuk geçtiği görülmektedir. Bu dönemdeki aşırı soğuklardan dolayı bitkiler zarar görmüştür. Bu zararı giderebilmek için bir sonraki dönemde kasalara ekimler yapılarak telafi yollarına gidilmiştir.

Çizelge 4.2. Deneme tarlasının yetiştirme dönemlerinde kaydedilen toplam yağış, ortalama sıcaklık ve ortalama nispi nem değerleri ile uzun yıllar ortalama değerleri

Aylar	İklim Faktörleri											
	Yağış mm				Sıcaklık °C				Nispi Nem %			
	Yetiştirme Dönemleri *				Yetiştirme Dönemleri *				Yetiştirme Dönemleri *			
	1.	2.	3.	Uzun Yıllar	1.	2.	3.	Uzun Yıllar	1.	2.	3.	Uzun Yıllar
Eylül	4,5	13,0	54,7	6,8	18,9	20,8	18,3	20,4	55,6	46,2	64,9	46,4
Ekim	20,5	1,0	22,7	29,0	12,2	13,2	13,3	14,9	65,8	47,5	66,7	59,1
Kasım	7,4	64,8	19,0	49,6	8,7	6,9	8,0	5,7	62,0	72,3	72,6	72,1
Aralık	31,0	116,9	16,2	33,2	2,2	2,5	-0,8	0,9	81,1	79,4	74,6	78,0
Ocak	6,8	29,8	42,0	33,1	3,0	-3,8	5,4	0,7	72,4	77,2	73,3	76,5
Şubat	43,0	11,8	54,6	38,1	4,1	5,0	-0,3	0,7	69,9	60,8	71,8	73,1
Mart	32,8	23,0	8,6	24,5	11,5	8,6	3,2	6,4	59,6	58,3	62,5	63,0
Nisan	27,3	101,1	70,3	39,8	12,6	10,4	10,3	12,6	61,1	66,1	62,4	57,8
Mayıs	110,0	38,7	18,0	47,9	14,8	16,7	19,0	16,1	63,2	50,2	52,9	56,6
Haziran	0,0	29,0	0,0	20,5	21,9	20,8	22,6	20,1	40,2	53,4	46,6	50,5
Temmuz	2,5	35,3	3,0	8,8	26,3	24,8	23,5	23,5	42,8	56,7	49,5	45,9
Ağustos	19,3	6,6	8,8	6,3	24,7	22,5	24,3	23,4	46,4	59,1	48,1	46,5

*Yetiştirme dönemleri: 1. dönem: 2000-01, 2. dönem: 2001-02, 3. dönem: 2002-03.

Uzun yıllar: 1926-1998 arasındaki yıllara ait ortalama değerlerdir.

4.2. Morfolojik ve Kimyasal Karakterler

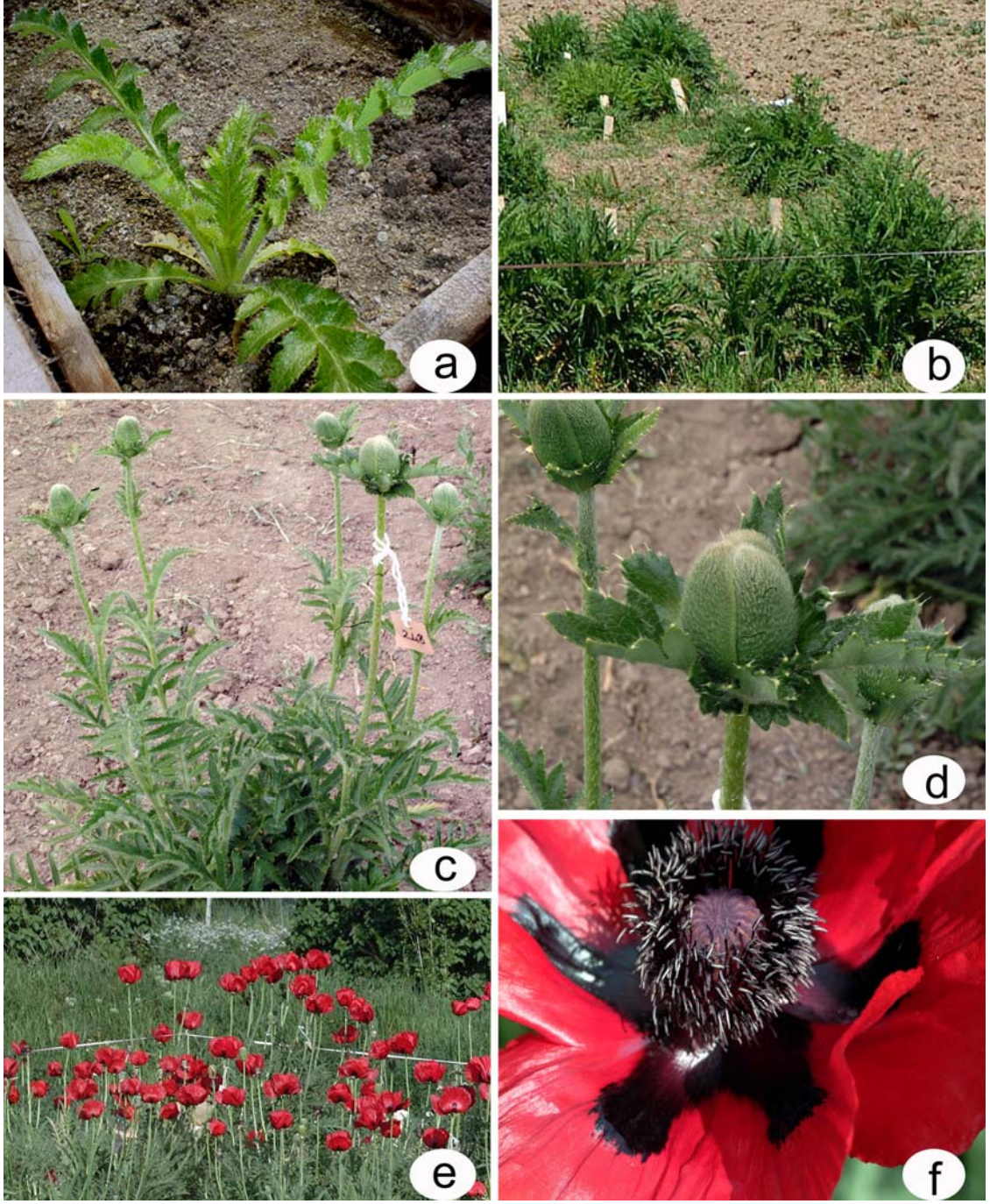
4.2.1. *Papaver bracteatum*'un morfolojik ve kimyasal karakterler bakımından incelenmesi

Papaver bracteatum ile ilgili morfolojik ve kimyasal ölçümler ve gözlemler Şekil 4.1 ve Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Bitki boyu (cm): Ölçümü yapılan 13 bitkide bitki boyu ortalama 96 cm olarak tespit edilmiştir. Bitkilerin boyları ise 70-102 cm arasında dağılım göstermiştir.

Yaprak boyu (cm): Ölçümü yapılan bitkilerde yaprak boyu ortalama 61.5 cm olarak belirlenmiştir. Yaprakların boyları ise 45-65 cm arasında değişmiştir.

Çiçek sapının kaçınıcı yapraktan geliştiği (adet): Ortalama boğum 7.23 olarak tespit edilmiştir. Boğum sayısının 6-9 arasında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 1. *Papaver bracteatum* türünde görülen morfolojik aşamalar: a) Bitkinin birinci yıl rozet yaprakların görünüşü, b) Çok yıllık rozet ve erken dönem görünüşü, c) Genel görünüş, d) tomurcuk ve kaolin yaprakların görünüşü, e) Çiçek ve kapsülün görünüşü, f) Petal, erkek ve dişi organların görünüşü

Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan bitkilere ait morfolojik ve kimyasal karakterler

	Bitki sırası/ özellikler	Bitki boyu (cm)	Yaprak boyu (cm)	Çiçek sap. kaçıncı yapraktan geliştiği	Tomurcuk görünüşü	Brakte durumu ve sayısı	Sepal sayısı
1	PB1	100	65	8	Dik	4-6	3
2	PB2	100	65	8	Dik	4-6	3
3	PB3	85	50	8-9	Dik	4-6	3
4	PB4	100	63	7-8	Dik	4-6	3
5	PB5	95	65	7-8	Dik	4-6	3
6	PB7	100	55	7-8	Dik	4-5	3
7	PB9	95	55	6-7	Dik	5	3
8	PB10	100	63	7	Dik	6-8	3
9	PB99	85	65	7	Dik	4-6	3
10	PB100	85	65	7	Dik	4-6	3
11	PB101	101	60	6-7	Dik	4-5	3
12	PB246	100	63	6-7	Dik	4-5	3
13	PB248	102	65	6-7	Dik	2-4	3
14	PP60	50	25	4-5	Yarı dik	Yok	2
15	PP70	65	60	6	Dik	3	3
16	PP121	95	60	7-8	Dik	3-4	2
17	PP122	85	52	7-8	Dik	3	2
18	PP141	75	65	6-7	Dik	3-4	3
19	PP147	55	42	5-6	Dik	3-4	2
20	PP249	60	30	4-6	Dik	3	2
21	PP251	92	55	5	Dik	2-3	3
22	PO73	30	35	6	Dik	Yok	2
23	PO74	50	35	4-6	Dik	Yok	2-3
24	PO169	55	45	7	Dik	Yok	2
25	PO170	55	40	4-6	Eğik	Yok	2-3
26	PO180	62	40	4-6	Eğik	Yok	2-3
27	PO181	55	45	4-6	Eğik	Yok	2
28	PO240	75	35	4-6	Eğik	Yok	2-3
29	PO244	70	40	4-6	Dik	Yok	2-3
30	1	48	32	3	Eğik	Yok	2
31	3	80	35	5-6	Eğik	Yok	2
32	12	45	25	4-6	Yarı dik	Yok	2
33	19	55	28	2-6	Dik	Yok	2
34	22	55	17	4-6	Eğik	Yok	3
35	47	65	27	4	Dik	Yok	2
36	59	42	18	5-7	Dik	Yok	2
37	83	12	15				
38	84	13	10	3-4	Dik	Yok	2-3
39	121	50	32	3	Yarı dik	Yok	3
40	124	55	30	3-4	Yarı dik	Yok	2
41	136	45	23	4	Yarı dik	Yok	2
42	139	25	20	5	Eğik	Yok	2
43	144	50	26	4-5	Eğik	Yok	2
44	147	55	33	3	Dik	Yok	2-3
45	148	65	31	5-6	Dik	Nadiren1	2-3
46	149	65	31	5-6	Dik	Nadiren1	2-3
47	155	65	35	5-7	Dik	Nadiren1	3
48	157	60	22	4-6	Yarı dik	Yok	2-3
49	159	40	18	4	Eğik	Yok	2
50	163	55	30	3-5	Dik	Yok	2
51	169	55	30	6	Dik	Yok	2
52	178	60	30	5	Eğik	Yok	2
53	185	15	12				

Çizelge 4.3. (devam)

	Bitki sırası/ özellikler	Çiçeklenme zamanı	Petal sayısı	Petal rengi	Petal eni (cm)	Petal boyu (cm)	Petal leke şekli	Petal leke eni (cm)
1	PB1	17.5.03	6	Koyu kırmızı	7	8.4	Tabana kadar	2-3
2	PB2	17.5.03	6	Koyu kırmızı	7	8.5	Tabana kadar	2-3
3	PB3	17.5.03	6	Koyu kırmızı	6-7	8.5	Ortada	0.3
4	PB4	17.5.03	6	Koyu kırmızı	6-7	5-6	Ortada küçük	0.5
5	PB5	17.5.03	6	Koyu kırmızı	7	5-6	Ortada küçük	0.5
6	PB7	16.5.03	6	Koyu kırmızı	6.5-7.5	7.2	Ortada	0.6-0.9
7	PB9	16.5.03	6	Koyu kırmızı	6	5-7	Tabana kadar	1.7-2.3
8	PB10	17.5.03	6	Koyu kırmızı	6.5	5.5-6.7	Tabana kadar	2-2.2
9	PB99	16.5.03	6	Koyu kırmızı	6-6.5	6	Tabana kadar	1-1.5
10	PB100	16.5.03	6	Koyu kırmızı	6-6.5	6	Tabana kadar	1-1.5
11	PB101	16.5.03	6	Kiremit kırmızısı	6	6	Ortada	1.5-1.7
12	PB246	16.5.03	6	Koyu kırmızı	6-7	6-7	Ortada	1.6-2
13	PB248	16.5.03	6	Koyu kırmızı	6-7	6	Tabana kadar	2-2.4
14	PP60	18.5.03	4	K. Kir. kırmızısı	5-6	5.5	Ortada	1-1.5
15	PP70	17.0.03	4	K. Kir. kırmızısı	10-11	7.5-8	Ortada	2-2.4
16	PP121	15.5.03	4	K. Kir. kırmızısı	6-7	6	Ortada	0.7-1.4
17	PP122	18.5.03	4	K. Kir. kırmızısı	5.5-6	7	Ortada	0.8-1.2
18	PP141	16.5.03	6	K. Kir. kırmızısı	6-6.5	6.5	Ortada	1-1.1
19	PP147	15.5.03	6	K. Kir. kırmızısı	6-7.5	7	Ortada	3-3.2
20	PP249	24.5.03	4-6	K. Kir. kırmızısı	6.5-8	7	Ortada	0.4-0.5
21	PP251	24.5.03	6	K. Kir. kırmızısı	7.6-8.8	8.5-9	Tabana kadar	3-3.4
22	PO73	30.5.03	6	Kiremit kırmızısı	6.5-7	5.5-6	Yok	
23	PO74	30.5.03	6	Kiremit kırmızısı	6-7	5.8-6.5	Yok	
24	PO169	29.5.03	6	Kiremit kırmızısı	6.5-7	6.5-7	Tabana kadar	1.2-1.5
25	PO170	29.5.03	4-6	Kiremit kırmızısı	6-8	5-6	Yok	
26	PO180	28.5.03	4-6	Kiremit kırmızısı	6.5-7.8	5.4-6.2	Yok	
27	PO181	26.5.03	6	K. Kir. kırmızısı	6-8	5-6	Ortada	3-3.5
28	PO240	27.5.03	4-6	Kiremit kırmızısı	5-7	4-6	Yok	
29	PO244	26.5.03	4-6	Kiremit kırmızısı	5-7	4-6	Yok	
30	1	18.5.03	4	K. Kir. kırmızısı	12	6-8	Ortada	3.7
31	3	15.5.03	4	Kiremit kırmızısı	8	4-6.5	Ortada	1.7
32	12	16.5.03	4	K. Kir. kırmızısı	8-8.4	4.5-6	Ortada	3.4
33	19	16.5.03	4	K. Kir. kırmızısı	9.5	5-7	Ortada	3.2
34	22	14.5.03	4	Kiremit kırmızısı	6.5-10	5.3	Ortada	1-1.4
35	47	18.5.03	4	Kiremit kırmızısı	6.5-8	4-6.5	Ortada	1-2
36	59	19.5.03	4	Kiremit kırmızısı	7-8.5	7	Ortada	1.2-1.8
37	83	Çiçeklenmedi						
38	84	16.5.03	4	Kiremit kırmızısı	4-5	2.8-3.5	Ortada	0.8-1
39	121	16.5.03	4	Kiremit kırmızısı	6-7	5.5-6	Ortada	1.2
40	124	17.5.03	4	Kiremit kırmızısı	6-8	7	Ortada	1.1-1.4
41	136	15.5.03	4	Kiremit kırmızısı	8	6	Ortada	1.5-1.8
42	139	15.5.03	4	Kiremit kırmızısı	6.4-7.2	5.7-6.5	Ortada	0.6-1
43	144	19.5.03	4	Kiremit kırmızısı	7-8	6	Ortada	0.1-0.3
44	147	21.5.03	4	Kiremit kırmızısı	10-11	7.5	Ortada	1.4-1.6
45	148	19.5.03		Kiremit kırmızısı	8-10	7	Ortada	2
46	149	19.5.03	4-5	Kiremit kırmızısı	8-11	7.5	Ortada	2-2.3
47	155	15.5.03	4-6	Kiremit kırmızısı	7-7.5	6.4-6.8	Ortada	1.8-2.2
48	157	21.5.03	4-6	Kiremit kırmızısı	7-9	6-8	Ortada	1.8-2.2
49	159	25.5.03	4	Kiremit kırmızısı	8-10	6-7.5	Ortada	2-2.2
50	163	19.5.03	4	Kiremit kırmızısı	9-11	6	Ortada	2-2.2
51	169	17.5.03	4	Kiremit kırmızısı	10-12	7.5	Ortada	1.5-2
52	178	20.5.03	4	Kiremit kırmızısı	8-10	7-8	Yok	
53	185	Çiçeklenmedi						

Çizelge 4.3. (devam)

	Bitki sırası/ özellikler	Pet leke boyu (cm)	Kapsülde Lateks sızması	Kapsül eni (mm)	Kapsül boyu (mm)	Kapsül Işın sayısı	Kapsül tepcecik şekli	Tebain (%)
1	PB1	3.2	Nadiren	19,88	34,74	17,4	Ortası hafif sivri	1.5
2	PB2	3.2	Nadiren	20,06	26,19	16,8	Düz	1.6
3	PB3	0.2	Nadiren	17,12	27,48	17,9	Ortası sivri uçları yukarı	0.8
4	PB4	0.4	Yok	22,01	39,81	16,7	Uçları yukarı içi düz	0.6
5	PB5	0.3	Yok	17,83	27,38	16,9	Düz	2.1
6	PB7	1.3-1.5	Nadiren	20,89	34,75	17,8	Düz	0.8
7	PB9	3	Yok	17,56	31,71	16,2	Düz	1.3
8	PB10	2.8	yok	18,20	32,15	14,3	Düz	1.4
9	PB99	2.7-3	Nadiren	23,21	27,23	15,0	Uçları yukarı içi düz	2.4
10	PB100	2.7-3	Nadiren	20,81	30,05	16,2	Düz	2.5
11	PB101	1.7-2	Nadiren	20,83	25,71	16,8	Düz	-
12	PB246	1.5-2.3	Yok	19,40	31,58	13,0	Düz	1.6
13	PB248	2.6-2.9	Yok	20,08	27,47	14,6	Düz	1.6
14	PP60	1.4-1.7	Nadiren	10,67	23,70	10,4	Düz	-
15	PP70	1.5-1.7	Nadiren	17,28	31,11	11,2	Düz	-
16	PP121	1-1.5	Nadiren	19,43	31,08	16,2	Düz	-
17	PP122	1.2-1.5	Nadiren	18,74	24,63	13,8	Düz	-
18	PP141	0.4-0.6	Var	13,03	22,12	15,0	Ortası hafif sivri	0.09
19	PP147	2-2.5	Var	21,53	23,99	14,6	Dış bükey	-
20	PP249	0.5-0.7	Yok	13,97	26,09	10,8	Dış bükey	1.5
21	PP251	5-5.4	Yok	18,80	24,04	14,0	Düz	0.2
22	PO73		Yok	12,52	23,87	10,6	İç bükey	-
23	PO74		Yok	10,69	19,95	11,0	Düz	-
24	PO169	2.3-2.5		13,48	21,50	10,0	Düz	-
25	PO170		Yok	13,48	21,50	10,0	İç bükey	-
26	PO180		Yok	14,20	17,60	12,3	Düz	eser
27	PO181	2.5-3	Yok	19,20	26,92	13,6	Uçları yukarı içi düz	-
28	PO240		Yok	9,71	16,92	11,0	Düz	-
29	PO244		Yok	14,94	16,96	13,5	İç bükey	-
30	1	2.2	Yok	17,86	32,52	14,0	Düz	-
31	3	1.2	Yok	1931	26,96	13,2	Düz	-
32	12	1.8	Yok	13,54	21,77	9,6	Uçları yukarı içi düz	0.02
33	19	2.2	Yok	1892	31,76	10,4	Uçları yukarı içi düz	-
34	22	0.4	Yok	12,24	19,50	9,4	Uçları yukarı içi düz	0.06
35	47	0.5	Yok	18,24	22,64	11,4	Uçları yukarı içi düz	-
36	59	0.5-0.9	Yok	15,07	28,88	9,5	Uçları yukarı içi düz	-
37	83		Ç.lenmedi	.	.	.		0.01
38	84	0.3-0.6	yok	.	.	.	Uçları yukarı içi düz	0.01
39	121	0.8-1	Yok	.	.	.	Uçları yukarı içi düz	0.4
40	124	1	Yok	17,91	28,38	12,0	Uçları yukarı içi düz	-
41	136	1.1-1.4	Var	14,12	24,20	12,0	Uçları yukarı içi düz	-
42	139	.05-0.6	Yok	11,07	19,50	8,5	Uçları yukarı içi düz	-
43	144	0.1	Yok	13,87	28,17	10,2	Uçları yukarı içi düz	-
44	147	0.8-1.2	Var	19,91	25,80	13,0	Uçları yukarı içi düz	-
45	148	1-1.5	Var	.	.	.		-
46	149	1.3-1.5	Var	19,95	28,13	10,6	Uçları yukarı içi düz	-
47	155	0.8-1.2	Var	20,95	34,68	13,6	Uçları yukarı içi düz	-
48	157	1.4-1.8	Var	18,06	24,86	12,6	Uçları yukarı içi düz	-
49	159	1.4-1.9	Yok	18,98	25,37	12,0	Uçları yukarı içi düz	-
50	163	2.2-2.5	Yok	19,53	28,7	13,0	Uçları yukarı içi düz	-
51	169	1-1.2	Yok	18,55	22,69	11,0	Uçları yukarı içi düz	-
52	178		Yok	18,31	25,0	9,5	Uçları yukarı içi düz	-
53	185		Ç.lenmedi	.	.	.		-

Tomurcuk görünüşü: Tomurcuklar çiçek açmadan birkaç gün önceki görünümle ile kaydedilmiştir. Tomurcuklar tamamen dik görünümlüdür.

Brakte sayısı (adet): Ortalama brakte sayısı 4.80 olarak belirlenmiştir. Sayımı yapılan braktelerden bir bitkide 2 ve 8 adet brakte sayılırken, genel olarak 4-6 adet olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Sepal sayısı (adet): Sepal sayısı, *P. bracteatum* türüne ait bitkilerin hepsinde 3 adet olarak tespit edilmiştir.

Çiçeklenme zamanı: Çiçeklenme zamanı, Mayıs ayı içerisinde genelde 3. haftanın başlarında 16-17 Mayıs günlerinde gerçekleşmiştir.

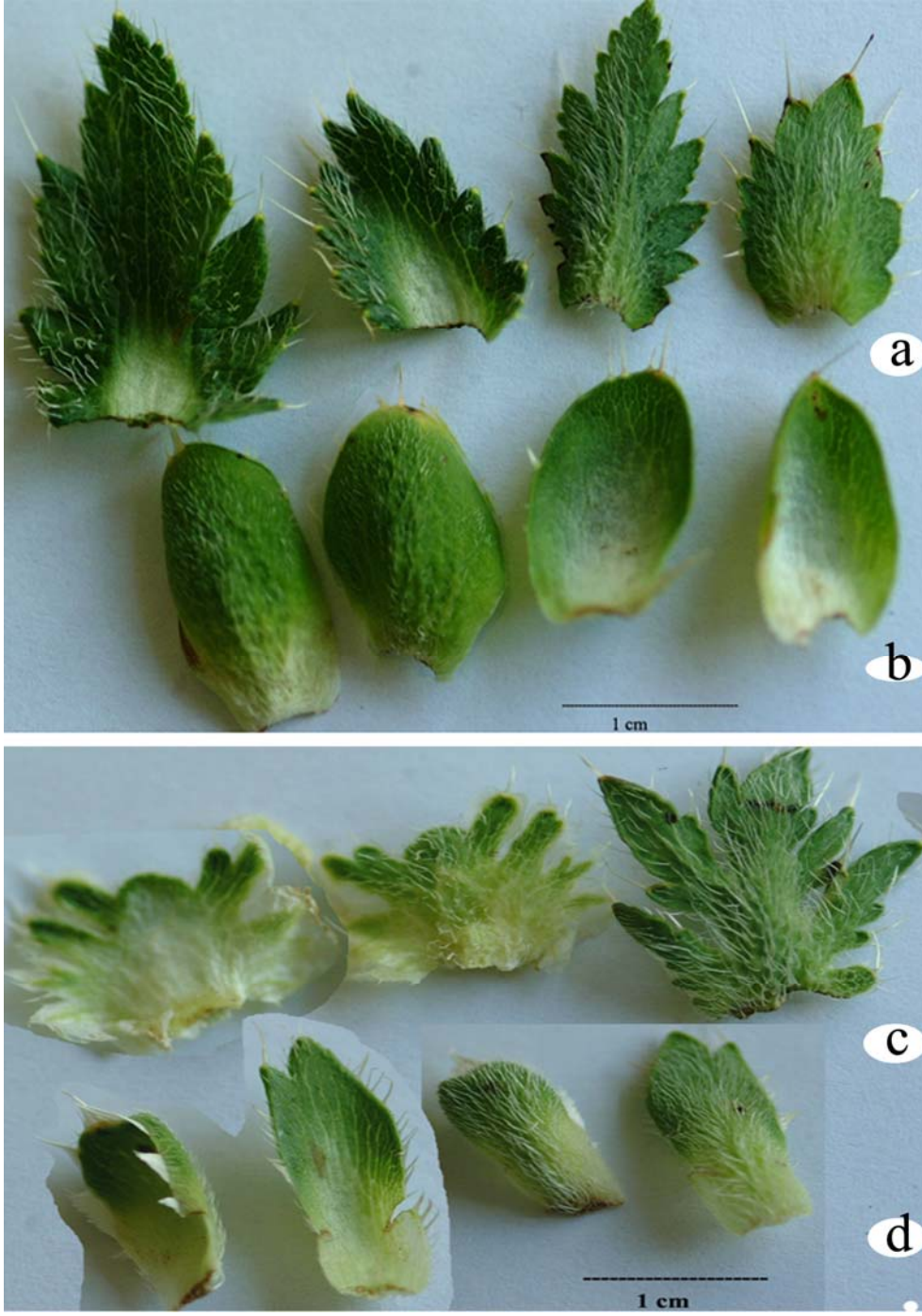
Petal sayısı (adet): Petal sayısı, incelediğimiz bitkilerin hepsinde 6 adet olarak tespit edilmiştir.

Petal rengi: Petal rengi, incelediğimiz 13 adet bitkiden 12' sinde koyu kırmızı iken 1 tanesinde koyu kiremit kırmızısı (PB101) renkte görülmüştür.

Petal eni (cm): Ortalama petal eni 6.53 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin eni 6-7.5 cm aralıklarında tespit edilmiştir.

Petal boyu (cm): Ortalama petal boyu 6.67 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin boylarında ki değişim 5-8.5 cm aralıklarında olduğu tespit edilmiştir.

Petal leke şekli: Petal leke şekli, incelenen 13 bitkiden 7 tanesinde tabana kadar, 4 tanesinde ortada ve 2 tanesinde ortada küçük şeklinde tespit edilmiştir.



Şekil 4. 2. Gövde yaprak ve braktelerin genel görünüşü. a) *Papaver bracteatum* türüne ait gövde (kaolin) yapraklarının görünüşü, b) *Papaver bracteatum* türüne ait braktelerin görünüşü, c) *Papaver pseudo-orientale* türüne ait gövde yaprakların görünüşü, d) *Papaver pseudo-orientale* türüne ait braktelerin görünüşü.

Petal leke eni (cm): Petalde leke eni ortalama 1.46 cm olarak belirlenmiştir. İncelenen tüm bitkilerdeki leke eni 0.3-4 cm arasında değişmiştir.

Petal leke boyu (cm): Petal leke boyu ortalama 2.03 cm olarak tespit edilmiştir. İncelenen tüm bitkilerdeki leke boyu ise 0.2-2.9 cm arasında değişmiştir.

Kapsülde lateks sızması: Kapsülde alkaloit sızması, 7 bitkide nadiren var olmasına rağmen, 6 bitkide tespit edilememiştir.

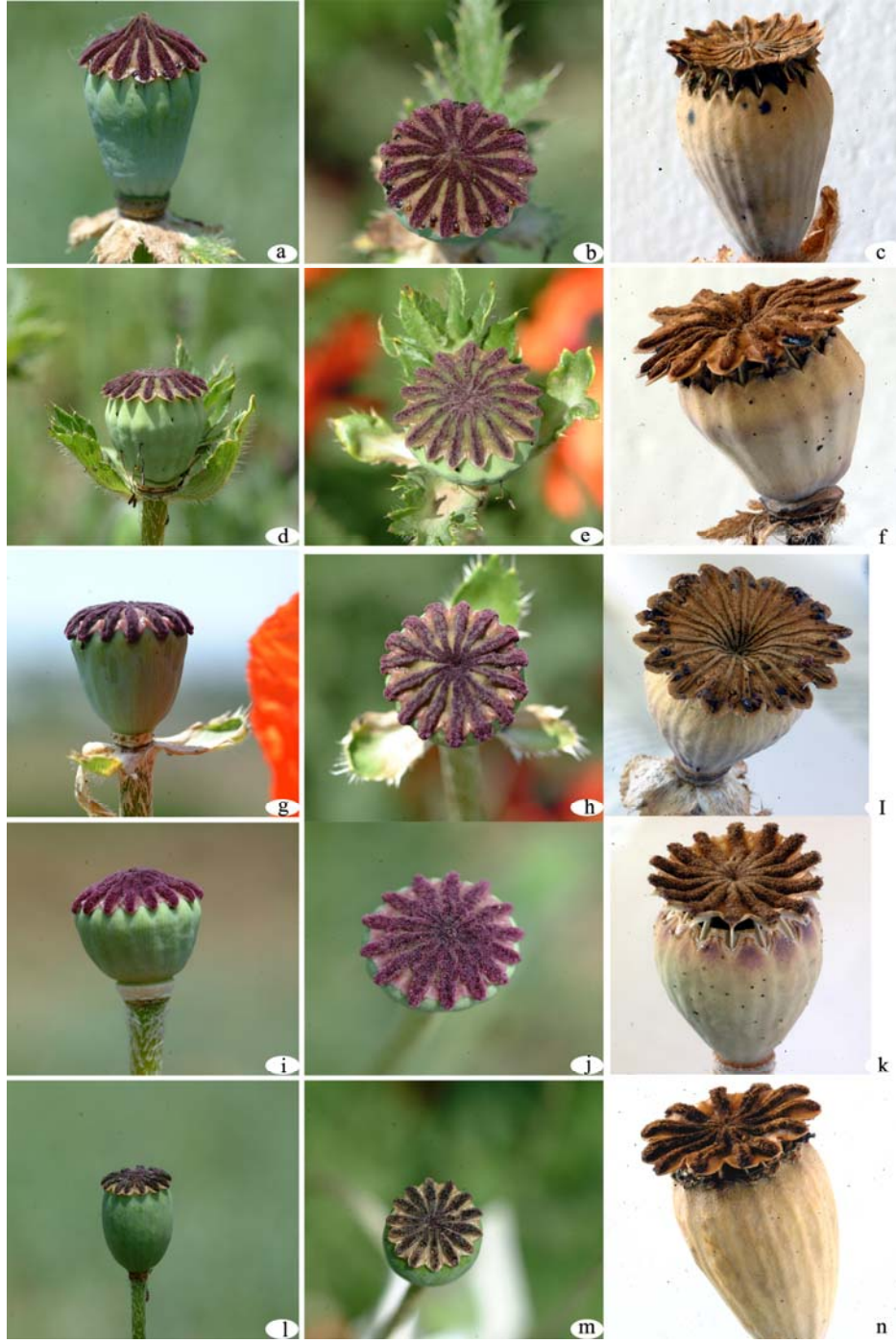
Kapsül eni (mm): Kapsülün en geniş kısmı kumpasla ölçülerek ortalama 19.83 mm olarak tespit edilmiştir. Genel olarak incelenen 13 bitkide de 17.56-23.21 mm aralıklarında olduğu tespit edilmiştir.

Kapsül boyu (mm): Kapsülün boyu ortalama 30.48 mm olarak tespit edilmiştir. Genel olarak incelenen 13 bitkide de 25.71-39.81 mm aralıklarında olduğu tespit edilmiştir.

Kapsül ışın sayısı (adet): Ortalama ışın sayısı 16.12 adet olarak belirlenmiştir. Buna göre kapsülde ışın sayısı 14.3-17.9 adet arasında olduğu tespit edilmiştir.

Kapsül tepecik şekli: Tepecik şekli incelenen 13 bitki içersinden 9 bitkide düz olarak belirlenmiştir. İki bitkide uçları yukarı içi düz, bir bitkide ortası hafif sivri ve yine bir bitkide ortası sivri uçları yukarı şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Tebain alkaloitinin varlığı (%): *Papaver bracteatum*'da ana alkaloit olarak buluna tebain alkaloiti bir bitki hariç diğer bitkilerde tespit edilirken ortalama %1.47 (0.6-2.5) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4. 3. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerin kapsül görünüşleri. a) *Papaver bracteatum* türüne ait kapsülün genel görünüşü, b) Üstten görünüş, c) Tepe genişliği 2.6 cm olan kuru kapsül görünüşü, d) *P. pseudo-orientale* türüne ait brakte ve gövde yaprağı bulunduran kapsül genel görünüşü, e) Üstten görünüş, f) Tepe genişliği 2.9 cm olan kuru kapsül görünüşü, g) *P. pseudo-orientale* türüne ait brakte bulunduran kapsül genel görünüşü, h) Üstten görünüş, i) Tepe genişliği 2.6 cm olan kuru kapsül görünüşü, j) *P. pseudo-orientale* türüne ait gövde yaprağı ve brakte bulundurmeyen kapsülün genel görünüşü, k) Üstten görünüş, l) Tepe genişliği 1.8 cm olan kuru kapsül görünüşü, m) *P. orientale* türüne ait kapsül genel görünüşü, n) Üstten görünüş, o) Tepe genişliği 1.5 cm olan kuru kapsül görünüşü.

4.2.2. *Papaver pseudo-orientale*'nin morfolojik ve kimyasal karakterler bakımından incelenmesi

Papaver pseudo-orientale ile ilgili morfolojik ve kimyasal ölçümler ve gözlemler Şekil 4.2, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Bitki boyu (cm): Ölçümü yapılan 8 bitkide bitki boyu ortalama 72.12 cm olarak tespit edilmiştir. Bitkilerin boyları ise 50-95 cm arasında olduğu görülmüştür.

Yaprak boyu (cm): Ölçümü yapılan bitkilerde yaprak boyu ortalama 48.62 cm olarak belirlenmiştir. Yaprakların boyları ise 23-65 cm arasında değişmiştir.

Çiçek sapının kaçınıcı yapraktan geliştiği (adet): Ortalama boğum 5.93 olarak tespit edilmiştir. Boğum sayısı 4-8 arasında olduğu belirlenmiştir.

Tomurcuk görünüşü: Tomurcuklar çiçek açmadan birkaç gün önceki görünüşleri ile kaydedilmiştir. Tomurcuklardan bir tanesi yarı dik diğerleri dik görünümüldür (Şekil 4.4ve Şekil 4.5).

Brakte sayısı (adet): Ortalama brakte sayısı 2.75 olarak belirlenmiştir. Sayımı yapılan brakteler genel olarak 2-4 adet olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Sepal sayısı (adet): Sepal sayısı, ortalama 2.37 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak sayımı yapılan bitkilerde kaliks sayısı 2-3 adet olarak tespit edilmiştir.

Çiçeklenme zamanı: Çiçeklenme zamanı, mayıs ayı içerisinde 3 ve 4. haftada 15-24 mayıs günlerinde gerçekleşmiştir.



Şekil 4. 4. *Papaver pseudo-orientale* türünün braktesiz çiçekli örneklerinde görülen morfolojik aşamalar: a) Bitkinin birinci yıl görünüşü, b) Çok yıllık rozet ve erken dönem genel görünüş, c) Genel görünüş, d) Tomurcuk görünüşü, e) Çiçek ve tomurcukların görünüşü, f) Petal, erkek organ ve dişi organın görünüşü.

Petal sayısı (adet): Petal sayısı, incelediğimiz 8 bitki petal sayısı yönünden 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grupta 4 bitkide 4 adet, ikinci grupta 1 bitkide 4-6 adet, üçüncü grupta ise 3 bitkide 6 adet olarak üç farklı grup tespit edilmiştir.

Petal rengi: Petal rengi, incelediğimiz bitkilerde koyu kiremit kırmızı renkte görülmüştür.

Petal eni (cm): Ortalama petal eni 7.08 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin eni 5-11 cm arasında tespit edilmiştir.

Petal boyu (cm): Ortalama petal boyu 6.93 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin boylarında ki değişim 5.5-9 cm arasında değişmiştir.

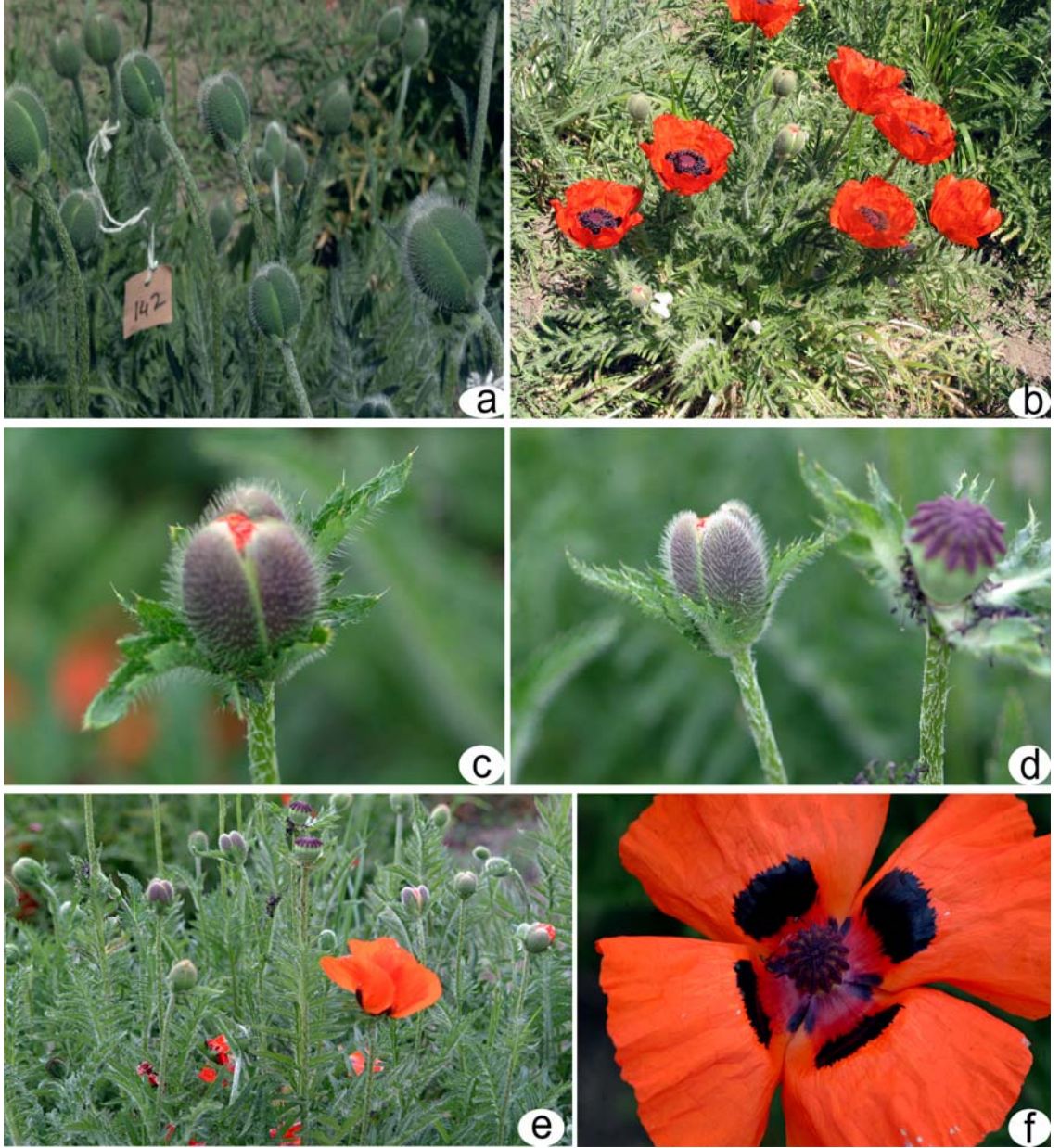
Petal leke şekli: Petal leke şekli, incelenen bitkilerin bir tanesinde tabana kadar, diğerlerinde ortada olarak tespit edilmiştir.

Petal leke eni (cm): Petal de leke eni ortalama 1.65 cm olarak belirlenmiştir. İncelenen tüm bitkilerde ki leke eni ise 0.4-3.4 cm arasında değişmiştir.

Petal leke boyu (cm): Petal leke boyu ortalama 1.81 cm olarak tespit edilmiştir. İncelenen tüm bitkilerde ki leke boyu ise 0.4-5.4 cm arasında değişmiştir.

Kapsülde lateks sızması: Kapsülde alkaloit sızması, 2 bitkide çok net belirli olarak var iken 4 bitkide nadiren var, 2 bitkide de olmadığı görülmüştür.

Kapsül eni (mm): Kapsülün en geniş kısmı kumpasla ölçülerek ortalama 16.86 mm olarak tespit edilmiştir. İncelenen 8 bitkide ise 10.67-18.80 mm aralıklarında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. *Papaver pseudo-orientale* türünde brakteli ve kaolin yapraklı çiçeklerde görülen morfolojik aşamalar: a) Bitkinin tomurcuklarının altında braktelerin görünüşü, b) Brakte ve gövde yapraklı bitkinin genel görünüşü, c ve d) Brakteli tomurcuk ve kapsül görünüşü, e) Brakte ve gövde yapraklı tomurcukların genel görünüşü, f) Petal, erkek organ ve dişi organın görünüşü.

Kapsül boyu (mm): Kapsülün boyu ortalama 25.84 mm olarak tespit edilmiştir. İncelenen 8 bitkide ise 22.12-31.11 mm arasında değişmiştir.

Kapsül ışın sayısı (adet): Ortalama ışın sayısı 13.25 adet olarak belirlenmiş; tüm kapsüllerde ise 10.04-16.2 adet arasında değişmiştir.

Kapsül tepecik şekli: Tepecik şekli incelenen 8 bitkiden 5 tanesinin düz, 2 tanesinin dış bükey, 1 tanesinin de ortası hafif sivri şekilli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Tebain alkaloidinin varlığı (%): *Papaver pseudo-orientale*'de üç bitkide %0.09, %0.2 ve %1.5 tebain alkaloidi tespit edilmiş olup, diğerlerinde tebain bulunamamıştır.

4.2.3. *Papaver orientale*'nin morfolojik ve kimyasal karakterler bakımından incelenmesi

Papaver orientale ile ilgili morfolojik ölçümler ve gözlemler Şekil 4.6 ve Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Bitki boyu (cm): Ölçümü yapılan 8 bitkide bitki boyu ortalama 56.5 cm olarak tespit edilmiştir. Bitkilerin boyları ise 25-75cm arasında olduğu görülmüştür.

Yaprak boyu (cm): Ölçümü yapılan bitkilerde yaprak boyu ortalama 39.37 cm olarak belirlenmiştir. Yaprakların boyları ise 25-45 cm arasında değişmiştir.

Çiçek sapının kaçınıcı yapraktan geliştiği (adet): Boğum sayısı 4-7 adet arasında değişmiş; ortalama 6.62 adet olarak bulunmuştur.

Tomurcuk görünüşü: Tomurcuklar çiçek açmadan birkaç gün önceki görünüşleri ile kaydedilmiştir. Tomurcuklardan 4 tanesi dik, diğer 4 tanesi ise eğik görünümlüdür (Şekil 4.6).

Brakte sayısı (adet): İncelenen bitkilerin hiçbirinde brakte görülmemiştir.

Sepal sayısı (adet): Sepal sayısı, ortalama 2.31 olarak tespit edilmiştir. Sayımı yapılan bitkilerde kaliks sayısı ise 2-3 adet arasında değişmiştir.

Çiçeklenme zamanı: Çiçeklenme zamanı, Mayıs ayı içerisinde 4. haftada 26-30 Mayıs günlerinde gerçekleşmiştir.

Petal sayısı (adet): Petal sayısı, incelediğimiz bitkilerde 4-6 ve 6 adet olarak iki farklı grup tespit edilmiştir.

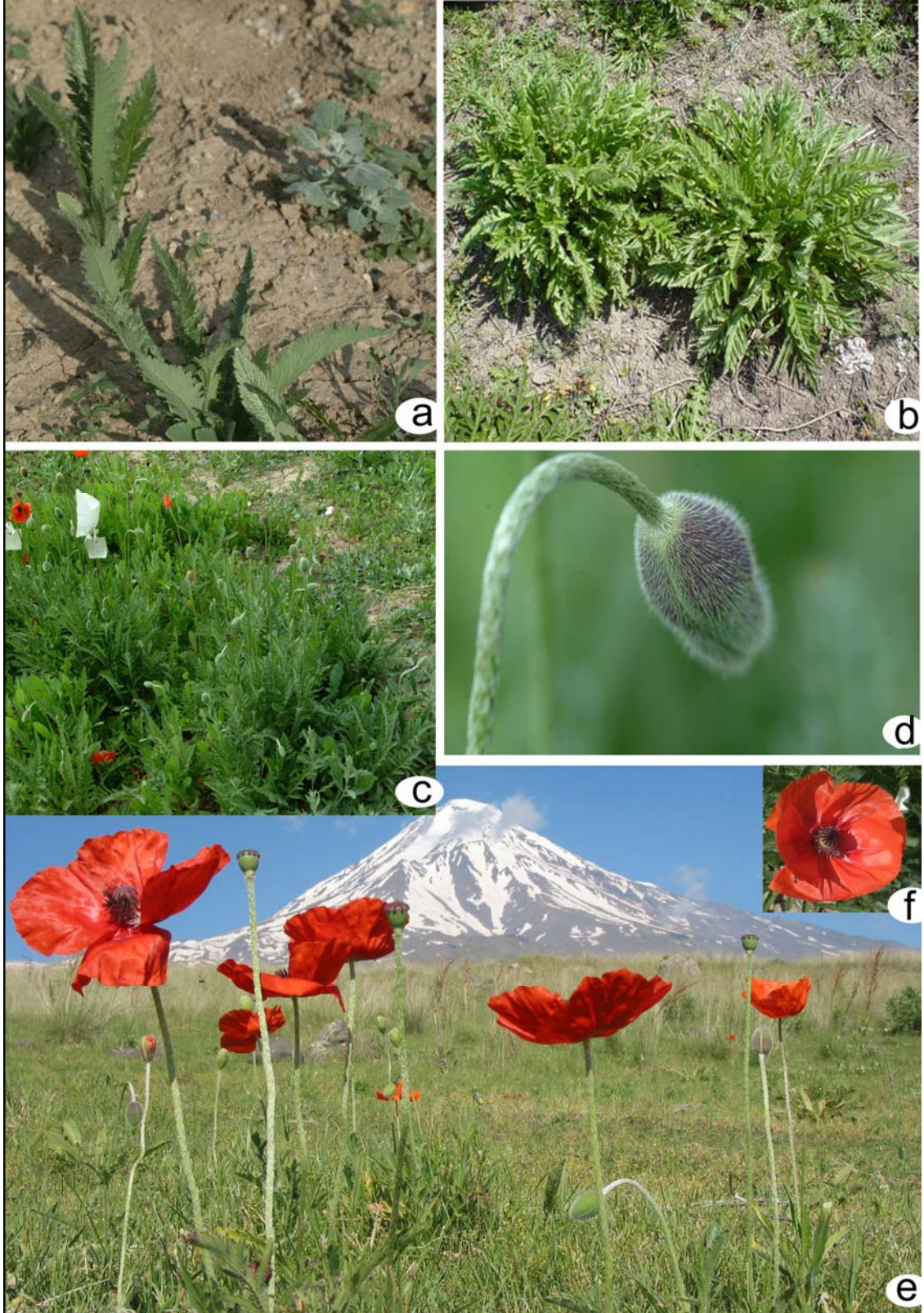
Petal rengi: Petal rengi, incelediğimiz bitkilerden bir tanesi koyu kiremit kırmızı renkte olup diğerleri kiremit kırmızısı renkte görülmüştür.

Petal eni (cm): Ortalama petal eni 6.64 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin eni ise 5-7.8 arasında değişmiştir.

Petal boyu (cm): Ortalama petal boyu 5.66 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin boyları ise 4-7 cm arasında değişmiştir.

Petal leke şekli: Petal leke şekli, incelenen bitkilerin bir tanesinde tabana kadar, yine bir tanesinde ortada, diğerleri lekesiz olarak tespit edilmiştir.

Petal leke eni (cm): Petallerinde leke görülen bitkilerde petal leke eni 1.2-3.5 cm arasında değişmiş; ortalama 2.3 cm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 6. *Papaver orientale* türünde görülen morfolojik aşamalar: a) Bitkinin birinci yıl görünüşü, b) Çok yıllık rozet ve erken dönem genel görünüş, c) Genel görünüş, d) Tomurcuk görünüşü, e) Çiçek ve kapsül görünüşü, f) Petal, erkek organ ve dişi organın görünüşü.

Petal leke boyu (cm): Petallerinde leke görülen bitkilerde Petal leke boyu ortalama 2.6 cm olarak tespit edilmiştir. İncelenen bitkilerdeki leke boyu ise 2.3-3 cm arasında değişmiştir.

Kapsülde lateks sızması: İncelediğimiz bitkilerin hiçbirisinde kapsülde alkaloit sızması tespit edilememiştir.

Kapsül eni (mm): Kapsülün eni ortalama 13.52 mm olarak tespit edilmiştir. İncelenen 8 bitkide de kapsül eni 9.71-19.20 mm arasında değişmiştir.

Kapsül boyu (mm): Kapsülün boyu ortalama 20.65 mm olarak tespit edilmiştir. İncelenen 8 bitkide ise 16.92-26.92 mm arasında değişmiştir.

Kapsül ışın sayısı (adet): Kapsülde ışın sayısı 10.0-13.6 adet arasında değişmiş; ortalama ışın sayısı 11.5 adet olmuştur.

Kapsül tepecik şekli: Tepecik şekli incelenen 8 bitkiden 4 tanesinin düz, 3 tanesinin iç bükey, 1 tanesinin de uçları yukarı içi düz şekilli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Tebain alkaloitinin varlığı (%): *Papaver orientale*'de bir bitkide eser miktarda tebain alkaloiti tespit edilmiş olup, diğerlerinde tebain bulunamamıştır.

4.2.4. Doğu Anadolu bölgesinden toplanan materyallerin morfolojik karakterler bakımından incelenmesi

Morfolojik karakterler bakımından ele alınan sonuçlar Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Bitki boyu (cm): Ölçümü yapılan 24 bitkide bitki boyu ortalama 39.84 cm olarak tespit edilmiştir. Bitkilerin boyları ise 12-80 cm arasında değişmiştir.

Yaprak boyu (cm): Ölçümü yapılan bitkilerde yaprak boyu ortalama 18.37 cm olarak belirlenmiştir. Yaprakların boyları ise 8-35 cm arasında değişmiştir.

Çiçek sapının kaçınıcı yapraktan geliştiği (adet): Ortalama boğum 3.44 olarak tespit edilmiştir. Boğum sayısının 3-6 arasında değişmiştir.

Tomurcuk görünüşü: Tomurcuklardan 10 tanesi dik, 5 tanesi yarı dik, 7 tanesi eğik görünümlüdür. İki bitkide çiçeklenme gerçekleşmemiş olduğundan tespit edilememiştir.

Brakte sayısı (adet): Üç bitkide nadiren brakte varlığı gözlenmekle birlikte diğer bitkilerde yoktur.

Sepal sayısı (adet): Sepal sayısı, ortalama 1.72 olarak tespit edilmiştir. Ölçülen bitkilerde sepal sayısı ise 2-3 adet arasında değişmiştir.

Çiçeklenme zamanı: Çiçeklenme zamanı, Mayıs ayı içerisinde 2. ve 3. haftada 14–25 Mayıs günlerinde gerçekleşmiştir.

Petal sayısı (adet): Petal sayısı incelediğimiz bitkilerin 19’u 4, 2’si 4-6 ve 1’i de 4-5 adet olmak üzere üç farklı grupta toplanmıştır.

Petal rengi: Petal rengi, incelediğimiz bitkilerden üç tanesi koyu kiremit kırmızı renkte olup, diğerleri kiremit kırmızısı renkte görülmüştür.

Petal eni (cm): Ortalama petal eni 8.30 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin eni ise 6–12 arasında değişmiştir.

Petal boyu (cm): Ortalama petal boyu 6.28 cm olarak belirlenirken, ölçümü yapılan petallerin boylarında ki değişim 2.8-8 cm arasında olmuştur.

Petal leke şekli: Petal leke şekli, incelenen bitkilerden 178 nolu bir örnekte bulunmazken, diğerlerinde ortada olarak tespit edilmiştir.

Petal leke eni (cm): Petal de leke eni ortalama 1.73 cm olarak belirlenmiştir. İncelenen bitkilerdeki leke eni ise 0.1-3.7 cm arasında değişmiştir.

Petal leke boyu (cm): Petal leke boyu ortalama 1.1 cm olarak tespit edilmiştir. İncelenen bitkilerdeki leke boyu ise 0.1–2.4 cm arasında değişmiştir.

Kapsülde lateks sızması: İncelediğimiz 24 bitki içerisinde 6 bitkide kapsülde alkaloit sızması tespit edilmiştir.

Kapsül eni (mm): Kapsülün en geniş kısmı kumpasla ölçülerek ortalama 17.17 mm olarak tespit edilmiştir. İncelenen 8 bitkide de 11.07-20.95 mm aralıklarında olduğu tespit edilmiştir.

Kapsül boyu (mm): Kapsülün boyu ortalama 26.29 mm olarak tespit edilmiştir. Genel olarak incelenen 8 bitkide de 19.50–34.68 mm arasında değişmiştir.

Kapsül ışın sayısı (adet): Ortalama ışın sayısı 11.34 adet olarak belirlenmiştir. Kapsülde ışın sayısı 8.5–14.0 adet arasında değişmiştir.

Kapsül tepecik şekli: Tepecik şekli genel olarak uçları yukarı içi düz şeklinde belirlenmiş olmasına rağmen, iki bitkide tam düz olarak belirlenmiştir.

Tebain alkaloitinin varlığı (%): Tebain analizi toplama bölgelerinden ilk getirilen kapsüllerde yapılmıştır. Tür tespiti tam olarak yapılmamış Doğu Anadolu materyalinde 5 bitkide ortalama % 0.1 oranında (0.01–0.4) tebain alkaloiti tespit edilmiş olup, diğerlerinde tebain bulunamamıştır.

4.2.5. Morfolojik ve kimyasal verilerin istatistiksel değerlere çevrilmesi

İncelenen bitkiler morfolojik olarak 20 farklı karakter yönüyle ele alınmıştır. Ele alınan karakterlerin istatistiksel anlamda yorumlanabilmesi için her karakteri kendi içersinde gruplara ayırarak numaralandırma yapılmıştır (Ek 2). Buna göre; bitki boyu 9, yaprak boyu 6, çiçek sapının kaçınıcı nodda olduğu 6, tomurcuk görünümü 3, brakte durumu ve sayısı 6, sepal sayısı 3, çiçeklenme zamanı 4, petal sayısı 3, petal rengi 3, petal eni 6, petal boyu 5, petalde leke varlığı 2, lekenin eni 8, lekenin boyu 8, kapsül boyu 7, kapsül eni 5, kapsüldeki ışıın sayısı 5, tepecik şekli 6, tepecik üzerinde alkaloit sızması 3 ve tebain alkaloiti 7 alt grup şeklinde değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4). Hiyerarşik kümeleme analizi (SPSS 11.0) programında oluşturulan benzerlik indeksinde en yakın bireyler 1, en uzak bireyler ise 0 ile ifade edilmiştir (Ek 3).

Çizelge 4.4. Karakterlerin istatistik değerleri

Karakter adı	Karakter aralıkları	Karakter değerleri	Karakter adı	Karakter aralıkları	Karakter değerleri
Bitki boyu (cm)	90 ve üzeri	9	Petal leke eni (cm)	3 cm ve üzeri	8
	80-90	8		2.5-3	7
	70-80	7		2-2.5	6
	60-70	6		1.5-2	5
	50-60	5		1-1.5	4
	40-50	4		0.5-1	3
	30-40	3		0.3-0.5	2
	20-30	2		0.3 den küçük	1
	20 den küçük	1	Petal leke boyu (cm)	3 cm ve üzeri	8
Yaprak boyu (cm)	60 ve üzeri	6		2.5-3	7
	50-60	5		2-2.5	6
	40-50	4		1.5-2	5
	30-40	3		1-1.5	4
	20-30	2		0.5-1	3
	20 den küçük	1		0.3-0.5	2
Çiçek sapının kaçınca yapraktan geliştiği	8 ve üzeri	6		0.3 den küçük	1
	7, 7-8	5	Kapsülde Lateks sızması	Var	3
	6, 6-7	4		Nadiren var	2
	5, 4-6, 5-6,	3		Yok	1
	4, 4-5	2	Kapsül tepcük şekli	Düz	6
	3	1		Uçları yukarı doğru içi düz	5
Tomurcuk görünüşü	Eğik	3		Ortası sivri uçları yukarı doğru	4
	Yarı dik	2		Ortası hafif sivri	3
	Dik	1		Dış bükük	2
Brakte durumu ve sayısı	6 ve üzeri	6		İç bükük	1
	4-5, 4-6, 5	5	Kapsül eni (mm)	21 ve üzeri	5
	3-4	4		18-21	4
	2-3	3		15-18	3
	Nadiren 1	2		12-15	2
	Yok	1		12 ve aşağısı	1
Sepal sayısı	3	3	Kapsül boyu (mm)	32 ve üzeri	7
	2-3	2		29-32	6
	2	1		26-29	5
Çiçeklenme zamanı	24.5.03 den sonra	4		23-26	4
	20-24	3		20-23	3
	18-20	2		17-20	2
	17 ve önce	1		17 ve aşağısı	1

Çizelge 4.4. (devam)

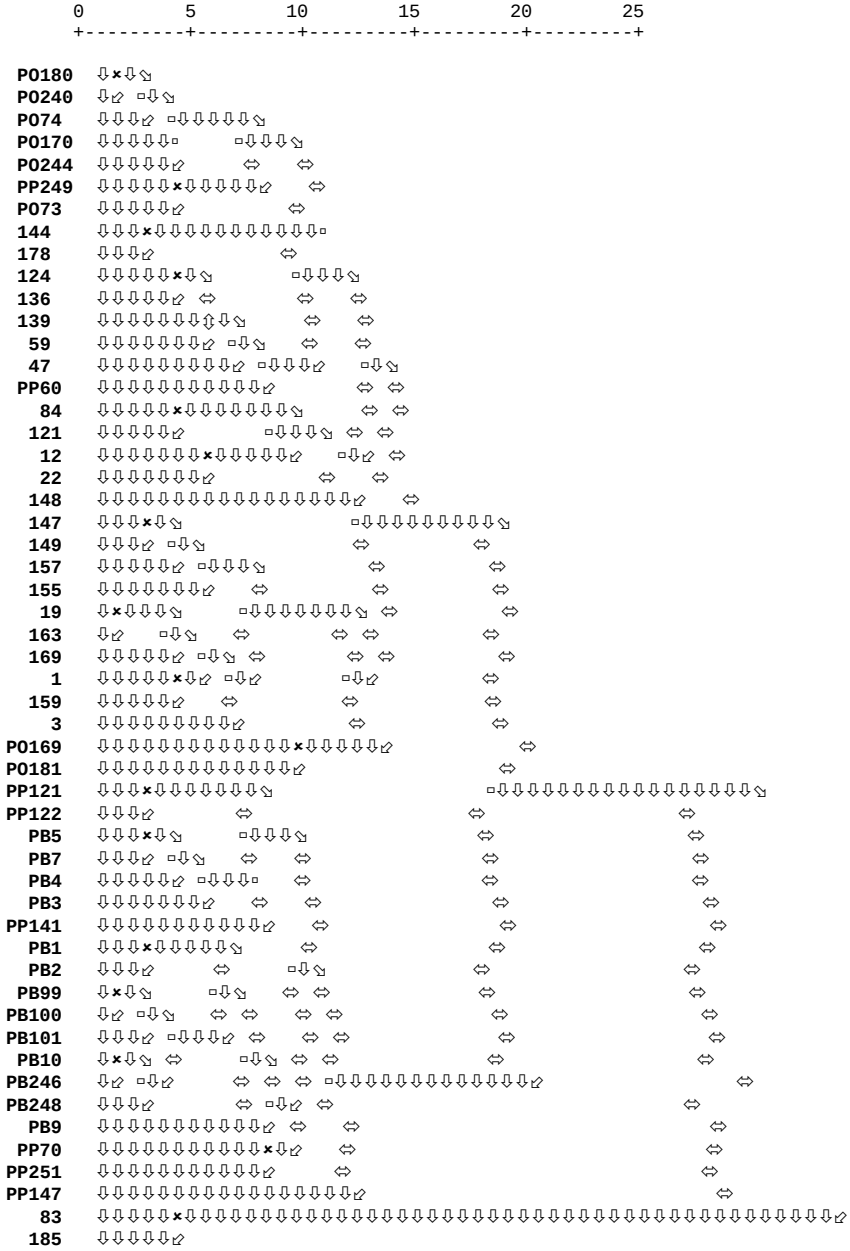
Karakter adı	Karakter aralıkları	Karakter değerleri	Karakter adı	Karakter aralıkları	Karakter değerleri
Petal sayısı	6	3	Petal leke şekli	Tabana kadar	4
	4--5, 4-6	2		Ortada (1cm den büyük)	3
	4	1		Ortada (1 cm den küçük)	2
Petal rengi	Koyu kırmızı	3		yok	1
	Koyu kiremit kırmızısı	2	Kapsülde ışın sayısı	16 ve üzeri	5
	Kiremit kırmızısı	1		14-16	4
Petal eni (cm)	10 ve üzeri	6		12-14	3
	9-10	5		10-12	2
	8-9	4		10 ve aşağısı	1
	7-8	3	Alkaloit durumu	Tebain 2.0 ve üzeri	7
	6-7	2		Tebain 1.5-2.0	6
	6 dan küçük	1		Tebain 1.0-1.5	5
Petal boyu (cm)	8 ve üzeri	5		Tebain 0.5-1.0	4
	7-8	4		Tebain 0.01-0.5	3
	5-7, 6, 6-7	3		Tebain eser	2
	5-6	2		Tebain yok	1
	4-6	1			

4.2.6. İstatistik sonuçlarının değerlendirilmesi

Populasyonların morfolojik karakterlerinin hiyerarşik kümeleme analiz (SPSS 11.0) programında benzerlik düzeylerine göre yapılan analiz (Ek 3) sonucu oluşan dendogramdan (Şekil 4.7) yararlanılarak 2 farklı ana grubun oluştuğu görülmektedir;

I. Ana Grup: 2 alt gruptan oluşmaktadır.

1. Alt Grup: Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *P. Pseudo-orientale* olarak bilinen PP147 kayıt numaralı bitki oluşturmaktadır.
2. Alt Grup: 2 gruptan oluşmaktadır. 1. Grupta kendi arasında 2 kola ayrılmaktadır.



Şekil 4.7. *Oxytona* seksiyonuna ait *Papaver* türlerinde morfolojik ve kimyasal karakterlerin hiyerarşik kümeleme analizi sonucu yapılan dendogramı.

1. Kol Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *P. Pseudo-orientale* olarak bilinen; PP70 ve PP251 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

2. Kol yine Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *Papaver bracteatum* olarak bilinen; PB1, PB2, PB9,

PB10, PB99, PB100, PB101, PB246 ve PB248 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

2. Grup kendi arasında 3 kola ayrılmaktadır.

1. Kol Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *P. Pseudo-orientale* olarak bilinen; PP141 kayıt numaralı bitkiden oluşmaktadır.

2. Kol Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *P. bracteatum* olarak bilinen; PB3, PB4, PB5 ve PB7 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

3. Kol ise Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *P. Pseudo-orientale* olarak bilinen; PP121 ve PP122 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

II. Ana Grup: 2 alt gruptan oluşmaktadır.

1. Alt Grup: Kendi arasında 2 koldan oluşmaktadır.

1. Kol Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *P. orientale* olarak bilinen; PO169 ve PO181 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

2. Kol ise Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu; 1, 3, 19, 147, 149, 155, 157, 159, 163 ve 169 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

2. Alt Grup: Kendi arasında 2 gruptan oluşmaktadır. 1 grup kendi arasında 2 koldan oluşmaktadır.

1. Kol Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu 148 kayıt numaralı bitkiden oluşmaktadır.

2. Kol ise Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu; 12, 22, 84 ve 121 kayıt

numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

2. Grup aralarında 3 kola ayrılmaktadır.

1. Kol Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *Papaver orientale* olarak bilinen; PO60 kayıt numaralı bitki ile Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu; 47, 59, 84, 124 ve 136 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

2. Kol Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu; 157 ve 178 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

3. Kol Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *P. orientale* olarak bilinen; PO73, PO74, PO170, PO180, PO240, PO244 kayıt numaralı bitkiler ile daha önceden *P. Pseudo-orientale* olarak bilinen PP249 kayıt numaralı bitkiden oluşmaktadır.

Morfolojik olarak bitki boyu ve yaprak boyu hariç diğer karakterlerin tespit edilemediği 83 ve 185 kayıt numaralı Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu iki bitki dendogram sonucu oluşan gruplamalar içersine alınmamıştır.

4.3. RAPD Tekniğinin Optimizasyonu

4.3.1. DNA konsantrasyonu optimizasyonu

En basit hücre diyebileceğimiz canlılar bile karmaşık bir yapıya sahip olup çok sayıda molekülden oluşmaktadır. Bu nedenle, öncelikle ilgilenilen molekül grubunu hücredeki diğer kısımlardan ve moleküllerden ayırmak ve daha sonra da yapılacak çalışmaların durumuna göre saflaştırma işlemi yapılması gerekmektedir. Moleküler biyolojideki araştırmalar, büyük ölçüde saflaştırılmış moleküllerle yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Moleküllerin izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen işlemlere ekstraksiyon (çıkarma-ayırma) denmektedir (Temizkan 1999).

DNA hücrede serbest halde bulunan bir molekül değildir. Bazı proteinler (histonlar ve histon olmayan proteinler) DNA ile bir kompleks halinde bulunmaktadır. DNA'nın izolasyonu, değişik organizma gruplarında hatta aynı organizma grubu içerisinde farklılıklar göstermiş olsa da temelde 3 aşamadan oluşmaktadır (Olgun 1999).

- Hücre duvarının parçalanması
- DNA - protein kompleksinin çözülmesi
- DNA' nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrılması

Değişik organizmalardaki yapısal farklılıklar çeşitli izolasyon yöntemlerinin kullanılmasını gerektirmektedir. İzolasyonun başarısı, çoğu kez üzerinde çalışılan organizmanın üretilmesi, yetiştirilmesi ve çoğaltılması aşamaları ile de ilişkisi vardır. Bundan dolayı özellikle bitkilerde erken dönemdeki genç yapraklar izolasyon için uygun bulunmuştur.

Hücre duvarının parçalanmasında ilk aşama duvarın zayıflatılmasıdır. Bu işlem ya fiziksel olarak dondurup-çözme şeklinde ya da lizozim, EDTA gibi kimyasal maddeler uygulayarak yapılmaktadır. Tam parçalama işleminde ise iyonik (SDS) veya iyonik olmayan (Triton X-100) deterjanlar kullanılmaktadır. Bu işlemler sırasında kimyasalların uygulama süreleri her organizmaya göre değişkenlik gösterebildiğinden dolayı farklı protokoller geliştirilmektedir.

DNA-protein kompleksinin çözülmesinde kullanılan yöntem genelde denatürasyona dayanmaktadır. Bu amaçla çoğunlukla fenol/kloroform ekstraksiyon işlemi kullanılır. Fenol/kloroformla proteinler ve DNA fragmentleri denatüre edilerek ortamdan uzaklaştırılmaları sağlanmaktadır.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür. Buna göre, DNA miktarı 145-1700 µg/ml arasında sonuçlanmış olup, saflığı için ise $A_{260/280}$, $A_{260/230}$ ve A_{320} ye bakılarak belirlenmiştir (Şekil 4. 8 ve Çizelge 4.5). Bir optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. Çalışmada izole ettiğimiz DNA çift iplikli olduğundan miktar tayininde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

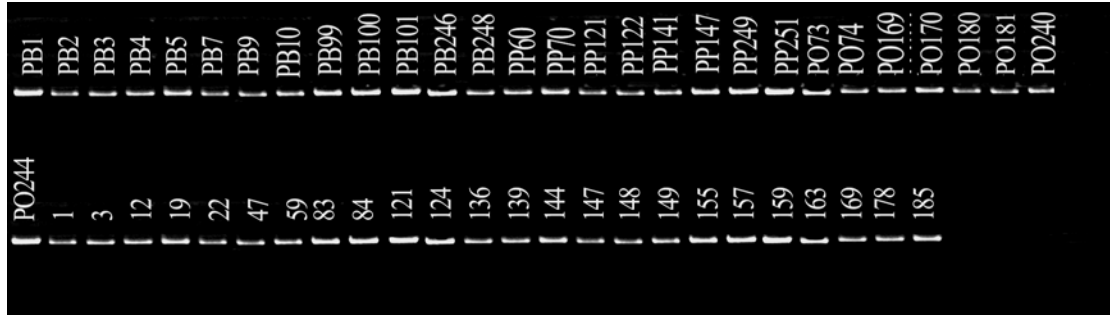
DNA (µg/ml)=260 nm'deki OD (absorbans değeri) x sulandırma oranı x katsayı 50

DNA miktarı ve temizliği Eppendorf marka spektrofotometre (BIOPHOTOMETER) de ölçülmüştür. DNA miktarı RAPD reaksiyonları için 50 ng'a seyreltilmiştir.

260 ve 280 nm'deki değerler arasındaki oran (260/280 OD) nükleik asitlerin temizliği hakkında da fikir vermektedir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1.8 ile 2.00 arasında olmaktadır. Eğer ortamda fenol veya protein bulunuyorsa oran bu değerlerden düşük olarak gerçekleşmektedir (Olgun ve Topal 1999). 260 ve 230 nm'deki değerler arasındaki oran (260/230 OD) ise 2.00 dan büyük olmalıdır. A_{320} ise DNA'nın saflığının bir göstergesi olarak sıfıra yakın olmalıdır (Hillis ve Moritz, 1990). Çalışmada elde edilen değerler Çizelge 4.5 de verilmiştir. Buna göre $A_{260/280}$ değerleri yönünden 1.8 ile 2.00 arasında 30, 1.8 den küçük 18 ve 2.00 den büyük 5 örnek tespit edilmiştir. En küçük değer PP141 nolu örnekte 1.50 iken, en büyük değer 84 nolu örnekte 2.30 olarak gerçekleşmiştir. $A_{260/230}$ değerleri yönünden 2.00 den büyük 24 örnek tespit edilmiş olup, 84 nolu örnekte en yüksek değer 3.10

olarak bulunmuştur. 2.00 den küçük 29 örnek tespit edilmiş olup 1 nolu örnekte en düşük değer 0.95 olarak bulunmuştur. A_{320} değerlerine bakıldığında ise PB3, 47, 59 ve 84 nolu 4 örnekte 0.000 iken diğer örneklerde 0.001-0.048 arasında değişim göstermiştir.

DNA amplifikasyon koşullarının optimizasyonunda DNA miktarının değiştirilmesi elde ettiğimiz bant sayısına, netliğine ya da smear olup olmamasında etkili olmuştur. Yaptığımız çalışmada PCR’da kullanılan 0.2 lik ince cidarlı reaksiyon tüplerinde 10-200 ng genomik DNA kullanılmış olup, en iyi sonuçlar 100 ng (100 ng/25 µl) da alınmıştır (Çizelge 4.6).



Şekil 4. 8. Çalışmada kullanılan genomik DNA’ların agaroz (%1) jeldeki görüntüsü

Çizelge 4.5. Çalışmada kullanılan bitkilere ait protokol numaraları ile birlikte DNA miktar ve saflık değerleri

No	Kütük No	DNA Miktarı µg/ml	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	A_{320}
1	PB1	1010	1.92	2.20	0.004
2	PB2	1150	1.91	2.15	0.002
3	PB3	1290	1.90	2.05	0.000

4	PB4	758	1.75	1.88	0.022
5	PB5	910	1.92	2.03	0.004
6	PB7	505	1.60	2.29	0.030
7	PB9	385	1.70	1.28	0.026
8	PB10	490	1.92	2.00	0.001
9	PB99	860	1.83	1.89	0.019
10	PB100	925	1.70	1.65	0.032
11	PB101	1570	1.80	2.09	0.025
12	PB246	485	1.60	1.24	0.032
13	PB248	535	1.60	1.35	0.032
14	PP60	680	1.93	2.10	0.003
15	PP70	1700	1.89	2.02	0.020
16	PP121	770	1.80	1.70	0.015
17	PP122	760	1.91	2.17	0.005
18	PP141	600	1.50	1.20	0.045
19	PP147	975	1.85	1.75	0.012
20	PP249	1150	1.93	2.20	0.004
21	PP251	850	1.79	1.58	0.020
22	PO73	835	1.60	1.38	0.048
23	PO74	770	1.80	1.60	0.018
24	PO169	1580	1.85	1.95	0.021
25	PO170	460	1.79	1.75	0.018
26	PO180	700	1.60	1.30	0.042
27	PO181	1350	1.75	1.74	0.038
28	PO240	745	1.60	1.34	0.037
29	PO244	720	1.90	2.10	0.001
30	1	150	1.92	0.95	0.014
31	3	360	1.82	1.75	0.010
32	12	296	1.71	1.97	0.014
33	19	520	1.75	2.16	0.018
34	22	440	1.74	1.97	0.015
35	47	660	1.99	2.47	0.000
36	59	410	2.03	2.10	0.000
37	83	825	1.94	2.03	0.002
38	84	175	2.30	3.10	0.000
39	121	145	2.18	2.17	0.003
40	124	150	2.05	2.25	0.004
41	136	160	2.10	2.39	0.004
42	139	210	1.87	1.90	0.006
43	144	230	1.97	2.00	0.005
44	147	295	1.99	2.05	0.002
45	148	690	1.91	2.18	0.008
46	149	200	2.10	2.08	0.006
47	155	690	1.80	1.98	0.017
48	157	380	1.82	1.90	0.017
49	159	510	1.82	1.79	0.019
50	163	450	1.80	1.75	0.019
51	169	340	1.80	1.70	0.020
52	178	200	1.79	1.50	0.021
53	185	215	1.74	1.31	0.025

Çizelge 4.6. PCR amplifikasyonu için döngü parametrelerinin optimizasyonu

PCR için reaksiyon karışımı	Test edilen reaksiyon birimi	Test edilen reaksiyon biriminin Konsantrasyonu	Sonuçlar
-----------------------------	------------------------------	--	----------

MgCl ₂ (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 ve 6 µl) Primer (1 ve 2 µl) dNTP (1 ve 2 µl) Taq pol. (0.5, 1 ve 1.5 µl) 10 x buffer 2.5 µl	DNA	10 ng 20 ng 30 ng 40 ng 100 ng 150 ng 200 ng	Amplifikasyon yok Amplifikasyon yok Amplifikasyon yok Amplifikasyon çok az Amplifikasyon iyi Belirgin olmayan bantlar Belirgin olmayan bantlar ve smear oluşumu
2 µl DNA Primer (1µl) dNTP (2 µl) Taq pol. (1 µl) 10 x buffer 2.5 µl	MgCl ₂	1.5 µl 2.5 µl 3.5 µl 4.5 µl 6 µl	Amplifikasyon yok Amplifikasyon çok az Amplifikasyon iyi Amplifikasyon iyi Amplifikasyon iyi ancak smear bant oluşumu
MgCl ₂ (1.5, 2.5, 3.5 4.5, 6 µl) Primer (1, 2 µl) dNTP (1, 2 µl) Taq pol. (0.5, 1, 1.5 µl) 10 x buffer 2.5 µl	dNTP	1 µl 2 µl	Bant oluşumu silik Amplifikasyon iyi
MgCl ₂ (1.5, 2.5, 3.5 4.5, 6 µl) dNTP (1, 2 µl) Taq pol. (0.5, 1, 1.5 µl) 10 x buffer 2.5 µl	Primer	1 µl 1,5 µl 2 µl	Amplifikasyon iyi Amplifikasyon iyi Silik bant oluşumu
MgCl ₂ (1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 6 µl) Primer (1, 2 µl) dNTP (1, 2 µl) Taq pol. (0.5, 1, 1.5 µl) 10 x buffer 2.5 µl	Taq polimeraz	0.5 U 1 U 1.5 U	Amplifikasyon yok Amplifikasyon iyi Amplifikasyon iyi
2 µl DNA Primer (1µl) dNTP (2 µl) Taq pol. (1 µl) MgCl ₂ (3,5)	10 x buffer	2 µl 2.5 µl 3.5 µl	Amplifikasyon yok Amplifikasyon iyi Amplifikasyon var

4.3.2. MgCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu

MgCl₂' ün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu değişebilmekle birlikte genellikle 0.5-5.0 mM'lık değerler arasında çalışmaktadır. Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar. Polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini artırır. Ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlamaktadırlar. Bu nedenle MgCl₂' ün PCR' ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1.0-1.5 mM'lık değerler tercih edilmektedir. Düşük Mg⁺² konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg⁺² konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açmaktadır. MgCl₂ içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca MgCl₂ kullanımına gerek yoktur. Eğer tampon MgCl₂ içermiyorsa, hazır olarak elde edilen 25 mM konsantrasyondaki MgCl₂ solüsyonu Arı (1999)' nın ifade ettiği gibi ayrıca sulandırma yapmadan final konsantrasyonu 2.5 mM olacak şekilde uygun miktarda reaksiyon karışımına eklenmektedir.

MgCl₂ konsantrasyonu amplifikasyon ürünlerinin sayısını ve parlaklığını etkilemiştir. Düşük konsantrasyonlu MgCl₂ bantların silik ve kısmen az sayıda oluşumuna etki ederken, yüksek konsantrasyonlu MgCl₂ spesifik olmayan (non-spesifik) bantların görülmesine neden olmuştur.

Çalışmada MgCl₂ 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 ve 6.0 µl şeklinde kullanılmış olup, en iyi sonuçlar 3.5 ve 4.5 µl'lik konsantrasyonlarda alınmış ve 3.5 µl'lik konsantrasyon kullanılmıştır (Çizelge 4.6).

4.3.3. Primer konsantrasyonu optimizasyonu

Primer seçimleri daha önceden öncelikli olarak *Papaver* türlerinde çalışılmış olanları daha sonra da genel olarak yaygın olan primer setleri tercih edilmiştir. Primer konsantrasyonun belirlenmesi için yapılan çalışmalarda stok solusyondan her µl'sinde 10 mer'lik primerden 200 ng olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu stok solusyondan 1, 1.5 ve 2 µl kullanılarak bant oluşumları gözlenmiştir (Çizelge 4.6). En iyi sonuç 1 ve 1.5 µl de alınmış olup, 1 µl (1 µl/ 25 µl) kullanılmıştır.

Primerlerin Tm sıcaklıklarının da optimizasyonu Biometra Tgradient (TG) PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada Tm sıcaklığının +5 ve -5 °C aralıkları denenerek en ideal yapışma (annealing) sıcaklığı tesbit edilmiştir (Çizelge 4.7). Yapışma sıcaklığı başlatıcı DNA olan primerin kalıp DNA' ya yapışması için gerekli olan sıcaklığı ifade etmektedir.

Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan primerler ve optimize edilen sıcaklıkları

	Çalışılan Primerler	%GC oranları	Optimize Edilen Sıcaklık Değerleri (°C)
1	OPA-03 5'-AGTCAGCCAC-3'	60	32
2	OPA-04 5'-AATCGGGCTG-3'	60	32
3	OPA-07 5'-GAAACGGGTG-3'	60	32
4	OPF-04 5'-GGTGATCAGG-3'	60	32
5	OPF-05 5'-CCGAATTCCC-3'	60	32
6	OPF-06 5'-GGGAATTCGG-3'	60	32
7	OPF-08 5'-GGGATATCGG-3'	60	32
8	OPO-02 5'-ACGTAGCGTC-3'	60	32
9	OPO-04 5'-AAGTCCGCTC-3'	60	32
10	OPO-19 5'-GGTGCACGTT-3'	60	32
11	UBC-238 5'-CTCTCCAGCA-3'	60	32
12	P-123 5'-GGGATTCGAC-3'	60	32
13	P-166 5'-GTGACGGACT-3'	60	32
32	P-437 5'-CGGATCGACA-3'	60	32
15	P-443 5'- GGC GTG ATA G -3'	60	32

4.3.4. dNTP konsantrasyonunun optimizasyonu

Çalışmada dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'den oluşan dNTP karışımından (Promega) μl 'sinde 200 μM dNTPs olacak şekilde ayarlanan stok solusyondan 1 ve 2 μl çekilerek denemeler yapılmış olup, en iyi sonuç 2 μl dNTPs kullanılarak yapılan çalışmalardan alınmıştır. 1 μl dNTPs kullandığımızda silik bantlar oluşmuştur (Çizelge 4.6).

4.3.5. Taq DNA polimeraz konsantrasyonunun optimizasyonu

Çalışmada Taq DNA plimeraz (Promega) (5U/ μl)'dan 0.5, 1 ve 1.5 ünite enzim test edilmiş olup, en iyi sonuç 1 ve 1.5 U enzim kullanılarak yapılan çalışmalardan alınmıştır. Benzer sonuçlar alınmasından dolayı 1 U enzim tercih edilmiştir. 0.5 U Taq DNA plimeraz kullandığımızda amplifikasyon tespit edilememiştir (Çizelge 4.6).

4.3.6. 10x Taq Tamponu konsantrasyonunun optimizasyonu

Çalışmada kullanılan 10X buffer Taq Polimeraz enzimi (Ek 1) ile birlikte gelmiştir. Reaksiyonda 10x bufferdan 25 μl her tüp için 2, 2.5 ve 3.5 μl olacak şekilde kullanılmıştır. En iyi sonuçlar 2.5 μl kullanılarak yapılan çalışmalardan alınmıştır. 2 μl tampon kullandığımızda amplifikasyon olmamıştır (Çizelge 4.6).

4.3.7. PCR koşullarının optimizasyonu

Matematiksel olarak amplifikasyon ($2^n - 2n$) X formülü ile ifade edilebilir, n = Döngü sayısı, 2n = Birinci ve ikinci döngü sonucunda oluşan boyları bilinmeyen ürünler.

X = Orijinal kalıbın kopya sayısı

Potansiyel olarak her döngünün % 100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin çalışmamızda kullandığımız 60 döngü sonucu 2^{60} kat ürün meydana gelir.

PCR'ın temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, Taq DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, Taq DNA polimeraz tamponu ve MgCl_2 'dür.

Termostabil DNA polimerazlar ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen PCR aletlerinin (thermalcycler) kullanıma sunulması, PCR'ın verimi ve kullanımında önemli gelişmelere yol açmıştır. Verimli bir PCR için;

1. Denatürasyon,
2. Primerin bağlanması,
3. Primerin uzaması,
4. Döngü sayısı ve
5. PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir.

PCR döngüsü ve süresi optimize edilmek amacı ile Shoyama vd (1998)'nin kullandığı Çizelge 4. 8 de ki döngü parametreleri kullanılmıştır. Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, primer, Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarları, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı gibi thermalcycler parametreleri DNA amplifikasyonunu etkilemektedir. Bundan dolayı kritik parametreler RAPD çalışmalarına başlamadan önce optimize edilmiştir. Buna göre; 94 °C ---15 saniye, 32 °C ---30 saniye ve 72 °C ---60 saniye şeklinde 60 döngüye tamamlanmıştır. 60 döngü sonunda 72 °C ---8 dakika bekletilerek sentezi tamamlanamayan amplifikasyon ürünlerinin sentezi tamamlaması amaçlanmıştır. Cihazdaki işlemin bitiminden sonra bekleme sıcaklığı olarak da 4 °C tercih edilmiştir. Denenen bu parametreler sonucunda uygun amplifikasyon ürünleri elde edilmiş olup, çalışmalarda bu koşullar kullanılmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Optimize edilen reaksiyon karışımlar ve PCR koşulları

Reaksiyon parametreleri	25 µl Reaksiyon Ortamında Bulunan Miktar	PCR Döngü Parametreleri
Genomik DNA	100 ng (100 ng/25 µl= 4 ng)	94 °C ---15 saniye 32 °C ---30 saniye 72 °C ---60 saniye } 60 döngü 72 °C -----8 dk 4 °C -----bekleme sıcaklığı
10X Taq Tamponu	2.5 µl	
MgCl ₂	3.5 µl	
dNTPs	400 µM	
Primer	200 ng (200 ng/25 µl= 8 ng)	
Taq Polimeraz	1 Unite (0.3 µl)	
ddH ₂ O	13.7 µl	

4.3.8. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür (Maniatis vd 1989).

Ticari olarak üretilen agarozların saflık dereceleri farklı olabildiğinden dolayı DNA'nın göç hızını etkimektedir. Agaroz konsantrasyonu % 0.5-2 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilmektedir. Böylece, küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanabilmektedir.

DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber tüm laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir. Yöntemin avantajları basit ve hızlı olması, ayrıca diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayrılamayan DNA fragmentlerinin ayrılabilmesini sağlamasıdır. UV ışığı altında fluoresan etki gösteren etidyum bromüd (EB) boyasının kullanımı ile, çok düşük konsantrasyonlarda (1-10 ng) olsa bile, DNA'nın jel üzerindeki yerini belirlemek mümkündür (Olgun ve Topal 1999).

DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanmaktadır. Bu göç hızı moleküllerin büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir (Sombrook vd 1989).

DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromüdün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu flüoresan etki göstermesi ile gerçekleşmektedir. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir.

4.4. RAPD Polimorfizmi ve Genetik Mesafenin Tespiti

RAPD bandları 1 ve 0 olarak kayıt edilmiş olup, '1' bandın varlığını '0' ise bandın yokluğunu göstermektedir (Ek 4) . Materyaller arasındaki genetik mesafe POPGENE32 versiyon 1.32 (Population Genetic Analysis) ve MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programları ile analiz edilmiştir. Programdaki genetik benzerlik ve genetik mesafe Nei (1972, 1979) formülüne dayanmaktadır.

Çalışmada test edilen 45 primerden (Çizelge 3.2) 15 tanesi (Çizelge 4.7) *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde çalışmıştır. Çalışan 15 primerin ortalama polimorfizm oranı yüksek seviyede olup, % 85.42' dir (Çizelge 4.9). Çalışmada kullanılan 15 primerden 14 tanesi polimorfik sonuç vermiştir. En yüksek polimorfizm oranını ise OPF-08, OPO-19, P-123, P-443 ve UBC-238 primerlerinde görülmüş olup, tamamen polimorfik bantlar üretmişlerdir.

Çalışmada kullanılan primerler ve polimorfik bant oluşumu

OPA03 primeri: 5'-AGTCAGCCAC-3' dizisine sahip olan OPA03 primeri 1300-450 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 5 olup, bantlardan 2 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.9. RAPD sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları

Primer Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm oranı (%)
------------	--------------------	------------------------	-----------------------

OPA-03	5	3	60
OPA-04	5	4	80
OPA-07	6	4	66.6
OPF-04	10	7	70
OPF-05	3	2	66.6
OPF-06	9	7	77.7
OPF-08	7	7	100
OPO-02	8	7	87.5
OPO-04	5	4	80
OPO-19	8	8	100
P-123	6	6	100
P-166	1	-	-
P-437	11	10	90
P-443	5	5	100
UBC-238	7	7	100
Toplam	96	81	85.42

OPA04 primeri: 5'-AATCGGCTG-3' dizisine sahip olan OPA04 primeri 750-300 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 5 olup, bantlardan 1 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.10).

OPA07 primeri: 5'-GAAACGGGTG-3' dizisine sahip olan OPA07 primeri 1400-300 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 6 olup, bantlardan 2 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.11).

OPF04 primeri: 5'-GGTGATCAGG-3' dizisine sahip olan OPF04 primeri 1300-450 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 10 olup, bantlardan 3 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.12).

Şekil 4. 9. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPA03 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 10. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPA04 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 11. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPA07 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 12. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF04 primerine ait RAPD bant profilleri.

OPF05 primeri: 5'-CCGAATTCCC-3' dizisine sahip olan OPF05 primeri 600-400 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 3 olup, bantlardan 1 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.13).

OPF06 primeri: 5'-GGGAATTCGG-3' dizisine sahip olan OPF06 primeri 1300-300 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 9 olup, bantlardan 2 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.14).

OPF08 primeri: 5'-GGGATATCGG-3' dizisine sahip olan OPF08 primeri 1700-300 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 7 olup, bütün bantlar polimorfik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

OPO02 primeri: 5'-ACGTAGCGTC-3' dizisine sahip olan OPO02 primeri 1300-300 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 8 olup, bantlardan 1 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.16).

OPO04 primeri: 5'-AAGTCCGCTC-3' dizisine sahip olan OPO04 primeri 1000-475 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 5 olup, bantlardan 1 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.17).

OPO19 primeri: 5'-GGTGCACGTT-3' dizisine sahip olan OPO19 primeri 1000-400 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 8 olup, bütün bantlar polimorfik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.18).

P123 primeri: 5'-GGGATTCGAC-3' dizisine sahip olan P123 primeri 1000-400 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 6 olup, bütün bantlar polimorfik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.19).

Şekil 4. 13. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF05 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4.14. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF06 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 15. Oxytona seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPF08 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 16. Oxytona seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPO02 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 17. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPO04 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 18. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan OPO19 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 19. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan P123 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 20. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan P166 primerine ait RAPD bant profilleri.

P166 primeri: 5'-GTGACGGACT-3' dizisine sahip olan P166 primeri 1100 bp (baz çifti) seviyesinde bantlaşma göstermiştir. Bir tane monomorfik bant tespit edilmiştir (Şekil 4.20).

P437 primeri: 5'-CGGATCGACA-3' dizisine sahip olan P437 primeri 1000-450 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 11 olup, bantlardan 1 tanesi monomorfik, diğer bantlar polimorfiktir (Şekil 4.21).

P443 primeri: 5'- GGC GTG ATA G -3' dizisine sahip olan P443 primeri 1400-300 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 5 olup, bütün bantlar polimorfik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.22).

UBC238 primeri: 5'-CTCTCCAGCA-3' dizisine sahip olan UBC238 primeri 1400-300 bp (baz çifti) aralığında bantlaşma göstermiştir. En fazla oluşan bant sayısı 5 olup, bütün bantlar polimorfik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23).

Şekil 4. 21. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan P437 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 22. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan P443 primerine ait RAPD bant profilleri.

Şekil 4. 23. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde kullanılan UBC238 primerine ait RAPD bant profilleri.

Çalışmada POPGENE32 versiyon 1.32 ve MEGA3 istatistik programları ile genetik benzerlik ve uzaklık matrisinden (Ek 4) yararlanarak elde edilen dendogramda polimorfizm oranı %85.42 olarak tespit edilmiştir. Birbirine en yakın genetik mesafe 0.0535 ile *Papaver bracteatum*'a ait PB5 nolu örnek ve PB7 arasında iken, en uzak genetik mesafe 0.5754 ile *P. orientale*' ait PO181 nolu örnek ve 185 nolu örnek

arasında tespit edilmiştir. İncelenen populasyonlar genel olarak iki ana grup altında toplanmaktadır (Şekil 4.24). Bunlar;

A. I. Grup: 2 alt gruptan oluşmaktadır.

I. Alt grup: 136 ve 144 kayıt numaralı Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu iki bitkiden oluşmaktadır.

II. Alt grup kendi arasında 2 koldan oluşmaktadır.

I. Kol: Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *Papaver orientale* olarak bilinen PO240 kayıt numaralı bitki ile Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu 19 kayıt numaralı bitkiden oluşmaktadır.

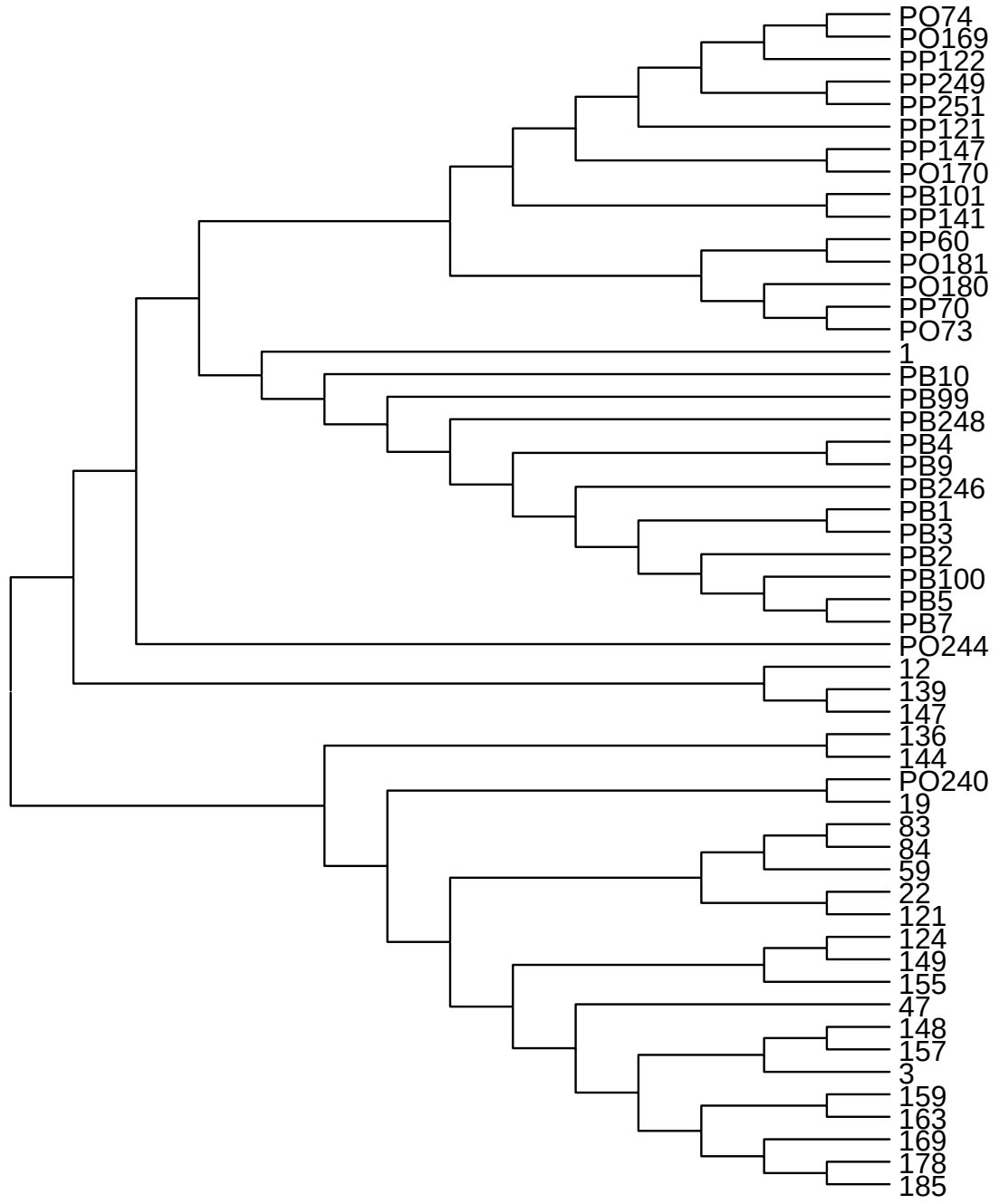
II. Kol: Doğu Anadolu materyallerinin bulunduğu 3, 22, 47, 59, 83, 84, 121, 124, 148, 149, 155, 157, 159, 163, 169, 178, 185 kayıt numaralı bitkiden oluşmaktadır.

B. II. Grup: 2 alt gruptan oluşmaktadır.

I. Alt grup: 12, 139 ve 147 kayıt numaralı doğu anadolu materyallerinin bulunduğu 3 bitkiden oluşmaktadır.

II. Alt grup: 2 alt koldan oluşmaktadır.

I. Kol: Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan



Şekil 4. 24. *Oxytona* seksiyonuna ait türlerde RAPD analizi sonucu oluşan dendrogram (Neighbor-Joining (NJ) Nei 1972 ve 1979' göre)

ve daha önceden *Papaver orientale* olarak bilinen PO244 kayıt numaralı bitkiden oluşmaktadır.

II. Kol: 2 alt koldan oluşmaktadır.

I. Alt kol: Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *Papaver bracteatum* olarak bilinen PB1, PB2, PB3, PB4, PB5, PB7, PB9, PB10, PB99, PB100, PB246 ve PB248 kayıt numaralı bitkiler ile doğu anadolu materyallerinden olan 1 kayıt numaralı bitkiden oluşmaktadır.

II. Alt kol: Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında bulunan ve daha önceden *Papaver bracteatum* olarak bilinen PB101, *P. orientale* olarak bilinen PO73, PO74, PO169, PO170, PO180, PO181 ve *P. pseudo-orientale* olarak bilinen PP60, PP70, PP121, PP122, PP141, PP147, PP249 ve PP251 kayıt numaralı bitkilerden oluşmaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Morfolojik Çalışmalar

Oxytona seksiyonuna ait bütün türler çok yıllık olup, her yıl rozet oluşturlar. Pinnat ve dişli yapraklı bir yapıdadırlar. Ana yaprakların yaprak sapı (petiol) uzun olup, tüm yaprakları çok hücreli beyaz tüylerle kaplıdır. Yapraklar ve çiçek sapları hemen hemen her sene aynı zamanda gelişmektedir. Önce yapraklar gelişme göstermekte ve daha sonra çiçek sapı uzamaktadır. Çiçek sapıda yapraklar gibi çıkışta basit ve yoğun beyaz tüylerle kaplıdır. Her sapta tek çiçek ve birçok kaolin yaprak bulunmaktadır. Yaprakların yerleşimi Goldblatt (1974)' e göre Taxonomik olarak önemlidir. Yapraklar *P. bracteatum* ve *P. pseudo-orientale*' de yukarılara, ya da çiçek sapının üçte birden (1/3) daha üstlerde bulunabilmektedir. Ancak bizim çalışmamızda bu dikkate alınmamıştır. Çiçekten hemen önceki yapraklar kaolin (gövde) yapraklar olarak kaydedilmiştir. Çiçekten hemen önceki bu kaolin yaprak *P. bracteatum* türünde vardır. *P. pseudo-orientale* türüne ait bitkilerde ise durum farklıdır. Bazı bitkilerde bu yapraklar bulunurken, bazılarında yoktur. Bu durum literatür bilgileri ile tamamen uygunluk içersindedir (Goldblatt 1974). *P. orientale* de ise kapsüle yakın olarak bulunan gövde yaprakları olarak bilinen kaolin yapraklar bulunmamaktadır.

P. bracteatum *Oxytona* seksiyonun temsilcisi olup, morfolojik özellikleri en büyük olan türdür. Brakte sayısı 2 (PB248) ile 8 arasında değişmekte olup, büyük koyu kırmızı çiçekli ve bütün makroskobik özellikler belirgindir. Bu durum Goldblatt (1974)' ın brakte sayısını 3-8 arasında bulunur ifadesi ile uygunluk göstermektedir. *P. pseudo-orientale* olarak incelediğimiz 8 bitkiden bir tanesinde (PP60) brakte bulunmazken, diğer yedi bitkide 2-4 arasında değişen brakteler tespit edilmiştir. Bu durum Goldblatt (1974), Philipson vd (1981), Davis (1988) ve Mihalık (1998) tarafından da ifade edilmiştir. Eğer brakteler teşhis için kullanılacaksa bazen *P. pseudo-orientale* ile *P. bracteatum* karıştırılabilmektedir. Çünkü *P. bracteatum* ve *P. pseudo-orientale* türlerinin her ikisinde de brakteler bulunabilmektedir. Her ikisinde de brakteler kaliks dışında tomurcuklara yakın yerlerde bitişik durumdadır. Bundan dolayı çalışmada *P. pseudo-orientale*' yi 3 farklı kapsül-brakte yapısıyla belirleyerek yapısal farklılığa

dikkat çekilmiştir. *P. orientale* de brakte bulunmamaktadır. Doğu Anadolu bölgesinden toplanan bitkilerde ise 3 bitkide (148, 149 ve 155) nadiren bulunmakta ve diğerlerinde bulunmamaktadır. Çiçeklenme döneminde brakteler düşmez. Braktelerin düşmemesi kuru kapsüllerde braktelerin varlığından dolayı yanlış teşhislere yol açmakta olup, türün ismine doğruluğu daha sonraki çalışmalarda sorunlar oluşturmaktadır. Çünkü birçok araştırmacı brakte varlığına bakarak *P. bracteatum* diye topladığı bitkinin gerçekte *P. bracteatum* mu yoksa *P. pseudo-orientale* mi olduğunu kontrol edememektedir. Carolan vd (2002) nin yapmış olduğu çalışmada *P. bracteatum* diye aldıkları tohumların *in vitro* rejenerasyonu sonrası yapılan alkaloit analizinde tamamen *P. pseudo-orientale* alkaloitleri olarak belirlediklerini, bunu da tohum orijinine mi yoksa rejenerasyonda meydana gelen varyasyonlardan mı kaynaklandığının bilinemediğini ifade etmektedirler.

P. bracteatum’ da kaliks tüyleri sık ve üstten basık bir şekilde görülürken, diğer türlerde bu derece de net bir görünüm yoktur. Seyrek ve dik görünümlü olabilirler. Özellikle *P. pseudo-orientale* de varyasyon vardır. Tomurcuklar *P. bracteatum*’ de dik, *P. orientale*’de eğik ve *P. pseudo-orientale* de ise durum yine dik, eğik ve yarı dik (PP60) şeklinde varyasyon göstermektedir. *P. pseudo-orientale*’ de Goldblatt (1974) e göre dik ve eğik olabilirken, Philipson vd (1981), Özhatay vd (1989) ve Mihalık (1998) a göre dik görünümlüdür. Açmaya yakın zamanda *P. bracteatum* tomurcukları oblong olarak görülür. Diğer türlerde tomurcuk genellikle ovaldir.

Normal olarak gelişen çiçeklerde sepal sayısı 2 ile 3 arasında değişmekte olup (Çizelge 4.1), *P. bracteatum*’ da 3, *P. pseudo-orientale* de 2-3 ve *P. orientale*’de yine 2-3 arasında değişmektedir. Tespit etmiş olduğumuz sepal sayısı; Goldblatt (1974)’ e göre *P. bracteatum*’ da genelde 3, *P. pseudo-orientale*’ de 2-3; Philipson vd (1981)’ nin *P. orientale*’ de 2, *P. pseudo-orientale*’ de 2-3; Cullen (1988) *P. pseudo-orientale*’ de 2-3 ifadeleri ile uygunluk göstermektedir.

Petaller 4-6 olarak bulunmaktadır. *P. bracteatum*’da 6, *P. pseudo-orientale* ve *P. orientale*’de 4-6 arasında değişmektedir. Sepal ve petallerin sayısı görüldüğü gibi *P. bracteatum*’da fazla olup, diğer iki türden farklılık arzetmektedir. Ancak bu durumun

dış şartlardan etkilendiği Goldblatt (1974) tarafından ifade edilmektedir. Seksiyona ait türleri teşhis için en iyi dönem petallerin bitki üzerinde bulunduğu vejetatif dönemdir. Çünkü çiçek rengi ve lekeler bitkiyi doğru teşhis etmek için gerekli olan tanımlayıcı özelliklerin en fazla bulunduğu dönemdir. Birçok araştırmacı bu durumu bu şekliyle net ifade etmemiş olsa bile türler arası sorunlu olabilecek sonuçların belirlenebilmesinde vejetatif özelliklerin hepsinin gözlemlenmesinin önemini kısmen de olsa vurgulamaktadırlar (Goldblatt 1974, Philipson vd 1981, Davis 1988 ve Mihalık 1998). Diğer taraftan Özhatay vd (1989) bu özellikleri değerlendirirken varyasyonu türler arası farklılıkta değil de sadece *P. pseudo-orientale* içerisinde ele almışlardır. Bizim çalışmamız doğrultusunda bu yaklaşımın doğru olmadığı kanaati oluşmuştur. Çünkü her türün çiçek renklerinde ve petal lekelerinde değişiklik vardır. *P. bracteatum*'da ki petaller koyu kırmızı ve üzerinde siyaha yakın lekeler tabana kadar uzamakta yada ortada bulunmaktadır. *P. pseudo-orientale*'nin petalleri kiremit kırmızısı ya da koyu kiremit kırmızısıdır. *P. pseudo-orientale*' de lekeler çok varyasyon göstermektedir. Petaller üzerinde dikdörtgen şeklindeki leke ortada bulunmaktadır. İncelenen bitkilerden bir tanesinde tabana kadar leke tespit edilmiştir. Goldblatt (1974) bazı şartlarda *P. pseudo-orientale* petallerinde lekeler bulunmadığını belirtirken, Cullen (1965-1988) ve Philipson vd (1981) *P. orientale*'lerde bile lekelerin bulunabileceğini belirtmektedirler. Bu durumda bitkileri tayin etmek için diğer özelliklerini görmek önem taşımaktadır. İncelediğimiz *P. orientale* türüne ait bitkilerin bir tanesinde ortada yine bir tanesinde tabana kadar lekenin varlığı tespit edilmiştir. Bu durumda Cullen (1965-1988) ve Philipson vd (1981) ni doğrulamaktadır. Ya da *P. orientale* olarak incelediğimiz bu bitkiler gerçekte *P. orientale* değildir. Petalleri kiremit kırmızısı olup bazılarının üzerinde soluk ya da sarı mavi lekelerin bulunabileceği *P. orientale*'ler Türkiye'nin kuzeyinde yaygın olarak dağılım gösterdiği Goldblatt (1974) tarafından bildirilmektedir. Ancak Rezaei-Osalou (2004) çalışmasında Türkiye'nin kuzey doğu bölgelerinden 66 lokalite içersinden bir lokalitede 28 kromozomlu *P. orientale* türünü kaydetmiştir.

Ovaryum büyüklüğü, stigma ışın sayısı ve kapsül tepe şekli tür teşhisinde önemlidir. Bu özellikler değişmekte olup, *P. bracteatum*' da kapsül boyu 39.81 mm ye kadar uzarken stigmatik ışın sayısı da en fazla 17 ye kadar çıkmaktadır. *P. pseudo-orientale*' de kapsül boyu 31.11 mm ve stigmatik ışın sayısı en yüksek 16 olarak tespit edilmiştir.

P. orientale' de ise kapsül boyu 26.92 mm ve stigmatik ışın sayısı en yüksek 13 olarak tespit edilmiştir. Buna göre *P. bracteatum*' daki ovaryum en büyük olup ışın sayısı en fazla iken, *P. pseudo-orientale*'deki ovaryum ve ışınlar diğer iki türün arasında, sayısı en az ve en küçük olan *P. orientale*' dir. Kapsül büyüyünce ölçüm değişiklikleri devam etmektedir. Seçmen vd (1995)' nin *Papaver* cinsindeki stigmatik ışın sayısını 4-20 arasında, Philipson vd (1981) ise *P. pseudo-orientale* ve *P. orientale* türlerinde 10-25 arasında olabileceğini ifade etmektedirler. İncelemiş olduğumuz bitkilerde kapsül tepe şekli olarak ele aldığımız stigmatik ışınlar *P. bracteatum*' da 4, *P. pseudo-orientale* ve *P. orientale* ise 3 farklı varyasyon göstermiştir. Goldblatt (1974)' a göre *P. bracteatum*' da şekil bozulmakta olup, disk genel olarak ya konik ya da konkav şeklini almaktadır. Kapsül sertleşmekte olup, olgunlaşınca odunlaşmaktadır.

Oxytona seksiyonundaki türlerde ismine doğruluk tam olarak netleşemediğinden araştırma yapan ekipler arasında farklı görüşler olduğu gibi farklı yıllarda araştırma yapan aynı gruplarda dahi farklı ifadeler vardır. Bunlar arasında Öztekin vd (1985), Ojala ve Rousi (1986), Milo vd (1986,1988, 1989 ve 1990), Özhatay vd (1989), Ojala vd (1990) ve Levy ve Milo (1991) sayılabilir. Bunun sebebi kanaatimizce kromozom sayısı fazla olması ve genetik potansiyeli daha yüksek olmasından dolayı *P. pseudo-orientale* türünün çok geniş bir varyasyon göstermesi olabilir.

Çalışmada kullandığımız 3 tür bitkiye ait 20 farklı morfolojik karaktere dayalı olarak ilk kez bir istatistik programı kullanılarak tür teşhisine daha detaylı çözümler getirilmeye çalışılmıştır. SPSS 11.0 paket programına göre yapılan benzerlik matrisinde 1 benzerlik, 0 farklılık düzeyi olarak ifade edilmiştir. PB99 nolu örnek ile PB100 nolu örnek arasındaki genetik yakınlık en fazla olup 0.958 olarak bulunmuştur. Yine genetik olarak akrabalığı en yakın ikinci grup 0.950' lik seviyesiyle PB10 nolu örnek ile PB246 nolu örnek arasında gerçekleşmiştir. *P. bracteatum*' a ait bitkilerde en uzak genetik mesafe PB3 nolu örnek ile PB9 nolu örnek arasında 0.501 olarak gerçekleşmiştir. Buna göre daha önceden *P. bracteatum* olarak tespit edilen bitkiler birbirine diğer türlerden daha yakın bulunmuştur. *P. pseudo-orientale* olarak tespit edilen bitkilerde birçok karışıklık mevcuttur. Bunlardan PP147 nolu örnek çok genel olarak 1. grupta ayrılırken,

PP249 nolu örnek en dar anlamda *P. orientale* ile grup oluşturmuştur. PP60 nolu örnek ise Doğu Anadoludan toplanan örneklerle grup oluşturmuştur. Diğer yandan *P. pseudo-orientale* olarak incelemeye alınan bitkiler ikiden fazlası bir araya gelerek gruplaşmamıştır. Genetik akrabalık olarak birbirine en yakın *P. pseudo-orientale*' ye ait bitkilerden PP121 nolu örnek ile PP122 nolu örnek 0.887 genetik mesafe ile en yakın bulunurken, 0.319 genetik mesafe ile PP60 nolu örnek ile PP141 nolu örnek en uzak akraba olarak tespit edilmiştir. Buradan da anlaşılabileceği üzere *P. pseudo-orientale*' de varyasyon çok geniştir. *P. orientale* olarak tespit edilen türler çoğunlukla kendi aralarında grup oluşturmuşlardır. Ancak PO169 ve PO181 nolu iki örnek Doğu Anadolu örnekleri ile grup oluşturmuştur. Genetik olarak birbirine en yakın *P. orientale*' ye ait bitkilerden PO180 nolu örnek ile PO240 nolu örnek 0.943 genetik mesafe ile en yakın bulunurken, 0.417 genetik mesafe ile PO160 nolu örnek ile PO170 nolu örnek en uzak akraba tespit edilmiştir. Doğu Anadoludan toplanan örneklerde genelde iki grupta toplanmışlardır. Bu durum tür bazında birbirlerine yakın oldukları anlamına gelmektedir. Genetik akrabalık olarak birbirine en yakın Doğu Anadoludan toplanan örneklerle ait bitkilerden 19 nolu örnek ile 163 nolu örnek 0.907 genetik mesafe ile en yakın bulunurken, 0.071 genetik mesafe ile 59 nolu örnek ile 84 nolu örnek en uzak akraba olarak tespit edilmiştir. 83 ve 185 nolu örnekler dikkete alınmamıştır. Sonuç olarak; morfolojik olarak kaydedilen değerler artırıldıkça daha da olumlu sonuçlar alınacaktır. Çünkü varlığı kısmen farkedilen ancak adlandırılmayan birçok morfolojik özellik kayıt altına alınıp titiz çalışmalar yaparak daha kesin sonuçlara ulaşılabilir.

5.2. Alkaloit Çalışmaları

Çalışmada kullanmış olduğumuz HPLC yöntemi ile sadece tebain alkaloitine bakılmış olmasından dolayı belki iyi bir seçim yapmış olabiliriz. Ancak diğer alkaloitlere göre bir kıyaslama yapılamadığından yorumlar sadece tebain alkaloiti ile sınırlı kalmıştır. Buna rağmen; *P. bracteatum* olarak yetiştirilen ve çalışmada kullanılan 13 bitkiden 12 tanesinde kuru kapsüllerde %0.6-2.5 arasında tebain bulunmuştur. PB101 nolu bitkide ise tebain bulunamamıştır. Bu durum diğer verilerle birlikte değerlendirilince bu

bitkinin tür isimlendirilmesindeki ismine doğruluğunu tartışılır hale getirebilir. Arslan (1991)' in çalışması aynı deneme tarlasında ve aynı orjinli bitkilerin kullanılmış olması yönüyle bizim çalışmamızı daha fazla ilgilendiren bir durumdadır. Buna göre ortalama tebain oranı yıllara göre değişmekle birlikte %1.54-1.82 arasında olup, tek bitki bazında da en fazla %4.32 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz değerlere yakın bulunmuştur. *P. bracteatum*' un izotebain, oviparin, braktavin ve değişik alkaloidler içerdiği belirtmektedir (Kiselev ve Konovalova 1948). Diğer araştırmacılar aynı türlerde tebain olduğunu diğer alkaloidlerin örneğin; Alkaloid E (Böhm 1967) ve alpinigenin (Lalezari 1973; Shafiee ve Nasser-Nouri 1973)'in çok az bulunduğunu bildirmişlerdir (Neubauer ve Mothes 1963; Böhm 1965; Sharghi ve Lalezari 1967). Sarıyar (2002) major alkaloid olarak salutaridin ve tebain olduğunu, Carolan vd (2002) ise tebain, izotebain, oripavin ve salutaridin varlığından bahsetmektedir.

P. pseudo-orientale olarak yetiştirilen ve çalışmada kullanılan 8 bitki içersinden 3 bitkide %0.09, 0.2 ve 1.5 düzeyinde tebaine ratlanmış olması tebain alkaloidinin *Oxytona* seksiyonu için tür teşhisinde ayıraç olarak kullanılmasının yanlış sonuçlara götürebileceği kanaatını güçlendirmektedir. Özhatay vd (1989) *P. pseudo-orientale*'yi 3 gruba ayırarak incelemişler ve birinci grupta majör alkaloid salutaridin, tebain, makrantalin ve papveroksin, ikinci grupta salutaridin ve mekambridin, üçüncü grupta ise izotebain tespit etmişlerdir. Levy ve Milo (1991)' nun çalışmasında ise alkaloid profili değerlendirmelerinde *P. bracteatum*'un yetişkin kapsül ve köklerinde sadece tebain tespit edilirken, *P. pseudo-orientale*'de ise daha geniş spectrum oluşturarak majör alkaloid izotebain ve daha küçük miktarlarda tebain, oripavin ve salutaridin tespit edilmiştir. Shoyama vd (1998)' in ifadesine göre çalışmada kullandıkları *P. pseudo-orientale* türünü ait bitkilerde tebain bulunamamıştır. *P. pseudo-orientale*' ye ait bitkilerde tebain olmayıp *P. bracteatum* ile oluşturulan melezlerde tebain varlığı genetik olarak *P. bracteatum*' dan gelen genlerden kaynaklandığını ifade etmektedirler. Sarıyar (2002) in çalışmasında ise majör alkaloid izotebain, mekambridin ve orientalidin iken hiç tebain tespit edemediklerini belirtmeleri önemli bulunmuştur. Çünkü kısmen benzer lokalitelerden toplanan örneklerde ve çalışmamızda Doğu Anadolu materyali olarak

verdiğimiz 24 örnek içersinden 5 örnekte %0.01-0.4 arasında tebain varlığı bizim tür teşhisi yapmamızı zorlaştırmıştır.

P. orientale olarak yetiştirilen ve çalışmada kullanılan 8 bitkiden 1 (PO180) tanesinde eser miktarda tebain bulunmuştur. Diğer bitkilerde tebaine rastlanmamıştır. Doğu Anadolu bölgesinden toplanan 24 bitkide ise; 12, 22, 83, 84 ve 121 nolu 5 bitkide %0.01-0.4 arasında tebain tespit edilmiş olup, diğerlerinde tebain bulunamamıştır. *P. orientale*' nin tanınmasında biraz karışıklık olduğu önceki araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Dawson ve James 1956, Kleinschmidt 1961) ve dominant alkaloit olarak izotebain ile iz (eser miktar) miktarda tebain bulduklarını bildirmişlerdir. Nemekova vd (1966)' nın çalışmaları bunu desteklemektedir. Ancak Ping Cheng (1972) *P. orientale*'de izotebain ile orientalidinin var olduğunu ifade etmektedir. Konovalova vd (1935) *P. orientale*'de izotebain olmadığını ve Kafkas geçiş bölgesinde bulunan bitkilerde oripavin ile tebainin eşit miktarda olduğunu bildirmektedirler. Stermitz ve Rapoport (1961) oripavin ve tebainin varlığını belirtmektedirler. Sarıyar (2002) çalışmasında ise majör alkaloit olarak oripavin ve mekambridin belirlerken bir örnekte de tebain varlığından söz etmektedir. Carolan vd (2002) majör alkaloit olarak *P. bracteatum*' da tebain, *P. orientale*' de oripavin ve *P. pseudo-orientale*' de izotebain tespit etmişlerdir. Şu ana kadar bulunan literatürler *P. bracteatum*, *P. orientale* ve *P. pseudo-orientale*' de kimyasal heterojenitenin fazla olduğunu göstermektedir.

5.3. Moleküler Çalışmalar

5.3.1. DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması

Çalışmada uygulanan tohumdan DNA izolasyon yöntemi sonucu elde edilen DNA' lar kullanılmamıştır. Çünkü bitkilerdeki yabancı tozlaşmanın yüksek seviyelerde olması bizi taze yapraklardan DNA izolasyonuna yöneltmiştir. Ancak Sangwan vd (2000) *Papaver* cinsine ait olan bitki türlerine 2x CTAB yöntemini tohum örneklerine uygulayarak başarılı sonuçlar aldıklarını belirtmektedirler.

Taze yapraklar sıvı azot ile toz haline getirilerek, 2x CTAB yöntemi Sangwan vd (2000)'nin modifiye ettiği şekilde kullanılmıştır. Buna göre elde edilen DNA'lar oldukça temiz ve kırılma olmadan başarıyla izole edilmiştir. İzolasyon sonucunda 145-1700 µg/ml arasında DNA elde edilmiştir. DNA çok kolay bir şekilde kırılabilirdiğinden dolayı, Wilson ve Walker (1994)'ın belirttiği gibi DNA'da meydana gelen kırılmaların sebepleri arasında DN_{az}'lar ve izolasyon sırasında uygulanan fiziksel güç olabilmektedir. DNA izolasyonu sırasında dokuları ezmek için sıvı azot kullanılmadığından dolayı dokuların parçalanmasıyla aktif hale geçen DN_{az}'lar DNA'nın kırılmasına neden olabilmektedir. Aynı yöntemi kullanan Carolan vd (2002) elde edilen DNA'ları tekrar konsert PCR temizleme sütunlar ile 70-250 ng/µl olarak belirlemişlerdir. Bu ikinci temizlemeyi AFLP yöntemi için kullanmışlardır.

260 ve 280 nm'deki değerler arasındaki oran (260/280 OD) nükleik asitlerin saflığı hakkında da fikir vermektedir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1.8'dir. Eğer ortamda fenol veya protein bulunuyorsa Olgun ve Topal (1999) ifade ettiği gibi oran bu değerlerden düşük olarak gerçekleşmektedir. Bu değerlere dikkat edilerek çalışma yapılmış olup, DNA miktarları 145-1700 µg/ml arasında sonuçlanmıştır. DNA'nın temizliği için ise A_{260/280}, A_{260/230} ve A₃₂₀ 'ye bakılmıştır. Çünkü DNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda ve karbonhidratlarda 230 nm dalga boyunda pik yapmaktadır. Temiz bir DNA'da Hillis ve Moritz (1990)'ın ifade ettiği gibi A_{260/280} oranı 1.8 ile 2.00 arasında; A_{260/230} oranı ise 2.00 den büyük; A₃₂₀ ise sıfıra yakın olmalıdır. Buna göre A_{260/280} değerleri yönünden 1.8 ile 2.00 arasında 30, 1.8 den küçük 1.8 ve 2.00 dan büyük 5 örnek tespit edilmiştir. En küçük değer PP141 nolu örnekte 1.50 iken, en büyük değer 84 nolu örnekte 2.30 olarak gerçekleşmiştir. A_{260/230} değerleri yönünden 2.00 dan büyük 24 örnek tespit edilmiş olup, 84 nolu örnekte en yüksek değer 3.10 olarak bulunmuştur. 2.00 dan küçük 29 örnek tespit edilmiş olup, 1 nolu örnekte en düşük değer 0.95 olarak bulunmuştur. A₃₂₀ değerlerine bakıldığında ise PB3 ve 47 nolu 2 örnekte 0.000 iken diğer örneklerde 0.001-0.048 arasında değişim göstermiştir. Değerler incelendiğinde elde edilen DNA'ların RAPD çalışmaları için yeterince temiz olduğu gözlenmiştir. Ergül (2000) izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarının ve saflık değerlerinin PCR uygulamalarında önemli olduğunu belirtmekte olup, DNA

miktarının 75-1140 µg/ml, temizliğinin ise ($A_{260/280}$) 1.8-2.0 arasında olduğunu kaydetmiştir. Şençiçek (2000) Delleporta yöntemini başarıyla kullanarak DNA miktarının 1760-1820 µg/ml olduğunu ifade etmektedir. Aka Kaçar (2001) yine Delleporta yöntemini başarıyla kullanarak DNA miktarının 80-1045 µg/ml arasında olduğunu temizliğinin ise ($A_{260/280}$) 2.0 civarında olduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan örneklerden elde edilen DNA miktar ve saflık değerleri yukarda verilen literatürlerle uyum içersinde olmuştur.

5.3.2. RAPD tekniğinin ve PCR koşullarının optimizasyonu

In vitro şartlarda DNA çoğaltılmasının çeşitli nedenleri arasında başlıcaları; özgün bir DNA parçasından bol miktarda elde edilmesi, Erlich (1990, 1991), Arı (1999) ve Arda (2000)' nın ifade ettiği gibi moleküler analizinin yapılması ve genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda kullanılmasıdır. PCR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, PCR replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 jenerasyon sonra seçilmiş bir DNA dizisinin milyarlarca katını kopyalamaktadır.

Başlangıç denatürasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95-100 °C) kullanılır. Ancak PCR sırasında genellikle etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu tespit edilmiştir. Denatürasyondan sonra primerlerin bağlanması aşamasındaki T_m /bağlanma sıcaklığı oranının tespit edilmesi, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle başarılı bir PCR için T_m /bağlanma sıcaklığının doğru hesaplanması gerekir. Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq DNA polimerazın polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72 °C kullanılmıştır. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi uzun (8 dakika) tutulmuştur. Bu durum Shoyama vd (1998) ve Sangwan vd (2000) çalışmaları ile uyum içersindedir.

PCR döngüsü ve süresi optimize edilmek amacı ile Shoyama vd (1998)'nin kullandığı Şekil 4.8. deki döngü parametreleri kullanılmıştır. Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, primer, Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarları, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı gibi termalcycler parametreleri DNA amplifikasyonunu etkiler. Bundan dolayı kritik parametreler RAPD çalışmalarına başlamadan önce optimize edilmiştir. Buna göre; 94 °C---15 saniye, 32 °C---30 saniye ve 72 °C---60 saniye şeklinde 60 döngüye tamamlanmıştır. 60 döngü sonunda 72 °C---8 dakika bekletilerek sentezi tamamlanamayan amplifikasyon ürünlerinin sentezi tamamlaması amaçlanmıştır. Programın son aşamasında bekleme sıcaklığı 4 °C olarak tercih edilmiştir. Uygulanan bu parametreler sonucunda etkili bir amplifikasyon elde edilmiştir. PCR döngü parametrelerinde Ergül (2000) 45 döngü, Şençiçek (2000) 35 döngü kullanmışlardır. Ancak *Papaver* türlerinde Shoyama vd (1998)' i 60 döngü ve Sangwan vd (2000)' ise 40 döngü kullanmış olup, çalışmaları bizim çalışmamız için aynı cins içerisinde olmasından dolayı kıyaslama da diğer çalışmalara oranla daha önem arz etmektedir.

DNA Konsantrasyonu

Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, oligonükleotid primer, Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarları, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı diğer termalcycler parametreleri DNA amplifikasyonunu etkilemekte olduğundan dolayı kritik parametreler RAPD çalışmalarına başlamadan önce optimize edilmelidir. Çalışmada 25 µl için 10-200 ng arasında genomik DNA kullanılmıştır. En iyi sonuç 4 ng (100 ng/25 µl) da gerçekleşmiştir. *Papaver* türlerinde Shoyama vd (1998) 15 ng, Sangwan vd (2000) 50 ng, üzüm çeşitlerinde Ergül (2000) 200 ng, susam populasyonlarında Şençiçek (2000) 7 ng ve kiraz çeşitlerinde Aka Kaçar (2001) 50 ng genomik DNA kullanmışlardır. Yapılan literatür çalışmalarına bakılacak olursa kullandığımız değerler özellikle *Papaver* türleri ile yapılan çalışmalara benzerlik göstermektedir.

MgCl₂ konsantrasyonu

MgCl₂ konsantrasyonu primer yapışmasına "annealing", enzim aktivitesine, ürünün belirginliğine ve primer-dimer artifaktlarının oluşumuna etki ettiğini Devos ve Gale (1992) ile Pancholi (1995) ifade etmektedirler. MgCl₂ konsantrasyonu amplifikasyon ürünlerinin sayısını ve parlaklığında etkilemektedir. Düşük MgCl₂ konsantrasyonu bantların silik ve kısmen az sayıda oluşumuna etki ederken, yüksek MgCl₂ konsantrasyonu spesifik olmayan (non-spesifik) bantların görülmesine neden olmaktadır. Çalışmada MgCl₂ 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 ve 6.0 µl şeklinde kullanılmıştır. 25 µl'lik PCR karışımı için en iyi sonuç 3.5 µl (3.5 mM) MgCl₂ kullanımında elde edilmiştir. *Papaver* türlerinde Shoyama vd (1998) 5 mM, Sangwan vd (2000) 3.5 mM, üzüm çeşitlerinde Ergül (2000) 2.5 mM, susam populasyonlarında Şençiçek (2000) 3 mM kullanmışlardır. Zikredilen literatür çalışmalarına bakılacak olursa kullandığımız değerler özellikle *Papaver* türleri ile yapılan çalışmalarla uyum içersinde olduğu görülmektedir.

Primer seçimi ve konsantrasyon

Pancholi (1995) ve Weeden vd (1992)' nin ifade ettiği gibi primer konsantrasyonu yüksek olması kalıp DNA' dan bağımsız primer-dimerlerinin ve spesifik olmayan ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır. Primer dimer oluşumlarının önüne geçebilmek için çalışmada primer konsantrasyonları seyreltilerek kullanılmıştır. Seyreltme sonucunda 200 ng' a ayarlanan stok solüsyonlardan 1, 1.5 ve 2 µl kullanılarak bant oluşumlarına bakılmıştır. En iyi sonuç 1 ve 1.5 µl de alınmış olup, 1 µl kullanılması tercih edilmiştir (200 ng/ 25 µl= 8 ng). Primerlerin T_m sıcaklıklarının da optimizasyonu Biometra Tgradient (TG) PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada T_m sıcaklığının +5 ve -5 °C aralıkları denenerek en ideal yapışma (annealing) sıcaklığı tesbit edilmiştir. Deneme sonucunda her primerin üzerinde yazılı olarak gelen T_m değerlerinde en iyi çalıştıkları görülmüştür. Benzer şekilde Shoyama vd (1998) *Papaver* türlerinde 18 primer kullanarak yaptıkları çalışmada 0.25 µM primer ve T_m sıcaklıklarını 36 °C olarak, Sangwan vd (2000) yine *Papaver* türlerinde 400 mM primer ve 35 °C, Ergül

(2000) üzüm çeşitlerinde 50 ng primer ve 35 °C, Şençiçek (2000) susam populasyonlarında 25 pmol primer ve 36 °C Tm sıcaklığı kullanmışlardır.

dNTP konsantrasyonu

Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) konsantrasyonunun düşük miktarda kullanımı PCR'ın güvenilirliğini artırmaktadır. Pancholi (1995) ve Göçmen (1994)' e göre düşük dNTP konsantrasyonu nükleotidlerin yanlış bağlanma ihtimalini düşürmektedir. Diğer taraftan Bozdayı (2001)' nin ifade ettiği gibi yüksek dNTP konsantrasyonlarında (4 mM) Mg^{+2} iyonlarını bağlayarak reaksiyonu inhibe edebilmektedir. Çalışmada dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'den oluşan dNTP karışımından (Promega) µl'sinde 200 µM dNTPs olacak şekilde ayarlanan stok solusyondan 1 ve 2 µl çekilerek denemeler yapılmıştır. En iyi sonuç 2 µl (400 µM) dNTPs kullanılarak yapılan çalışmalardan alınmıştır. Önceki çalışmalarda Shoyama vd (1998) *Papaver* türlerinde 500 µM, Sangwan vd (2000) yine *Papaver* türlerinde 400 µM, Ergül (2000) üzüm çeşitlerinde 5 mM, Şençiçek (2000) susam populasyonlarında 0.2 mM dNTPs kullanmışlardır.

Taq DNA polimeraz ve Taq DNA polimeraz tamponu

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq enzimlerine özgü olan tampondur. Diğer enzimler için de benzeri tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10x konsantrasyonda sağlanabilmektedir. Çalışmada kullanılan 10x tampon, Taq Polimeraz enzimi ile birlikte gelmiştir. Reaksiyonda 10x tampondan her tüp için 2.5 µl olacak şekilde kullanılmıştır.

PCR verimini etkileyen önemli bir faktör de DNA polimeraz enzimidir. Normalde enzim miktarı, 25-30 PCR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir. Arı (1999)' nin ifade ettiği gibi verimliliği azaltan bir diğer faktör de konsantrasyonu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışıdır. DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak

dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçaları olan primerlere ihtiyaç duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu ile sağlanmaktadır.

Taq DNA polimeraz konsantrasyonunun artması bant sayısını artırmıştır. Ancak Daha yüksek konsantrasyonlar da küçük bantlar kaybolmaktadır. Çalışmada 0.5, 1 ve 1.5 ünite enzim kullanılmıştır. En iyi sonuç 1 U (ünite) enzim ve 2.5 µl 10x tampon kullanılması sonucunda elde edilmiştir. *Papaver* türlerinde Shoyama vd (1998) 0.32 U, Sangwan vd (2000) 0.25 U ve 2.5 µl 10x tampon, Ergül (2000) üzüm çeşitlerinde 1 U ve 2.5 µl 10x tampon, Şençiçek (2000) susam populasyonlarında 1.3 Unite Taq DNA polimeraz ve 2.5 µl 10x tampon kullanmışlardır.

5.3.3. Agaroz jel elektroforezi ve fotograflama

PCR ürünleri % 1.8'lik agaroz (3:1 Sea Kem LE: Nuisieve) jelinde elektroforeze tabi tutulmuştur. 90 Volt akım verilerek 2-2.5 saat yürütülmüştür. Yürütme tamamlandıktan sonra DNA bantları UV transiliminatörü altında gözlenerek RAPD profillerinin fotograflanması ile sonuçların alınması sağlanmıştır. Fotoğraf çekimleri görüntüleme sisteminde (UVP Laboratory Products) gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde *Papaver* türlerinde Shoyama vd (1998) %1, Sangwan vd (2000) %1.4, üzüm çeşitlerinde Ergül (2000) %2 (%1 agaroz: %1 Nuisieve), susam populasyonlarında Şençiçek (2000) %1.8 (%0.3 düşük çözünürlükte %1.5 yüksek çözünürlükte) agaroz kullanmışlardır.

5.3.4. RAPD polimorfizmi ve genetik mesafenin hesaplanması

Morfolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında moleküler çalışmalardan daha detaylı veriler elde edilmiştir. RAPD çalışmalarında 15 farklı 10

merlik primer kullanılmıştır. Bantların varlığı ya da yokluğuna (Ek 4) göre POPGENE32 versiyon 1.32 ve MEGA3 istatistik programları ile amplifikasyon ürünleri analiz edilmiştir. Amplifikasyon sonucu sayılan 96 bandın 81 tanesi polimorfik olarak belirlenmiştir. Buna göre; polimorfizm oranı %85.42 olarak tespit edilmiştir. Matris sonucuna göre 53 populasyon arasındaki genetik ortalama uzaklık 0.3378 olarak belirlenmiştir. Bu durum incelenen popülasyondaki genetik çeşitliliğin bir göstergesi olarak ifade edilebilir. Birbirine en yakın genetik mesafe 0.0535 ile *P. bracteatum*'a ait PB5 nolu örnek ve PB7 arasında iken, en uzak genetik mesafe 0.5754 ile *P. orientale*'ye ait PO181 nolu örnek ve 185 nolu Doğu Anadolu materyali arasında tespit edilmiştir. Çok sayıda primer kullanılması genetik haritalamanın yapılmasında etkili olmaktadır. Millan vd (1996) gülde 10 primerin, Demeke vd (1996) soya da 12 primerin, Rajaseger vd (1997) *Ixora* çeşitlerinde 6 primerin, Schontz ve Rether (1999) italyan çiminde 4 primerin polimorfizmi belirlemede yeterli olabileceğini belirtmişlerdir. Diğer taraftan Li ve Midmore (1999)'a göre de çeşitler arasındaki varyasyon, yüksek düzeyde bulunmuş ise az sayıda primerin kullanılmasının yeterli olabileceğini ifade etmişlerdir. Budak vd (2004) RAPD çalışmaları sonucu elde edilen 0.57' lik bir genetik ortalamanın sonuçları değerlendirmede güvenle kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Shoyama vd (1998)'nin *Papaver* türleri arasında yaptıkları bir çalışmada en yakın genetik mesafe *P. setigerum* türleri arasında (0.005) gerçekleşirken, en uzak genetik mesafe ise *P. somniferum* ile *P. pseudo-orientale* arasında (0.895) gerçekleşmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin yüksek düzeyde polimorfizm göstermiş olması sonuçların isabetli değerlendirilmesi adına olumlu sonuçlar vermiş olduğu literatürlerle de doğrulanmıştır.

Yapılan çalışmada iki çeşit dendogram oluşturulmuştur. Bunlardan birincisi morfolojik karakterlere göre (SPSS 11.0) hiyerarşik kümeleme programıyla oluşturulan dendogram, diğeri ise MEGA3 programıyla oluşturulan dendogramdır. Bunlar arasında bazı ortak ve farklı gruplaşmalar görülmektedir. *P. bracteatum* türünden PB kayıt nolu örnekler morfolojik karakterler sonucu oluşan dendogramda birbirine yakın iki grupta toplanırken, moleküler dendogramda PB101 nolu örnek hariç daha çok genel bir grup altında toplanmışlardır. PB101 nolu örnek de tebain bulunmadığı da gözönünde tutulursa, moleküler dendogramdaki ayrışım daha da kuvvetlenmektedir. Bundan dolayı PB101 nolu örneğin gerçekte *P. bracteatum* değil *P. pseudo-orientale* olarak

kaydedilmesi gerekmektedir. Morfolojik karakterlere dayalı matris de en yakın genetik mesafe PB9 nolu örnek ile PB10 nolu örnek arasında (0.958) gerçekleşirken, moleküler matris (0.0535) ise PB5 nolu örnek ile PB7 nolu örnek arasında gerçekleşmiştir. *P. orientele* türüne ait örneklerden 6 tanesi (PO73, PO74, PO170, PO180, PO240 ve PO244) morfolojik dendogramda kısmen birarada iken, diğer 2 tanesi (PO169 ve PO181) farklı grupta görülmektedir. Moleküler dendogramda ise PO74, PO169 ve PO170 nolu örnekler morfolojik dendogramdan farklı olarak aynı grup içerisinde bulunmaktadır. PO240 ve PO244 nolu örnekler morfolojik dendogramda aynı grupta iken moleküler dendogramda birbirinden farklı gruplara dağılmış durumdadırlar. *P. pseudo-orientale* türüne ait örneklerden PP147 nolu örnek morfolojik dendogramda tek olarak bir grupta iken, PP70 ve PP251 ile PP121, PP122 ve PP141 ayrı bir kolda bulunmaktadır. PP60 ve PP249 ise daha farklı kollarda yer almaktadır. Ancak moleküler dendogramda bütün *P. pseudo-orientale* türünü oluşturan örnekler birarada denecek kadar birbirlerine yakın kollarda bulunarak genetik olarak daha yakın bir durum sergilemektedirler. Doğu Anadolu materyalleri ise morfolojik dendogramda 2 ana grupta dağılım göstermektedir. Moleküler dendogramda çoğunluğu bir grupta toplanırken, diğer gruplara 1, 12, 139 ve 147 nolu örnekler dağılmışlardır. Doğu Anadolu materyallerinin toplanmış olduğu 4 il bazında bakılacak olursa birbirine en yakın genetik mesafe Erzurum ili Tortum ilçesi ile Narman ilçesi arasında bulunan Kireçli bölgesinden toplanan 83 ve 84 nolu bitkiler arasında 0.0984 iken, en uzak genetik mesafe Kars ili Akkaya ilçesi Demirkent köyü civarından toplanan 1 nolu örnek ile Erzurum ili Horasan ve Eleşkirt ilçeleri arasında sarıcan mevkiinden toplanan 155 nolu örnekler arasında 0.5570 olarak gerçekleşmiştir. Ağrı ilinden toplanan 3 bitki örneğinde en yakın genetik mesafe 159 ve 163 nolu örnekler arasında 0.1335 iken, en uzak genetik mesafe 47 ve 159 nolu örnekler arasında 0.3017 olarak gerçekleşmiştir. Erzurum ilinden toplanan 12 bitki örneğinde en yakın genetik mesafe 83 ve 84 nolu örnekler arasında 0.0984 iken, en uzak genetik mesafe 147 ve 149 nolu örnekler arasında 0.3747 olarak gerçekleşmiştir. Kars ilinden toplanan 6 bitki örneğinde en yakın genetik mesafe 12 ve 19 nolu örnekler arasında 0.2205 iken, en uzak genetik mesafe 1 ve 59 nolu örnekler arasında 0.5390 olarak gerçekleşmiştir. Muş ilinden toplanan 3 bitki örneğinde en yakın genetik mesafe 169 ve 178 nolu örnekler arasında 0.1949 iken, en uzak genetik mesafe 169 ve 185 nolu örnekler arasında 0.3747 olarak gerçekleşmiştir.

Doğu Anadolu materyalleri ile Ankara üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri deneme tarlasında yetiştirilen *P. bracteatum* türü arasındaki en yakın genetik mesafe PB4 ve 19 nolu örnekler ile PB100 ve 1 nolu örnekler arasında 0.2877 iken, en uzak genetik mesafe PB3 ve 47 nolu örnekler ile PB5 ve 3 nolu örnekler arasında 0.5570 olarak gerçekleşmiştir. Doğu Anadolu materyalleri ile *P. pseudo-orientale* türü arasındaki en yakın genetik mesafe PP251 ve 121 nolu örnekler arasında 0.2603 iken, en uzak genetik mesafe PP60 ve 84 nolu örnekler arasında 0.6131 olarak gerçekleşmiştir. Doğu Anadolu materyalleri ile *P. orientale* türü arasındaki en yakın genetik mesafe PO240 ve 19 nolu örnekler arasında 0.1455 iken, en uzak genetik mesafe PO73 ve 185 nolu örnekler arasında 0.5941 olarak gerçekleşmiştir. Yukardaki ifadelerden de anlaşılacağı üzere morfolojik karakterlerde farklı dağılım olmuş olsa bile moleküler yönden kısmen net diyebileceğimiz tür ayrışmaları sergilenmiştir.

Elde edilen verilerle tez çalışması kapsamında sınırlı sayıda incelenen bitkisel materyalin ileride yapılacak olan çalışmalarda özellikle *Papaver* cinsine ait daha çok alkaloid yönünden ekonomik özellikleri olan diğer türlerin de eklenmesi ile artırılması gerekmektedir.

Bu çalışma ile ülkemiz doğal bitki örtüsünde var olan yüksek tebain içerikli *Oxytona* seksiyonu bireylerinde gen potansiyelinin genetik düzeyde tanımlanması açısından ilk uygulama olarak gerçekleştirilmiş ve RAPD tekniği daha sonraki çalışmalar için optimize edilmiştir. RAPD tekniğinin genetik olarak farklı olan popülasyonların tespit edilmesinde güvenle kullanılabileceği bulunmuştur. Bunun yanında bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için uygun DNA izolasyon yöntemi ve PCR koşulları belirlenmiş olup, polimorfizm gösteren primerler tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma, bundan sonra *Oxytona* seksiyonu içerisinde bulunan belki de *Papaver* cinsine ait türlerde yapılacak olan ıslah, gen kaynaklarının karakterize edilmesi ve markörler yardımıyla seleksiyon çalışmalarına alt yapı hazırlamıştır.

Sonuç olarak *Oxytona* seksiyonunun oldukça tartışmalı bir yapıda olmasından dolayı önceki çalışmalardan daha detaylı ve geniş bir çalışma yapılmasına gayret edilmiştir. Bu nedenle morfolojik, kimyasal ve moleküler çalışmalar birlikte değerlendirilmiştir. Bu

güne kadarki çalışmalarda tek yönlü değerlendirmeler dikkate alınmıştır. Bu durum ise bir çok yanlış sonucu birlikte getirmektedir. Bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz kapsamlı sonuçlara genel olarak bakılacak olursa moleküler çalışmanın tür içersinde ve türler arasında ismine doğruluğu belirlemede daha güvenilir olduğu ifade edilebilir.

Bu çalışma *Oxytona* seksiyonu üzerinde morfolojik, alkaloit ve moleküler çalışmaları birlikte kapsayan ilk çalışma olması yönünden oldukça önem taşımaktadır. İlerde yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalara zemin oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, M., Mc Neil, D.L. and Sedcole, R. 1997. Phylogenetic relationships in *Lens* species and their interspecific hybrids as measured by morphological characters, *Euphytica*, 94; 101-111.
- Aka Kaçar, Y. 2001. Türkiye’de yetiştirilen önemli Kiraz (*P. avium*) tiplerinin DNA parmakizi yöntemi ile sınıflandırılması. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Akar, T. 2002. Türkiye’de yetiştirilen yerel makarnalık Buğday çeşitlerinde Genetik farklılığın polimorfik DNA Analizi ile belirlenmesi. Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Akgül, G. 2004. Türkiye *Marrubium* L. (Lamiaceae) Cinsinin Revizyonu. Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean, *Genetics*, 134; 1131-1139.
- Aldrich, P.R., Doebley, J., Schertz, K.F. and Stec, A. 1992. Patterns of Allozyme Variation in Cultivated and Wild *Sorghum bicolor*. *Theor. Appl. Genet.*, 85; 451-460.
- Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji (ikinci baskı). Medisan yayınevi. Yayın no: 46. sayfa 457-489, Ankara.
- Arı, Ş. 1999. DNA nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. In :Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (ed.)İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama Merkezi (BİYOGEN). Yayın No: 1 Sayfa 57-67, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Arslan, N. 1991. *Papaver bracteatum* Lindl. Hatlarının Kapsüllerinde Tebain oranının varyasyonu üzerine araştırmalar. 9. bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı. Bildiriler. 16-19 mayıs 1991, Eskişehir.
- Arslan, N., 2003. Ziraat Fakültelerinde Aktif Herbaryum Oluşturulmasına Dair Düşünceler. 5.Tarla Bitkileri Kongresi Bildiriler, Diyarbakır.
- Atalay, İ. 1994. Türkiye Vegetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Awise, J. C., 1994, Molecular Markers, Natural History And Evolution, Chapman & Hall. International Thomson Publishing, p 3-359, New York.
- Bachmann, K. 1993. Molecular markers in plant ecology, *Tansley Review*, No: 63; 403-414.

- Banke, S., Frisvad, J.C. and Rosendahl, S. 1997. Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. *Mycol. Res.*, 101; 617-624.
- Bark, O. H., and Havey, M.J. 1995. Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 90:407-414.
- Barriga, B. P., Slebe, T. J.C. and Mansilla, S. J. 1994. Genetic analysis with RAPD markers in wheat. *Agro-Sur.*, 22 (2); 133-142.
- Beaver, J.A. and Lezzoni, A.F., 1993. Allozyme inheritance in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*L.). *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118; 873-877.
- Beckmann, J.S. and Soller, M., 1986. Restriction Fragment Length Polymorphism and Genetic Improvement of Agricultural Species. *Euphyt*, 35; 111-124.
- Bernant, J. 1998. Poppy. The Genus *Papaver*. Amsteldijk 166, 1 st Floor, 1079 LH Amsterdam.
- Boissier, E. 1867. *Flora Orientalis*. Cilt 1. sayfa 105. Basileae et Genevae.
- Boissier, E. 1888. *Flora Orientalis*. Supplement 23. Basileae et Genevae.
- Boskovic, R. and Tobutt, K. R., 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90: 245-250.
- Bothmer, R., Van., Jacobsen, N., Baden, C., Linde-Laursen, I. and Jorgensen, R.B. 1991. An ekogeographical study of the genus *Hordeum*. *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genopools*. 7. Int. Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Of Human Genet.*, 32; 314-331.
- Bozdayı, A. M. 2001. DNA Amplifikasyon Teknikleri Prensipler ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü. 3-6 Temmuz 2001 Yaz Kursu. Ankara.
- Böhm, H. V. 1965. Über *Papaver bracteatum* Lindl. II Mitteilung. Die Alkaloide des reifen bastards aus der reciproken kreuzung dieser art mit *Papaver somniferum* L. *Plant Med.*, 13; 234-240.
- Böhm, H. V. 1967. Über *Papaver bracteatum* Lindl. III Mitteilung. Charakteristischi Veränderung des Alkaloidspektrums während der Pflanzenentwicklung. *Plant Med.*, 13; 215-220.

- Böhm, H. and Nixdorf, H. 1983. Quality and quantity of morphinan alkaloids detectable in interspecific hybrids of the genus *Papaver*. *Planta Med.* 48: 193-204.
- Braaten, D.C., Thomas, J.R., Little, R. D., Dickson, K. R., Goldberg, I., Schessiner, D., Ciccodiola, A. and Durso, M. 1988. Locations and contexts of sequences that hybridize to poly (dG-dT). (dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucl. Acids Res.*, 16; 865-881. Breeding of perennial fruit crops. in: J. Janick (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley Sons, Inc: NY Vol; 397-401.
- Brettin, T.S. and Lezzoni, A.F. 1995. Chloroplast DNA polymorphisms in sweet, sour and ground cherry. *Hort. Sci.*, 30; 855.
- Bretting, P. K. and Widrlechner, M. P. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. *Hort. Sci.*, 30 (7); 1349-1356.
- Budak, H. Shearman, R. C., Parmaksiz, I. and Dweikat, I. 2004. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theoretical and Applied Genetics*. 109 (2): 280–288.
- Busch, N. 1905. *Papaveraceae*. In Kuznetsov (editor), ‘‘Flora Caucausica Critica’’ 3:42-43. Iurevie.
- Byrne, M., Marquez-Garcia M. I., Üren, T., Smith, D.S. and Moran, G.F. 1996. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci the genus *Eucalyptus*. *Aust. J. Bot.*, 44; 331-341.
- Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W.F., Boritzki, M. and Struss, D. 2001. DNA Fingerprinting of Tetraploid Cherry Germplasm Using Simple Sequence Repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1266 (2); 205-209.
- Cao, W., Scoles, G., Hucl, P. and Chibbar, R.N. 1999. The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theor. Appl. Genet.*, Berlin; Springer-Verlag. v. 98 (3/4); 602-607.
- Carolan, J. C., Hook, I. L. I., Walsh, J. J. and Hodkinson, T. R. 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro-cultured *Papaver bracteatum* (Section oxytona). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 38; 300-307.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.G., Marrazzo, M.T., Peterlunger, E. and Testoline, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach *Prunus persica* (L) Batsch] isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.*, 99; 65-72.
- Commelin, C. 1706. *Horti Medici Amsteladamensis Plantae Rariores et Exoticae*. Leiden.

- Crawford, D.J. 2000. Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view. *Taxon*, 49; 479-501.
- Cullen, J. 1965. *Papaver* L., Ref.: Davis, P.H.(ed.):Flora of Turkey and East Aegean Islands, 1; 219-236, University Press, Edinburg.
- Cullen, J. 1966. *Papaveraceae*. İn K. H. Rechinger (ed), Flora Iranica. 34: 12-13. Graz.
- Çelik, S. 2003. *Centaurea* L. Cinsi psephelloidea (Boiss) sosn. Seksiyonuna ait türlerin ekolojik özellikleri. Doktora tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir.
- Davis, P. H., Mill, R. R. and Tan, K.1965. *Papaver* L. Flora of Turkey and East Aegean Islands, 1; 219-236, University Press, Edinburg.
- Davis, P. H., Mill, R. R. and Tan, K. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg Univ. Pres. Edinburg.
- Dawson, R. F. and James, C. 1956. Alkaloids of *Papaver orientale* L. I. Qalitative detection and occurrence. *Lloydia*, 19; 59-64.
- Demeke, T., Lynch, D.R., Kavvchut, L.M., Kozub, G.C. and Armstrong, J.D. 1996. Genetic Diversity of Potato Determined by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Plant Cell Reports*, 15 (9); 662-667.
- Deniz, V. 2003. Bazı *Papaver* Türlerinde Çiçek Tozlarının *In Vitro* Çimlenmesini Etkileyen Faktörler Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı,
- Devos, K. M. and Gale, M. D. 1992. the use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genetics*, 84; 567-572.
- Digby, P. G. N. and Kempton, R. A. 1987. Multivariate Analysis of Ecological Communities. Population and Community Biology. New York.
- Dilbirliği, M. 2003. En masse cloning of disease resistance genes of wheat (*Triticum aestivum*) using RNA differential display via degenerate primers and data using methods. Doctoral dissertation. University of Nebraska-Lincoln. NE.
- Doldi, M.L., Volmann, J. and Lelley, T. 1997. Genetic Diversity in Soybean as Determined by RAPD and Microsatellite Analysis. *Plant Breeding*, 116; 331-335.
- Dow, B. D., Asley, M.V. and Howe, H.F. 1995 Characterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak (*Quercus macrocarpa*). *Theor. Appl. Genet.* 91:137-141.
- Downey, S.L. and Iezzoni, A.F. 2000. Polymorphic DNA markers in Black Cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 125(1); 76-80.

- Dweikat, I., Mackenzie, S., Levy, M. and Ohm, H. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor. Appl. Genet.* Berlin, W. Ger. Springer International. v. 85 (5); 497-505.
- Dweikat, I., Ohm, H., Patterson, F. and Cambron, S. 1997. Identification of RAPD markers of 11 Hessian fly resistance genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, Springer, Verlag. v. 94 (3/4); 419-423.
- Ergül, A., 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
- Erişen, S. 1998. Bazı Yabani Buğday Türlerinde (*Triticum* sp. ve *Aegilops* sp.) Biyokimyasal Çeşitliliğin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Erlich, H. A. 1990. ‘‘PCR Tecnology. Molecular Biology and Biotechnology’’ . Edited by Robert, A. Meyers. VHC Publishers. P; 641-648. USA.
- Erlich, H. A., Gelfand, D. and Sninsky, J. J. 1991. *Science*, 252; 1643-1650.
- Escribano, M.R., Santalla, M., Casquero, P.A. and Deron, A.M. 1998. Patterns of Genetic Diversity in Landraces of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Galicia. *Plant breeding*, 117; 49-56.
- Eser, V. 1998. Characterisation of Powdery mildew resistant lines derived from crosses between *Triticum aestivum* and *Aegilops speltoides* and *Ae. mutica*. *Euphytica*, 100; 269-272.
- Fedde, F. 1909. *Papaver* L. Ref.: Engler, A.: *Das Pflanzenreich* 40 (IV,104); 288-344, Weinheim.
- Ganesh, S.K. and Thangavelu, S. 1995. Genetic Divergence in Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Madras Agric. J.*, 82(4); 263-265.
- Gianfi-Anceschl, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.*, 96; 1069-1076.
- Goldblatt, P. 1974. Biosystematic studies in *papaver* section *oxytona*. *Annals of The Missouri Botanical Garden*, 61 (2): 264-296.
- Golembiewski, R.C., danneberger, T. K. and Sweeney, P.M. 1997. Potentiaal of RAPD Markers for use inn the identification of creeping bentgrass cultivars. *Crop Sci.*, 37; 212-214.
- Göçmen, B. 1994. Single Tree Genetic Linkage Mapping of *Taxus brevifolia* Nutt. Based on Random Amplified Polymorpic DNA (RAPD) Markers Using DNA from Haploid Megagametophytes. Master Thesis, The Graduate School

of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.

- Grossheim, A. A. 1950. Flora Caucasica. 4; 93-94, Moscow & Leningrad.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Baser, K. H. C., 2000. Flora of Turkey and East Aegean Islands (Suplement 2). Vol. 11. Edinburg Univ. Pres. Edinburg.
- Hallden, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M. and Säll, T. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD Markers in a Comparison of Brassica napus Breeding Lines. Theor. Appl. Genet., 88; 123-128.
- Harch, B.D., Basford, K.E., DeLacy, L.H. and Lawrence, P.K. 1997. The Analysis of Large Scale Data Taken From The World Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Germplasm Collection I. Two-way Quantitative Data. Euphytica, 95; 27-38.
- Hillis, D.M. and Moritz, C., 1990, Molecular systematics, Sinauer Associates, Inc. Publishers, p 217-220, Sunderland.
- Hodkinson, T. R., Chase, M. W. and Renvoize, S. A. 2002. Characterisation of a genetic resource collection of Miscanthus using AFLP and ISSR PCR. Ann. Bot. (in press).
- Hodkinson, T. R., Renvoize, S. A., Ni Chonghaile, G., Stapleton, M. A. and Chase, M. W. 2000. A comparison of ITS nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae). Plant Res., 113; 259-269.
- Hosokawa, K., Shibata, T., Nakamura, I. and Hishida, A. 2003. Discrimination among species of Papaver based on the plastid rpl16 gene and the rpl16-rpl14 spacer sequence. Forensic Science International, 139 (2004); 195–199.
- <http://orion.ufgrs.br.depbiot>.
- Isshiki, S. and Umezaki, T. 1997. Genetic Variations of Isozyme in Cultivated Sesame (*Sesamum indicum* L.). Euphytica, 93; 375-377.
- Jain, S., Srivastava, J.P. and Guotam, P.L. 1983. Evaluation of genetic resources of durum wheat for salt stress tolerance. In: Proceeding 6th International Wheat Genetics Symposium, Kyoto, Japan, 1983. 137-141.
- Johansson, M., Ellegren, H. and Andersson, L. 1992. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. J. Hered., 83; 196-198.
- Kapoor, L. D. 1997. Opium Poppy: Botany, Chemistry and Pharmacology. Food Products Press, New York. p. 19.
- Karp, A. and Edwards, K.J. 1995. Techniques for the analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. Reports of an IPGRI work shop, 9-11 Oct. 1995, Rome, Italy.

- Kemp, S.J., Brezinsky, L. and Teale, A. J. 1993. A panel of bovin, ovine and caprine polymorphic microsatellites. *Animal Genet.*, 24; 363-365.
- Khawar, K. M. 2001. Mercimek (*Lens culinaris Medik*)’te Doku Kültürü Çalışmaları ve *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Gen Aktarımı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Kleinhofs, A., Kilian, A. and Saghai-Marroof, M.A. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 705-712.
- Kiselev, V. V. and Konovalova, A. 1948. Alkaloidakh Dikorstushchikh Vidov Maka. *Zhurnal Obshchei Khimii*, 18; 142-150.
- Kleinschmidt, G. 1961. Untersuchungen über die alkaloid verteilung in der organen von *Papaver orientale* L. In laufe der vegetationsperiode . *Archiv. Pharm. (Berlin)* 294:254-258.
- Knapp, S. J. 1994. Selection using molecular markers indexes, p1-11. In: Proceedings of the Second Symposium of the American Society for Horticultural Science and Crop Science of America: Analysis of Molecular Marker Data (Corvallis, Oregon). Amer. Soc. Hort. Sci. Alexandria, Va.
- Komarov, U. L. 1970. Flora of U.S.S.R.: Vol. VII, pp.476. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Konovalova, R. A., Yunusoff, S. and Orechoff, A. P. 1935. Über alkalioide der *Papaver* arten. I. Mitteilung. Alkalioide von *Papaver armeniacum* & *Papaver orientale*. Berlin, Deutsch. Chem. Ges. 68:2158-2163.
- Koornneef, M. 1990. in O'Brien, S. J. Genetic Maps. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p; 694-697, New York.
- Köhlen, F. 2003. Mohn und Scheinmohn. (*Papaver*, *Mecanopsis* und Undere *Papaveraceae*). Ulver Verlag.
- Krausch, H. D., 2003. Kaiserkron und Paeonien rot. 329-331. Dölling und Galitz Verlag.
- Kubota, M., Arai, K. and Yorimitu, A. 1993 Studies of *Papaver* section *Oxytona* growing as garden plants on *Papaver bracteatum* Lindl. *Yakugaku Zasshi* 113. p810-817.
- Kumar, R., 1989, The technique of polymerase chain reaction, *A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, 1,133-152.
- Kumar, S., Tamura, T. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:2 (In press).

- Kumlay, A. M., Kaya, C., Olgun, M. and Dursun, A. 2000. Molekuler Genetik Techniques Assisting to Conventional Metods in Potato Improvement, 2. Balkan Sebze ve Patates Sempozyumu, 10-14 Ekim 2000, Selanik, Yunanistan.
- Lalezari, I., Nasser, P. and Asgharian, R. 1973. Isolation of alpinigenine from *Papaver bracteatum*. J. Pharm. Sci. 62. 1718.
- Lavi, U., Cregan, P., Scchap, T. and Millel, J. 1994. Amplification and breeding of perennial fruit crops. In: Janick, J. (ed) Plant Breeding Reviews. John Wiley Sons, Inc: NY Vol: 397-401.
- Levy, A. and Milo, J. 1991 Inheritance of morphological and chemical characters in interspecific hybrids between *P.bracteatum* and *Papaver pseudo-orientale*. Theor. Appl. Genet., 81;537-540
- Li, M. and Midmore, D.J. 1999. Estimating The Genetic Relationships of Chinese Water Chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Hensch) Cultivated in Australia, Using Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 74(2), 224-231.
- Linnaeus, C. 1748. Hortus Uppsaliensis. 136, Stockholm.
- Litt, M. and Luty, J. A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. AmJ. Hum. Genet., 44; 397-401.
- Loi, A., Cocks, P. S., Hovvieson, J. G. and Carr, J. 1997. Morphological Characterization of Mediterranean Populations of *Biserrula pelecinus* L. Plant Breeding, 116; 171-176.
- Love, J.M., Knight A.M., Mcaleer, M.A. and Todd, J.A., 1990. Towards construction of a high-resolution map of the mouse genome using PCR analysed microsatellites. Nucleic Acids Res., 21; 1111-1115.
- Lowe, A. J., Hanotte, O. and Guarino, L. 1996. Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: The Caase of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Plant Genetic Resources Newsletter. 107: 50-54
- Lui, Z.W., Jarret, R.L., Kresovich, S. and Duncan, R.R. 1995. Characterization and Analysis of Simple Sequence Repeat (SSR) Loci in Seashore Paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). Theor. Appl. Genet., 91; 47-52.
- Mackill, D. J., Zhang, Z. Redona, E. D. and Colowit, P. M. 1996. Level of polymorphism ami genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome 39: 969-977.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sombrook, J. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manuel. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

- Maughan, P.J., Maroof, M.A.S. and Buss, G. R. 1996. Molecular-marker Analysis of Seed-Weight: Genomic Locations, Gene Action, and Evidence for Orthologous Evolution Among Three Legume Species. *Theor. Appl. Genet.*, 93; 574-579.
- McDonald, M.B., Elliot, L.J. and Sweeney, P.M. 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed Science and Technology*, 22 (1); 171-176.
- McDonald, M.B., Elliot, L.J. and Sweeney, P.M. 1994. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seed-Science-and-Technology*. 22: (1) 171-176.
- McNicholas, L. F. and Martin, R. 1984. New and experimental therapeutic role for naloxone and related opiate antagonists. *Drugs* 27:81-93.
- Medvedew, J.S. and Kavkazsk,Sv.Mus. 1918: *Ann. Caucas. Dusb*, 11; 204-207.
- Melchinger, A.E. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding*, 104; 1-19.
- Menkir, A., Goldsbrough, P. and Ejeta, G. 1997. RAPD assesment of genetic diversity in cultivated races of Sorghum. *Crop Science*, 37; 564-569.
- Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9828-9832.
- Mihalik, E. 1998. biology of poppy. In: *Poppy*. Ed by. Bernath, J. Harwood academic publishers. Budapest, Hungary.
- Millan, T., Osuna, F., Cobos, S., Torres, A.M. and Cubero, A.M. 1996. Using RAPDs to Study Phylogenetic Relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet*, 92, 273-277.
- Milo, J., Levy, A., Ladizinsky, G. and Palevitch, D. 1986. Phylogenetic studies in *Papaver* section *Oxytona*: cytogenetics of the species and interspecific hybrids. *Theor Appl Genet.*, 72; 524–529.
- Milo, J., Levy, A., Ladizinsky, G. and Palevitch, D. 1988. Phylogenetic and genetic studies in *Papaver* section *Oxytona*: cytogenetics, isozyme analysis and chloroplast DNA variation. *Theor.Appl Genet.*, 75; 795-802.
- Milo , J. and Levy, A. 1989. Effect of ploidy level on the spectrum of alkaloids in interspecific hybrrids of *Papaver* section *Oxytona*. XII Eucarpia Congress, Book of poster abstracts, p.7.
- Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G. 1990. Genetic evidence for the conversion of the morphinan alkaloid thebaine to oripavine in interspecific hybrids between *P.bracteatum* and *Papaver orientale*. *Heredity*, 64; 367-370.

- Morgante, M. and Olivieri, A.M. 1993. PCR-Amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, 3(1); 175-182.
- Mouzeyar, S., Roeckel-Drevet, P., Gentzbittel, L., Philippon, J., Tourvieille De Labrouhe, D., Vear, F. and Nicolas, P. 1995. RFLP and RAPD Mapping of The Sunflower P/1 Locus for Resistance to *Plasmopara halstedii* race 1. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 733-737.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106, No: 949, 283-292.
- Nei, N. and Li, W. 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
- Nemekova, A., Preininger, V. and Santavy, F. 1966. Isolierung und identifizierung der alkalioide aus *Papaver orientale* L., *Papaver rhoeas* L. Und anderen papaverarten. *Deutsch Akad. Wiss. Kl.Chem. Geol. Biol.* 3: 319-323.
- Neubauer, D. Von and Mothers, K. 1963. Über *Papaver bracteatum*. I mittellung. Ein neuer wer zug gewinnung von morphinanen aug pflanzlicher rohstoffbasis. *Plant Med.*, 11; 387-391.
- Newbury, H.J and Ford-Lloyd, B.V. 1993. The Use of RAPD for Assessing Variation in Plants. *Plant Growth Regulation*, 12; 43-51.
- Nyman, U. and Bruhn, J.G. 1979. *Papaver bracteatum* a summary of current knowledge. *Planta Med.*, 35; 97-117.
- Ojala, A. and Rousi, A. 1986. Interspecific hybridization in *Papaver* 1. F1 Hybrids of *Papaver somniferum* with perennial species of sect. *Oxytona*. *Ann. Bot. Fennici*, 23 ; 289-303.
- Ojala, A., Rousi, A., Lewing, E., Pyysalo, H. and Widen, C. J. 1990. Interspecific hybridization in *Papaver* 3. F1 hybrids between species of sect. *Oxytona*. *Hereditas*, 112; 221-230.
- Olgun , A. 1999. DNA' nın izolasyonu ve saflaştırılması. In :Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (ed.)İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama Merkezi (BİYOGEN). Yayın No: 1 Sayfa 19-28. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Olgun, A. ve Topal, A. 1999. DNA nın Analizi. In :Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (ed.)İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama Merkezi (BİYOGEN). Yayın No: 1 Sayfa 33-45. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Özhatay, N., Sarıyar, G. ve Şiraneci, Ş. 1989. Türkiyenin *Oxytona* seksiyonundaki *Papaver* L. Türlerinin ana alkaloitleri ve kromozomları. VIII. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı. 19-21 Mayıs, Bildiriler kitabı, İstanbul.

- Öztekin, A., Baytop, A., Hutin, M., Foucher, J.P., Hocquemiller, R. and Cave, A. 1985. Comparison of chemical and botanical studies of Turkish *Papaver* belonging to the section *Pilosa*. *Planta Medica*, 5: 431-434.
- Palevitch, D. and Levy, A. 1983. Cultural and genetic factors affecting thebaine yield in *Papaver bracteatum* Lindl. III. International symposium on spice and medical plants XXI IHC.
- Palevitch, D. and Levy, A. 1990. Domestication of *Papaver bracteatum* as a source of thebaine. *Herba-Hungarica*. 29: 3, 17-29, International symposium on medicinal and aromatic plants, Budapest, Hungary, 4-6 Sep.
- Pancholi, N. 1995. Aspect of Tissue Culture in Relation to Banana Improvement and Germplasm conservation. The University of Reading, Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences, 301pp.
- Parani, M., Singh, K.N., Rangasamy, S. and Ramalingam, R.S. 1997. Identification of *Sesamum alatum* x *Sesamum indicum* Hybrid Using Protein, Isozyme and RAPD Markers. *Indian J. Genet.*, 57(4); 381-388.
- Paul, S., Wachira, F. I. S., Powell, W. and Waugh, R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* L.) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 255-263.
- Perry, M.C. and McIntosh, M. S. 1991. Geographical Patterns of Variation in the USDA Soybean Germplasm Collection: I. Morphological Traits. *Crop Science*, 31; 1350-1355.
- Phillipson, J. D., Baytop, A., Scutt, A., Sariyar, G. and Özahatay, N. 1981. Alkaloids from Turkish samples of *P. bracteatum* and *Papaver pseudo-orientale*. *Planta Med.*, 43; 261-271 .
- Ping, C. C. 1972. Cultivation and analysis of *Papaver bracteatum* L. MS. Thesis. University of Mississippi.
- Popov, M. G. 1937. *Papaveraceae*. in Komarov V. L. (editor), "Flora of the USSR" 7: 470-474. (Translated 1970) Jerusalem.
- Powell W., Macharay G.C. and Provan. J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Genet.*, 1; 215-222.
- Preininger, V. 1986. Chemotaxonomy of *Papaveraceae* and *Fumariaceae*-Ref. : Borossi, A. (ed): *The Alkaloids*. Vol, 29, 1. Academic Press, London and New York.
- Pyysalo, H., Widen, C. J., Salemink, C. A., Lewing, E., Rousi, A. and Ojala, A. 1988. Interspecific hybridization in *Papaver*. 2. Alkaloid contents of *Papaver somniferum* and species of section *Oxytona* and their interspecific hybrids. *Ann. Bot. Fennici*, 25; 1-10.

- Rafalski, J. A., and Tingey S. V. 1993. Genetic Diagnostic in plant breeding: RAPDS, microsattallites and machines, TIG, 9, 275-279.
- Rajaseger, G., Tan, H.T.W., Turner, I.M., and Kumar, P.P. 1997. Analysis of Genetic Diversity Among *Ixora* Cultivars (Rubiaceae) Using Random Amplified Polymorphic DNA. *Annals of Botany*, 80: 355-361
- Reiter, S.R., Young, M. and Scolnik, P.A. 1993. Genetic linkage of the arabidopsis genome: Methods for Mapping with Recombinant Inbreds and RAPDs. *Methods in Arabidopsis Research*, World Scientific Publishing, Singapore.
- Rezaei Osalou, A. 2004. Doğu Anadolu Bölgesinden Toplanan Yabani Haşhaşlarda Kromozom Sayılarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Roder, M.S., Plaschke, J., Konig, S.U., Borner, A., Sorrels, M.E., Tanksley, S.D. and Ganal, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsattellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.*, 246; 327-333.
- Rousi, A., Ojala, A., Mota, M. and Baeta, J. 1987. Wild species of *Papaver* sect. *Oxytona* as possible donors of new alkaloid characteristics to the opium poppy.
- Royo, C., Soler, C. and Romagosa, I. 1995. Agronomical and Morphological Among Winter and Spring Triticale. *Plant Breeding*, 114; 413-416.
- Russel, J.R., Fuller, J.D., Macaulary, M., Hatz, B.G., Jahoor, A, and Waugh, R. 1997. Direct Comparison of Levels of Genetic Variation Among Barley Accessions Detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95; 714-722.
- Saghai-Marooof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zang, Q., Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1994. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239; 937-945.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 937-945.
- Sangwan, R. S., Yadav, U. and Sangwan, N. S. 2000. Isolation of genomic DNA from defatted oil seed residue of opium poppy (*Papaver somniferum*). *Plant molecular biology reporter*, 18:265-270.
- Santalla, M., Power, J.B. and Davey, M.R. 1998. Genetic Diversity in Mung Bean Germplasm Revealed by RAPD Markers. *Plant Breeding*, 117; 473-478.
- Santavy, F. 1970. *Papavaraceae* Alkaloids. Ref. Manske, R. H. F. (ed): *The Alkaloids*. Vol. 12, 333, Academic Press, London and New York.

- Santavy, F. 1979. *Papaveraceae* Alkaloids. Ref. Manske, R. H. F. Rodrige, R. (ed): The Alkaloids. Vol. 17, 395, Academic Press, London and New York.
- Sarıyar, G. 1977. İstanbul Eczacılık Fakültesi Mecmuası, 13; 71.
- Sarıyar, G. 2002. Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* species. Pure Appl. Chem. 74/4. 557-574.
- Schontz, D. and Rether, B. 1999. Genetic Variability in Foxtaü Millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv.: Identification and Classification of Lines with RAPD Markers. Plant Breeding, 118, 190-192.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. ve Leblebici, E. 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematiği (Ders Kitabı). 4. baskı . Ege Üniv. Fen Fak. Ders Kitapları Serisi No: 116. İzmir.
- Seifert, K. A., Louis-Seize, G. and Savard, M. E. 1997. The phylogenetic relationships of two trichothecene-producing hyphomycetes, *Spicellum roseum* and *Trichothecium roseum*. Mycologia, 88; 250-257.
- Shafiee, A., Lalezari, I., Nasser-Nauri, P. and Asgharian, R., 1975. Alkaloids of *Papaver orientale* and *Papaver pseudo-orientale*. J. Pharm. Sci. 64:1570-1572.
- Sharghi, N. and Lalezari, I. 1967. *Papaver bracteatum* Lindl., a highly rich source of thebaine. Nature, 213; 1244.
- Shoyama, Y., Kawachi, F., Tanaka, H., Nakai, R., Shibata, T. and Nishi, K. 1998. Genetic and alkaloid analysis of *Papaver* species and their F1 hybrid by RAPD, HPLC and ELISA. Forensic science international, 91; 207-217.
- Singh, S.P., Gutierrez, J.A., Molina, A., Urrea, C. and P. Gepts. 1991. Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: II. Marker-Based Analysis of Morphological and Agronomic Traits. Crop Science, 31; 23-29.
- Soller, M. and Beckmann, J. S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement, Theor. Appl. Genet., 67; 25-33.
- Sombrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor. New York.
- Spooner, D.M., Tivang, J., Nienhuis, J., Miller, J.T., Douches, D.S. and Contreras, M. A. 1996. Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Etuberosum* (sub genus potatoe), Theor. Appl. Genet., 92; 532-540.
- Staub, J., Bacher, J. and Poetter, K. 1996. Sources of potential errors in the application of Random Amplified Polymorphic DNAs in cucumber. Hortscience, 31(2); 262-266.

- Steffan, R.J. and Atlas, R. M., 1991, Polymerase Chain reaction: Applications in Environmental Microbiology, *Annu. Rev. Microbiol.*, 15, 137-161.
- Stermitz, F. R. and Rapoport, H. 1961. Biosynthesis of opium alkaloids. Alkaloid interconversions in *Papaver somniferum* and *Papaver orientale*. *Journal American Chem. Soc.* 83: 4045.
- Stockinger, E.J., Mulnix, C.A., Long, C.M., Brettin, T.S. and Lezzoni, A.F. 1996. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *Journal of Heredity*, 87; 214-218.
- Szewc-McFadden, A.K., Kresovic, S., Bliet, S.M., Mitchell, S.E. and McFerson, J.R. 1996. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated Brassica species. *Theor. Appl. Genet.*, 93; 534-538.
- Şençiçek, A.G.E. 2000. RARD markerlerini kullanarak Türk susam (*Sesamum indicum* L.) populasyonlarında genetik uzaklıkların analizi. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 102 s. Antalya.
- Şenol, H. F. 1988. Türkiye’ de Yetişen Yabani *Papaver* (Haşhaş) Tebain ve Narkotin Bakımından Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. İst. Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Farmakognazi Anabilim dalı. İstanbul.
- Tanksley, S. D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1(1); 3-8.
- Tanksley, S.D. and Orton, T.J. 1983. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p; 147-163.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. and Bonierbale, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science, *Biotechnology*, 47, 257-264.
- Tatlıdil, H. 1996. Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistiksel Analiz. Ankara.
- Temizkan, G. 1999. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. In :Temizkan, G., Arda, N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (ed.)İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama Merkezi (BİYOGEN). Yayın No: 1 Sayfa 1-16. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Theuns, H. G., Janssen, R. H. and Salemink C. A. 1987. The alkaloids of the *Papaver* section *Oxytona* Bernh. *Rec. Adv. Bot. Hort. Pharmacol.* 2: 57-110.
- Thomas, M.R. and Scott, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 86; 985-990.
- Thormann, C.E. and Osborn, T.C. 1992. Use of RAPD and RFLP Markers for Germplasm Evaluation. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series, Minneapolis, Minnesota.

- Tournefort, J. P. 1718. A Voyage into the Levant. 2: 207-208. London.
- Türker, M.F. ve Türker, E.S. 1999. Çok Değişkenli İstatistik Analiz Yardımı ile Orman İşletmelerinin Ekonomik Analizi (Doğu Karadeniz Bölgesi 25 Devlet Orman İşletmesi Örneği). Tr. J. of Agriculture and Forestry, 23 (1), 169-177.
- Uranbey, S. 2002. Agrobacterium tumefaciens Aracılığıyla Patates (Solanum tuberosum L.) Gen Aktarımı ve Patojen İlişkili Genlerin Transgenik Bitkilerdeki Belirtileri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Vergnoud, G. 1989. Polymers of Random Short Oligonucleotides Detect Polymorphic Loci in The Human Genome. Nuc. Acid. Res., 17; 7623-7630.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, Nucl. Acids Res., 23; 4407-4414.
- Walton, M. 1993. Molecular markers: which one to use Seed World, July 1993, p: 23-29.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkoski, J. and Zoller, M. 1992. Recombinant DNA 2nd Ed. Scientific American Books, New York, p: 626.
- Waugh, R. Bonar, N. Baird, E. Thomas, B. Graner, A. Hayes, P. and Powell, W. 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. Mol. Gen. Genet. 255: 311-321.
- Weber, J.L. and May, P.E. 1989. Abundant Class of Human DNA Polymorphism Which can be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. American Journal of Human Genetics, 44; 388-396.
- Weber, W.E. and Wricke, G. 1994. Genetic Markers In Plant Breeding, Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, p; 1-91.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD Markers, Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, Minneapolis, Minnesota.
- Weising, K. H., Nybom, W. K. and Meyer, W. 1995. DNA Fingerprints In Plants And Fungi, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p 1-200
- Weising, K., Fung, R.W.M., Keeling, D.J., Atkinson, R.G. and Gardner, R.C. 1996. Characterization of Microsatellites from Actinidia chinensis. Molecular Breeding, 2; 117-131.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting Genomes using PCR with Arbitrary Primers. Nucleic Acids Res., 18; 7213-7218.

- White, G., Powell, W. 1997. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in *Smetenia humilis* (Meliaceae); an Endangered Tropical Hardwood Species. *Mol. Eco.*, 16; 851-860.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- Wilson, K., and Walker, J. M. 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. Cambridge University Press, Cambridge, New York, p 17-125.
- Wu, K. S., Tanksley, S. D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235.
- Yamamoto, T., Kimura, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Ban, Y., Hayashi, T. and Matsuta, N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor Appl. Genet.*, 102; 865-870.
- Yee, E., Kidwell, K.K., Silis, G.R. and Lumpkin, T.A. 1999. Diversity Among Selected *Vigna angitlaris* (Azuki) Accessions on The Basis of RAPD and AFLP Markers. *Crop Science*, 39: 268-275.
- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23. In : Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 112-159. ISBN 975-6652-05-5. Konya.
- Zhao, X. and Kochert, G. 1993. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.*, 21; 607-614.

E K L E R

EK 1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

EK 2. Morfolojik Karakterlere ait Okuma Değerleri

EK 3. Morfolojik Verilerin Analizi Sonucunda Oluşan Matris

EK 4. Popgene32 Versiyon 1.32 Paket Programında Primerlere ait Okuma Değerleri

EK 5. Moleküler Verilerin (Cluster) Analizi Sonucunda Oluşan Matris

EK 6. Çalışmada Kullanılan Latince Terimlerin Türkçe Karşılıkları

EK 1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

1. 2 x CTAB Buffer: 100 ml Tris-HCl pH (8.0), %2 CTAB g/l, 20 mM EDTA pH (8.0), 1.4 M NaCl ve %1 PVPP g/l
2. %1 NaCl solüsyonu
3. Kloroform: İzooamilalkol (24: 1 litre/litre)
4. %10 CTAB solüsyonu
5. CTAB yoğunlaştırıcı: 50 mM Tris-HCl pH (8.0), %1 CTAB, 10 mM EDTA pH (8.0)
6. Tuzlu TE Buffer (STE): 10 mM Tris-HCl pH (8.0), 1 mM EDTA pH (8.0) ve 1 M NaCl
7. Hafif TE Buffer (LTE): 1 mM Tris-HCl pH (8.0), 0.1 mM EDTA pH (8.0)
8. Saf alkol (Absolu etanol -%99.9)
9. 3 M sodyum asetat
10. RN_{az} solüsyonu: 3.5 mg /ml (pankreatik RN_{az} A)
11. 50 x TAE buffer: 242 g Tris-HCl, 57.1 ml asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA pH (8.0)
12. 10 x TBE buffer: 121.1 g Tris-HCl, 62 g Borik asit, 40 ml 0.5 M EDTA pH (8.0)

Ekstraksiyon Tamponu: 10 ml 1M Tris + 10 ml 0,5M EDTA + 10 ml 5M NaCl + 70 µl 1M β-merkaptotanol + 69 ml ddH₂O pH:(8.0)

TE: 10 mM Tris + 1mM EDTA

10X PCR Buffer

Taq Polimeraz enzimi ile birlikte gelmiş olup (Promega) 50 mM Tris-HCl pH (8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, %50 glycerol ve %1 TritonX-100 içermektedir.

MgCl₂ Solution

25 mM MgCl₂.

TE (Buffer): 10 mM Tris-HCl (0.12 g) pH (8.0), 1 mM EDTA (0.037 g) pH (8.0) 100 ml (ddH₂O) iki defa saflaştırılmış suda eritilerek hazırlanır.

	Bit. boyu	Yap.boyu	Çiçek sap	Tom.gör.	Brakte	Sepal s.	Çiçek.z.	Petal s.	Pet. rengi	Petal eni	Petal boy	Pet. lek.Ş	Pet.lek.E.	Pet.lek.B.	K.Al.Sız.	Kap. eni	Kap.B.	Kap.İş.S.	K. tep.Ş.	Tebain
PB1	9,00	6,00	6,00	1,00	5,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	5,00	4,00	7,00	8,00	2,00	4,00	7,00	5,00	6,00	3,00
PB2	9,00	6,00	6,00	1,00	5,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	5,00	4,00	7,00	8,00	2,00	4,00	5,00	5,00	6,00	6,00
PB3	8,00	5,00	6,00	1,00	5,00	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	5,00	2,00	2,00	1,00	2,00	3,00	5,00	5,00	4,00	4,00
PB4	9,00	6,00	5,00	1,00	5,00	3,00	1,00	3,00	3,00	2,00	3,00	2,00	3,00	2,00	1,00	5,00	7,00	5,00	4,00	5,00
PB5	9,00	6,00	5,00	1,00	5,00	3,00	1,00	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	3,00	1,00	2,00	3,00	5,00	5,00	7,00	6,00
PB7	9,00	5,00	5,00	1,00	5,00	3,00	2,00	3,00	3,00	3,00	4,00	2,00	3,00	4,00	2,00	4,00	7,00	5,00	4,00	6,00
PB9	8,00	5,00	4,00	1,00	,00	3,00	1,00	3,00	3,00	2,00	3,00	4,00	5,00	8,00	1,00	3,00	6,00	5,00	5,00	6,00
PB10	9,00	5,00	5,00	1,00	6,00	3,00	1,00	3,00	3,00	2,00	3,00	4,00	6,00	7,00	1,00	4,00	7,00	4,00	5,00	6,00
PB99	8,00	5,00	5,00	1,00	5,00	3,00	1,00	3,00	3,00	2,00	3,00	4,00	4,00	7,00	2,00	5,00	5,00	4,00	7,00	5,00
PB100	8,00	5,00	5,00	1,00	5,00	3,00	1,00	3,00	3,00	2,00	3,00	4,00	4,00	7,00	2,00	4,00	6,00	5,00	7,00	6,00
PB101	9,00	4,00	4,00	1,00	5,00	3,00	1,00	3,00	3,00	2,00	3,00	3,00	5,00	5,00	2,00	4,00	4,00	5,00	1,00	6,00
PB246	9,00	5,00	4,00	1,00	5,00	3,00	2,00	3,00	3,00	2,00	3,00	3,00	5,00	5,00	1,00	4,00	6,00	3,00	6,00	6,00
PB248	9,00	5,00	4,00	1,00	4,00	3,00	2,00	3,00	3,00	2,00	3,00	4,00	6,00	7,00	1,00	4,00	5,00	1,00	6,00	6,00
PP60	5,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	3,00	1,00	2,00	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00	6,00
PP70	6,00	5,00	3,00	1,00	3,00	4,00	1,00	1,00	2,00	6,00	4,00	3,00	6,00	5,00	2,00	3,00	6,00	2,00	1,00	6,00
PP121	9,00	5,00	5,00	1,00	4,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	3,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	6,00	5,00	1,00	6,00
PP122	8,00	4,00	5,00	1,00	3,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	4,00	2,00	4,00	4,00	2,00	4,00	4,00	3,00	1,00	6,00
PP141	7,00	6,00	4,00	1,00	4,00	3,00	1,00	3,00	2,00	2,00	3,00	3,00	4,00	3,00	3,00	2,00	3,00	4,00	3,00	3,00
PP147	5,00	4,00	3,00	1,00	4,00	1,00	1,00	3,00	2,00	2,00	4,00	3,00	8,00	6,00	3,00	5,00	4,00	4,00	6,00	2,00
PP249	5,00	2,00	3,00	1,00	3,00	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00	4,00	2,00	2,00	3,00	1,00	2,00	5,00	2,00	3,00	2,00
PP251	8,00	5,00	2,00	1,00	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	4,00	5,00	4,00	8,00	8,00	1,00	4,00	4,00	3,00	1,00	6,00
PO73	2,00	3,00	3,00	1,00	1,00	1,00	4,00	3,00	2,00	2,00	3,00	1,00	,00	,00	1,00	2,00	4,00	2,00	1,00	1,00
PO74	4,00	3,00	3,00	1,00	1,00	2,00	4,00	3,00	1,00	2,00	3,00	1,00	,00	,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	6,00
PO169	5,00	4,00	5,00	1,00	1,00	1,00	4,00	3,00	1,00	2,00	3,00	4,00	4,00	6,00	,00	2,00	3,00	1,00	1,00	6,00
PO170	4,00	3,00	3,00	3,00	1,00	2,00	4,00	2,00	1,00	3,00	2,00	1,00	,00	,00	1,00	2,00	3,00	1,00	1,00	1,00
PO180	5,00	3,00	3,00	3,00	1,00	2,00	4,00	2,00	1,00	3,00	2,00	1,00	,00	,00	1,00	2,00	2,00	3,00	2,00	6,00
PO181	5,00	4,00	3,00	3,00	1,00	1,00	4,00	3,00	1,00	3,00	2,00	3,00	8,00	7,00	1,00	4,00	5,00	3,00	1,00	5,00
PO240	6,00	3,00	3,00	3,00	1,00	2,00	4,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	,00	,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	6,00
PO244	6,00	3,00	3,00	1,00	1,00	2,00	4,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	,00	,00	1,00	2,00	1,00	3,00	1,00	1,00
1	4,00	2,00	1,00	3,00	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	6,00	4,00	3,00	8,00	6,00	1,00	3,00	7,00	3,00	1,00	6,00
3	6,00	3,00	3,00	3,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	4,00	1,00	3,00	5,00	4,00	1,00	4,00	5,00	3,00	1,00	6,00
12	4,00	2,00	3,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	4,00	1,00	3,00	8,00	5,00	1,00	2,00	3,00	1,00	3,00	5,00
19	5,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	5,00	3,00	3,00	8,00	6,00	1,00	4,00	6,00	2,00	1,00	5,00
22	5,00	1,00	3,00	3,00	1,00	3,00	1,00	1,00	1,00	5,00	2,00	3,00	4,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	3,00	5,00
47	6,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	3,00	1,00	3,00	4,00	2,00	1,00	4,00	3,00	2,00	1,00	5,00
59	4,00	1,00	4,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	4,00	4,00	3,00	4,00	3,00	1,00	3,00	5,00	1,00	1,00	5,00
83	1,00	1,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	3,00	,00
84	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	3,00	2,00	1,00	,00	,00	,00	3,00	,00
121	4,00	3,00	1,00	2,00	1,00	3,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	3,00	4,00	3,00	1,00	,00	,00	,00	3,00	,00
124	5,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	3,00	4,00	3,00	4,00	2,00	1,00	3,00	5,00	2,00	1,00	5,00
136	4,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	4,00	3,00	3,00	5,00	4,00	3,00	2,00	4,00	2,00	1,00	5,00
139	2,00	1,00	2,00	3,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	3,00	2,00	3,00	3,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	5,00
144	4,00	2,00	2,00	3,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	3,00	3,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00	5,00	2,00	1,00	5,00
147	5,00	3,00	1,00	1,00	1,00	2,00	3,00	1,00	1,00	6,00	4,00	3,00	4,00	4,00	3,00	4,00	5,00	3,00	1,00	5,00
148	6,00	3,00	3,00	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	5,00	4,00	3,00	6,00	4,00	3,00	,00	,00	,00	1,00	,00
149	6,00	3,00	3,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	6,00	4,00	3,00	6,00	4,00	3,00	4,00	5,00	2,00	1,00	5,00
155	6,00	3,00	4,00	1,00	2,00	3,00	1,00	2,00	1,00	3,00	3,00	3,00	6,00	4,00	3,00	4,00	7,00	3,00	1,00	5,00
157	6,00	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	3,00	2,00	1,00	4,00	3,00	3,00	6,00	5,00	3,00	4,00	4,00	3,00	1,00	5,00
159	4,00	1,00	2,00	3,00	1,00	1,00	3,00	1,00	1,00	5,00	4,00	3,00	6,00	5,00	1,00	4,00	4,00	2,00	1,00	5,00
163	5,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	6,00	3,00	3,00	6,00	6,00	1,00	4,00	5,00	3,00	1,00	5,00
169	5,00	2,00	3,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	6,00	4,00	3,00	5,00	4,00	1,00	4,00	3,00	2,00	1,00	5,00
178	5,00	2,00	2,00	3,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	5,00	4,00	1,00	,00	,00	1,00	4,00	4,00	1,00	1,00	5,00
185	1,00	1,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	1,00	,00

EK 3. Morfolojik Verilerin Analizi Sonucunda Oluşan Matris

EK 4. Popgene32 Versiyon 1.32 Paket Programında Primerlere ait Okuma Değerleri

(1= var, 0= yok ve .= değerlendirme yok)

Populasyon sayısı = 53

Okunan toplam lokus sayısı = 96

Lokus isimleri :

OPA03-1 OPA03-2 OPA03-3 OPA03-4 OPA03-5

OPA04-1 OPA04-2 OPA04-3 OPA04-4 OPA04-5

OPA07-1 OPA07-2 OPA07-3 OPA07-4 OPA07-5 OPA07-6

OPF04-1 OPF04-2 OPF04-3 OPF04-4 OPF04-5 OPF04-6 OPF04-7 OPF04-8 OPF04-9
OPF04-10

OPF05-1 OPF05-2 OPF05-3

OPF06-1 OPF06-2 OPF06-3 OPF06-4 OPF06-5 OPF06-6 OPF06-7 OPF06-8 OPF06-9

OPF08-1 OPF08-2 OPF08-3 OPF08-4 OPF08-5 OPF08-6 OPF08-7

OPO02-1 OPO02-2 OPO02-3 OPO02-4 OPO02-5 OPO02-6 OPO02-7 OPO02-8

OPO04-1 OPO04-2 OPO04-3 OPO04-4 OPO04-5

OPO19-1 OPO19-2 OPO19-3 OPO19-4 OPO19-5 OPO19-6 OPO19-7 OPO19-8

P123-1 P123-2 P123-3 P123-4 P123-5 P123-6

P166-1

P437-1 P437-2 P437-3 P437-4 P437-5 P437-6 P437-7 P437-8 P437-9 P437-10 P437-11

P443-1 P443-2 P443-3 P443-4 P443-5

UBC238-1 UBC238-2 UBC238-3 UBC238-4 UBC238-5 UBC238-6 UBC238-7

Populasyonun ismi = PB1

10101 01111 010110 1010011111 100 001001110 0001000 00001001 11110 00100110 001000 1 11111011010 11111

Populasyonun ismi = PB2

11101 01111 010110 1010011111 100 001001100 0001000 00001000 11100 00000110 001000 1 11011011010 11111 1000100

Populasyonun ismi = PB3

..... 01011 010110 1010011111 100 101001100 0001010 01001001 11110 00100110 001000 1 11011001010 11111 1011100

Populasyonun ismi = PB4

11101 01011 010110 1010011110 110 011001100 0001010 00001001 11110 00000110 001000 1 11111001010 11111 1010100

Populasyonun ismi = PB5

11101 01011 010110 1010011111 101 111001101 0001010 00001001 11100 00000110 001000 1 11011011010 11011 1111000

Populasyonun ismi = PB7

11101 01011 010110 1010111111 100 011001101 0001010 00001001 11100 00000110 001000 1 11011011010 11011 1110100

Populasyonun ismi = PB9

11101 01011 010110 1010111111 100 011001100 0101010 00001100 11110 00000110 001000 1 11111011010 11111 1010100

Populasyonun ismi = PB10

11101 01111 010110 1110011111 100 001001110 0111010 10001100 00100 00100110 001000 1 11111011010 11101 1110000

Populasyonun ismi = PB99

11101 01001 010110 1110011111 100 001001100 0001000 00001000 00110 00000110 001000 1 11011011010 1011000

Populasyonun ismi = PB100

11101 01011 010110 1010011111 101 001001100 0001000 00001101 10100 00000110 001000 1 11011011010 11111 1111100

Populasyonun ismi = PB101

11101 01001 010111 1111101111 110 001001100 0001010 01011000 00110 00010110 010000 1 01011101011 11111 1110000

Populasyonun ismi = PB246

11101 01111 010110 1110011111 100 001001101 0001010 00001001 11110 00000110 001000 1 11011011000 11101 1010100

Populasyonun ismi = PB248

11101 01011 010110 1010011111 101 001001100 0001010 00001001 00110 00000110 001000 1 11011011000 11011 1011100

Populasyonun ismi = PP60

11101 11001 100111 1111101111 100 001001100 0001000 11101100 00111 010000 1 10111011000 11000 0101000

Populasyonun ismi = PP70

11101 01011 100110 1111101111 100 001001100 0001100 01101100 00110 00010101 010000 1 00111111001 01000 1111110

Populasyonun ismi = PP121

11101 01011 110110 1111001111 100 001001100 0001100 01001000 00110 00000100 010000 1 10111111000 01111 1011000

Populasyonun ismi = PP122

..... 01011 110110 1111101111 101 001001100 0011100 11001100 00111 00010100 010000 1 10011101000 01110 1111000
 Populasyonun ismi = PP141
 11101 01011 010110 1111111111 110 001001100 0001000 01001000 00111 00010110 011000 1 10011111000 11111 1101100
 Populasyonun ismi = PP147
 01101 01011 110110 1111101111 100 001001100 0001000 11011000 00110 00010100 1 10111111000 01111 1111000
 Populasyonun ismi = PP249
 01101 01011 010110 1110111110 101 001001100 1001100 00001001 11110 00000100 010000 1 10011011000 01110 1011100
 Populasyonun ismi = PP251
 11101 01011 110110 1111111111 100 001001100 0001100 00001000 10111 00010100 010000 1 10011011000 01111 1111100
 Populasyonun ismi = PO73
 11101 01011 100110 1111111110 110 001001111 0001100 11001000 00110 00010101 011000 1 10111111001 11010 1101110
 Populasyonun ismi = PO74
 01011 110110 1111101111 110 001001100 0001100 10011000 00110 00010100 110000 1 10111011000 11110 1111100
 Populasyonun ismi = PO169
 01011 110110 1111101110 110 001011100 0001100 10001000 00111 00010010 110000 1 00111010000 11111 0111000
 Populasyonun ismi = PO170
 11101 01011 110110 1111101110 110 001011100 0000000 01001000 00110 00010010 1 10011011000 01100 1111000
 Populasyonun ismi = PO180
 11111 100110 1111111110 110 001001100 0001100 00001000 00110 00010000 010000 1 00111101000 11011 1111100
 Populasyonun ismi = PO181
 11101 11111 000110 1111111110 110 001000100 0001100 00001000 00110 010000 1 10111100000 11100 1011000
 Populasyonun ismi = PO240
 11101 01111 100110 1001001111 110 001001100 0001010 00001010 00111 01010110 000100 1 10111000010 01011 1011110
 Populasyonun ismi = PO244
 11101 01011 100110 1101011111 100 001001100 0001011 00001011 00110 00010111 001101 1 10111111100 01111 1011110
 Populasyonun ismi = 1
 11101 01011 000111 1000001110 101 001000100 0001000 00001111 00110 00000101 001011 1 10011011110 00100 0000101
 Populasyonun ismi = 3
 11101 01000 111111 1101011110 110 011001100 0010111 11101110 00111 01010111 000100 1 10111011100 01111 1011110
 Populasyonun ismi = 12
 11101 11101 111110 1101011111 110 001001100 1000011 00001111 00110 00000101 001111 1 10111000100 11111 1011100
 Populasyonun ismi = 19
 11101 01111 110110 1001011110 110 001111100 0011011 00001010 00110 01010101 000100 1 10111000000 11111 1011110
 Populasyonun ismi = 22
 11101 01101 111110 1101011111 110 011011100 0010010 00001110 10111 11010110 001111 1 10011011110 11111 1101010
 Populasyonun ismi = 47
 11101 11111 110111 1101011110 100 011011011 0010011 00001111 00110 11010110 000101 1 10111011100 01001 1011110
 Populasyonun ismi = 59
 11101 11111 100110 1101011111 110 011011100 0110011 00001010 00111 00010110 000100 1 10110111100 01101 1111110
 Populasyonun ismi = 83
 11101 01111 100110 1101011110 110 001001100 0110011 00001010 01111 01010110 000101 1 10101100110 01111 1111110
 Populasyonun ismi = 84
 11101 01111 100110 1101011110 110 001011100 0110011 00001010 11111 00010101 000100 1 10001000110 01111 1011110
 Populasyonun ismi = 121
 11101 01111 100110 1101011110 110 001011100 0010010 00001110 00111 00010101 000101 1 10011011010 01111 1001110
 Populasyonun ismi = 124
 11101 01111 111110 1101011110 110 011011100 0010011 00001010 00111 00110110 000111 1 10111010010 01111 1011110
 Populasyonun ismi = 136
 11101 01111 100110 1101011110 110 001001110 0111010 01001110 01110 00010101 000100 1 10111111110 11111 1011110
 Populasyonun ismi = 139
 11101 01111 110111 1101011110 110 001001100 0010011 01101110 00110 00010100 000101 1 10011100110 11011 1011100
 Populasyonun ismi = 144
 11101 01111 111111 1101001110 110 001001111 0111011 00001010 01110 00011111 000100 1 10111111010 11011 1011110
 Populasyonun ismi = 147
 11111 01111 110110 1100111110 110 001001100 0010010 01101111 01110 00000110 1 10111100110 11011 1011100
 Populasyonun ismi = 148
 11101 01011 1100011110 110 011001100 0010010 01101110 00111 00010110 000100 1 00111110000 01101 1011100
 Populasyonun ismi = 149
 11101 01011 111110 1101001110 110 011011100 0010011 01001010 00111 00110100 000100 1 10001010000 11111 1011110
 Populasyonun ismi = 155
 11101 01111 101110 1001011110 110 011011110 0010111 01001010 00111 10110111 000101 1 10111010000 11011 1011100
 Populasyonun ismi = 157
 11101 01111 110110 1101001110 110 011100110 0010011 01011110 00110 00010110 000100 1 00011110000 01101 1010100
 Populasyonun ismi = 159
 11101 01111 110110 1001011110 110 011001100 0010011 01011110 00110 000100 1 10011000000 01111 1011000
 Populasyonun ismi = 163
 11101 01111 110110 1101001110 100 011001100 0010011 00101011 10110 000100 1 10111010000 11111 1011000
 Populasyonun ismi = 169
 10101 11011 000110 1101001110 100 011001100 0010011 00011110 00110 000110 1 00011010000 11111 1011100
 Populasyonun ismi = 178
 11101 11001 000110 1000001110 100 001000100 00011110 00110 010000 1 00011000000 01111 0111100
 Populasyonun ismi = 185
 11101 11000 1000001110 100 011011100 00001110 00110 00000010 001000 1 00010000000 01011 0011100

Ek 3. Morfolojik verilerin analizi sonucunda oluşan matris

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	
1	1,000	,931	,795	,741	,678	,790	,730	,830	,861	,826	,764	,823	,776	,405	,695	,686	,686	,789	,792	,748	,752	,566	,376	,554	,373	,298	,605	,282	,562	,449	,464	,427	,598	,310	,541	,589	,127	,354	,436	,531	,475	,309	,345	,574	,581	,720	,747	,632	,435	,591	,540	,277	,501	
2	,931	1,000	,761	,715	,751	,833	,787	,873	,863	,881	,867	,884	,853	,531	,754	,749	,803	,788	,766	,686	,848	,526	,539	,683	,348	,444	,605	,439	,563	,490	,550	,476	,579	,367	,612	,599	,130	,345	,424	,539	,510	,405	,348	,574	,568	,719	,714	,656	,460	,594	,592	,304	,535	
3	,795	,761	1,000	,816	,833	,883	,501	,625	,704	,696	,707	,727	,541	,279	,494	,659	,712	,811	,568	,812	,473	,756	,620	,350	,524	,508	,290	,509	,756	,172	,249	,099	,179	,222	,291	,396	,116	,327	,281	,337	,227	,271	,387	,426	,431	,525	,573	,427	,173	,210	,287	,369	,266	
4	,741	,715	,816	1,000	,875	,896	,635	,815	,822	,814	,795	,865	,664	,156	,523	,785	,657	,719	,567	,589	,473	,522	,401	,282	,347	,401	,358	,377	,571	,187	,496	,158	,347	,219	,418	,261	,147	,207	,207	,335	,119	,132	,309	,313	,144	,448	,646	,339	,094	,289	,294	,311	,380	
5	,678	,751	,833	,875	1,000	,924	,628	,752	,753	,816	,833	,816	,626	,296	,632	,787	,679	,828	,506	,555	,480	,515	,568	,311	,393	,567	,275	,540	,609	,213	,501	,250	,272	,350	,398	,273	,169	,284	,290	,330	,299	,257	,351	,368	,327	,507	,632	,393	,065	,244	,309	,313	,399	
6	,790	,833	,883	,896	,924	1,000	,660	,788	,788	,840	,836	,871	,681	,392	,693	,839	,791	,741	,590	,734	,603	,621	,611	,404	,433	,556	,402	,528	,635	,373	,517	,225	,422	,297	,477	,479	,122	,246	,212	,474	,351	,326	,456	,530	,346	,631	,705	,514	,264	,421	,422	,446	,396	
7	,730	,787	,501	,635	,628	,660	1,000	,835	,764	,839	,739	,787	,771	,490	,600	,598	,513	,611	,527	,398	,673	,329	,365	,593	,157	,325	,543	,319	,350	,471	,610	,462	,555	,341	,435	,361	,189	,289	,392	,427	,358	,279	,274	,372	,216	,420	,598	,478	,273	,486	,397	,098	,517	
8	,830	,873	,625	,815	,752	,788	,835	1,000	,904	,946	,880	,950	,899	,445	,681	,756	,661	,702	,656	,546	,712	,332	,335	,572	,175	,289	,527	,305	,363	,412	,619	,462	,581	,344	,529	,417	,157	,327	,380	,453	,337	,295	,266	,332	,294	,529	,710	,456	,270	,484	,428	,144	,520	
9	,861	,863	,704	,822	,753	,788	,764	,904	1,000	,958	,883	,865	,826	,401	,607	,720	,672	,815	,781	,555	,641	,407	,306	,476	,255	,277	,482	,262	,446	,274	,536	,404	,496	,346	,540	,375	,179	,412	,437	,390	,388	,283	,233	,425	,369	,576	,729	,539	,261	,440	,443	,191	,505	
10	,826	,881	,696	,814	,816	,840	,839	,946	,958	1,000	,909	,903	,830	,505	,668	,786	,704	,795	,702	,556	,649	,394	,400	,524	,219	,357	,473	,344	,422	,359	,589	,406	,498	,343	,510	,397	,175	,374	,388	,429	,420	,331	,294	,419	,311	,549	,735	,510	,235	,441	,405	,166	,522	
11	,764	,867	,707	,795	,833	,836	,739	,880	,883	,909	1,000	,873	,781	,499	,660	,797	,766	,814	,702	,493	,706	,381	,453	,448	,232	,408	,454	,436	,511	,330	,590	,386	,466	,354	,552	,305	,083	,347	,349	,389	,405	,340	,253	,417	,386	,586	,721	,579	,252	,422	,437	,214	,348	
12	,823	,884	,727	,865	,816	,871	,787	,950	,865	,903	,873	1,000	,921	,482	,668	,754	,718	,703	,614	,655	,736	,507	,522	,593	,350	,461	,549	,488	,543	,398	,594	,407	,522	,346	,574	,411	,188	,368	,382	,432	,280	,306	,348	,389	,310	,554	,672	,489	,290	,460	,392	,275	,532	
13	,776	,853	,541	,664	,626	,681	,771	,899	,826	,830	,781	,921	1,000	,519	,663	,580	,621	,621	,587	,547	,784	,387	,428	,714	,297	,330	,564	,405	,391	,390	,558	,530	,563	,412	,591	,451	,185	,428	,505	,416	,327	,336	,256	,354	,421	,560	,605	,500	,351	,462	,444	,219	,520	
14	,405	,531	,279	,156	,296	,392	,490	,445	,401	,505	,499	,482	,519	1,000	,410	,434	,536	,319	,358	,444	,478	,348	,445	,513	,362	,512	,570	,574	,324	,593	,564	,527	,418	,374	,518	,409	,031	,392	,386	,475	,630	,674	,500	,420	,321	,385	,366	,628	,515	,426	,232	,260	,283	
15	,695	,754	,494	,523	,632	,693	,600	,681	,607	,668	,660	,668	,663	,410	1,000	,625	,565	,586	,511	,420	,737	,236	,342	,368	,286	,323	,412	,294	,246	,615	,563	,485	,666	,476	,512	,625	-.021	,256	,472	,667	,672	,448	,398	,646	,595	,761	,731	,563	,457	,595	,592	,382	,381	
16	,686	,749	,659	,785	,787	,839	,598	,756	,720	,786	,797	,754	,580	,434	,625	1,000	,887	,628	,601	,481	,466	,326	,325	,331	,178	,382	,422	,381	,418	,357	,631	,242	,448	,125	,520	,395	,003	-.016	,025	,450	,403	,268	,318	,404	,227	,525	,661	,461	,204	,419	,375	,279	,396	
17	,686	,803	,712	,657	,679	,791	,513	,661	,672	,704	,766	,718	,621	,536	,565	,887	1,000	,600	,639	,601	,553	,450	,493	,487	,262	,436	,414	,488	,489	,334	,484	,222	,357	,118	,499	,490	-.001	,074	,076	,441	,389	,394	,312	,429	,358	,549	,550	,514	,328	,364	,422	,361	,352	
18	,789	,788	,811	,719	,828	,741	,611	,702	,815	,795	,814	,703	,621	,319	,586	,628	,600	1,000	,691	,491	,538	,496	,458	,363	,395	,402	,362	,417	,623	,102	,314	,260	,197	,300	,368	,225	,045	,396	,521	,304	,427	,286	,176	,364	,521	,531	,634	,481	,073	,191	,253	,103	,376	
19	,792	,766	,568	,567	,506	,590	,527	,656	,781	,702	,702	,614	,587	,358	,511	,601	,639	,691	1,000	,535	,636	,405	,200	,339	,165	,137	,579	,074	,291	,410	,405	,419	,570	,150	,487	,424	,108	,293	,317	,506	,579	,370	,197	,497	,448	,654	,637	,611	,449	,529	,520	,217	,568	
20	,748	,686	,812	,589	,555	,734	,398	,546	,555	,556	,493	,655	,547	,444	,420	,481	,601	,491	,535	1,000	,526	,783	,549	,459	,524	,428	,421	,420	,564	,469	,292	,287	,407	,263	,311	,600	,246	,403	,260	,494	,308	,434	,598	,509	,471	,574	,476	,476	,487	,426	,418	,536	,311	
21	,752	,848	,473	,473	,480	,603	,673	,712	,641	,649	,706	,736	,784	,478	,737	,466	,553	,538	,636	,526	1,000	,393	,486	,666	,308	,383	,656	,379	,424	,637	,531	,490	,673	,401	,657	,546	,082	,326	,486	,630	,511	,421	,372	,652	,565	,725	,580	,663	,632	,717	,669	,389	,401	
22	,566	,526	,756	,522	,515	,621	,329	,332	,407	,394	,381	,507	,387	,348	,236	,326	,450	,496	,405	,783	,393	1,000	,767	,494	,753	,621	,502	,587	,743	,271	,200	,146	,150	,127	,287	,430	,019	,253	,197	,276	,212	,328	,489	,384	,266	,397	,293	,406	,313	,224	,177	,430	,128	
23	,376	,554	,373	,298	,605	,282	,562	,449	,464	,427	,598	,310	,541	,589	,127	,354	,436	,531	,475	,309	,345	,574	,581	,720	,747	,632	,435	,591	,540	,277	,501	,250	,272	,350	,398	,273	,169	,284	,290	,330	,299	,257	,351	,368	,327	,507	,632	,393	,065	,244	,309	,313	,399	
24	,554	,373	,298	,605	,282	,562	,449	,464	,427	,598	,310	,541	,589	,127	,354	,436	,531	,475	,309	,345	,574	,581	,720	,747	,632	,435	,591	,540	,277	,501	,250	,272	,350	,398	,273	,169	,284	,290	,330	,299	,257	,351	,368	,327	,507	,632	,393	,065	,244	,309	,313	,399		
25	,566	,376	,554	,373	,298	,605	,439	,563	,490	,550	,476	,579	,367	,612	,599	,130	,345	,424	,539	,510	,405	,348	,574	,581	,720	,747	,632	,435	,591	,540	,277	,501	,250	,272	,350	,398	,273	,169	,284	,290	,330	,299	,257	,351	,368	,327	,507	,632	,393	,065	,244	,309	,313	,399
26	,376	,554	,373	,298	,605	,439	,563	,490	,550	,476	,579	,367	,612	,599	,130	,345	,424	,539	,510	,405	,348	,574	,581	,720	,747	,632	,435	,591	,540	,277	,501	,250	,272	,350	,398	,273	,169	,284	,290	,330	,299	,257	,351	,368	,327	,507	,632	,393	,065	,244	,309	,313	,399	
27	,526	,539	,683	,348	,444	,605	,439	,563	,490	,550	,476	,579	,367	,612	,599	,130	,345	,424	,539	,510	,405	,348	,574	,581	,720	,747	,632	,435	,591	,540	,277	,501	,250	,272	,350	,398	,273	,169	,284	,290	,330	,299	,257	,351	,368	,327	,507	,632	,393	,065	,244	,309	,313	,399
28	,526	,539	,683	,348	,444	,605	,439	,563	,490	,550	,476	,579	,367	,612	,599	,130	,345																																					

6
1 .000
2 1293 .000
3 4998 5669 .000
4 6079 6592 3265 .000
5 6915 5622 2831 2158 .000
6 4126 3353 2251 2076 1438 .000
7 6045 5076 8616 6426 6308 5902 .000
8 3419 2646 6925 3646 4530 3631 3158 .000
9 3040 3033 5148 3216 4218 3459 4058 1666 .000
10 3482 2513 5460 3514 3306 2615 2944 922 722 .000
11 4731 3050 4552 3243 2267 2497 3936 1934 1503 1225 .000
12 3777 2808 4460 2364 2954 2052 3445 961 2106 1598 1539 .000
13 4698 3405 7688 5770 6128 5175 3796 1809 2810 2844 3026 1203 .000
14 15148 13467 12043 13959 11566 11823 9107 11771 11052 10347 8846 9088 8936 .000
15 6432 5463 8001 7696 5495 4980 6176 5456 5993 5277 5089 4670 4973 9171 .000
16 7429 6460 5503 3589 3255 3189 6363 4755 4629 3907 3313 3746 6509 8108 5512 .000
17 7968 6287 4711 5640 4952 4274 7511 6507 5494 5430 3859 4360 5894 5916 6149 1594 .000
18 6363 6488 3383 4915 3047 5073 6413 6043 3670 4312 3025 4848 6238 8888 5893 5086 5076 .000
19 5670 6189 7285 7447 8169 7218 7850 6519 4000 5530 4426 6123 6773 9351 7038 5668 4880 4544 .000
20 10075 10982 4792 7664 7832 7064 9749 9903 8663 9281 8001 6645 8153 5225 8234 6857 4658 6450 6922 .000
21 4613 2932 8877 9052 8342 6302 5327 4683 5471 5407 4634 3762 3169 10486 4376 8926 7608 7758 5987 8996 .000
22 15027 15712 6960 10665 9834 10472 12256 14748 12314 13276 11398 10109 11840 6545 12077 10015 7375 7376 9544 2103 12970 .000
23 17044 14939 8298 11383 8833 10122 11611 14399 13299 12858 10309 9600 11066 5763 10732 9973 6846 7715 11960 4274 11477 2240 .000
24 11669 9728 11060 12341 11383 11162 7225 9117 9520 9330 9225 7125 5563 6107 9758 9761 6839 8812 9862 6180 7111 6578 4974 .000
25 17719 18144 9966 12467 11493 12901 14652 16994 14392 15672 13346 12079 13116 6619 11737 11957 9587 8677 12632 4525 114205 2306 3028 7592 .000
26 17070 14965 9216 10926 8312 9890 11755 14321 13199 12771 10655 9730 11825 5297 10395 8890 7202 8263 12806 5843 11820 4067 1816 6720 3086 .000
27 8802 8795 11246 10392 11100 9846 7153 8383 8226 8204 6639 6701 6240 8455 8177 7739 8672 5891 7300 6003 7795 8554 4945 7128 6770 .000
28 18081 15876 9591 11647 8997 10896 12194 14663 13820 13441 10399 9826 11231 4683 11376 9370 6972 8270 13786 5780 12696 4295 1722 6241 2333 601 7890 .000
29 15270 15431 7127 9536 8780 10452 11976 14403 11893 12997 9955 9776 11809 6595 11893 8825 6921 6007 10806 3912 12645 2234 2490 7183 2193 2547 8002 2400 .000
30 11829 11056 13961 13956 12886 10929 8794 10751 12130 11108 10694 9399 9899 6792 6251 10067 9812 13503 9234 7508 6626 11525 11860 10140 11459 10038 5598 11885 3695 .000
31 11479 10186 11326 7983 7461 8172 6082 7214 7446 7140 6194 5997 6761 5531 6350 5166 6408 8792 8187 7387 7926 9739 9627 8069 8400 6328 4611 7469 9051 3944 .000
32 14720 14065 14637 14071 12410 14025 9549 11482 11119 11751 9945 10082 8830 5274 8269 10639 9715 10069 9076 7050 9921 9035 9751 7612 7578 8416 5956 8933 9549 4832 3076 .000
33 10194 10511 12650 10462 11014 9996 7172 8267 8434 8912 8174 7333 7083 6934 5275 7693 8020 10396 6180 6104 6415 9919 11666 8945 10637 11009 5349 12288 11108 2458 2906 2844 .000
34 17125 16306 13428 13700 11527 13643 11697 13725 12458 13172 10860 11383 10908 7189 8909 12618 11402 10031 13127 7511 11684 9429 8198 9632 5592 6134 9348 6548 7652 7701 4577 2888 6170 .000
35 14758 14103 11843 10712 10505 11515 10249 11687 10142 11226 8880 8791 8950 4316 8244 7192 6180 7920 7916 5365 9425 5551 5657 6083 4774 4596 5253 5007 3827 8398 4356 5352 5030 5786 .000
36 12944 12937 10392 12268 11642 10787 10723 12203 11343 11787 11048 9899 9817 5684 6551 8309 6195 9507 8313 3508 9775 5174 5831 5286 5569 6615 6722 7389 6723 6214 6658 5901 4788 6483 3547 .000
37 33773 34080 23573 23574 23506 27075 23099 27981 25534 26089 23394 23727 24148 12328 22880 20142 17714 18808 20880 10591 26245 8892 10906 16129 10266 13027 19593 12110 9261 19098 14963 10560 17607 10099 9524 11939 .000
38 23468 23775 15821 17228 16269 19177 16190 19359 16741 18196 15137 15755 15565 6933 14867 15658 12898 11316 14049 6328 17587 6450 7079 11306 5770 8531 13135 7694 5974 13282 10355 5728 9473 4705 6646 8496 2529 .000
39 18328 18635 13800 14932 13656 16537 12458 15404 13229 14684 12386 12648 11609 6161 10116 13774 11559 7890 11524 6762 12665 6928 7007 8881 4372 6951 9444 6290 5714 10750 8107 4501 8243 3316 5402 7349 6902 2016 .000
40 13987 13980 11091 11328 10926 10984 9966 11911 11229 11517 10114 9717 10281 4846 6252 7660 6603 8498 7412 4200 9008 6128 6660 7657 5764 6033 6403 6586 6777 4791 4982 5916 4378 5994 2953 2233 10988 7619 5293 .000
41 14190 13795 12436 14042 11276 12184 10677 13069 11077 11371 9837 11278 11732 3639 5914 8192 7237 7300 6447 6098 10036 7267 7471 8376 6059 6451 5904 7302 7629 5398 5197 4177 4721 5542 3538 3216 12188 7346 4915 2003 .000
42 20674 19855 14119 15716 14094 15745 13977 16904 15262 15779 13185 13728 13873 3698 10939 11182 8503 10130 10874 5053 14450 5175 4987 7964 3839 4754 8678 4497 5716 8701 7397 5378 8149 5336 4209 3981 6966 3962 3317 2508 2816 .000
43 16728 16721 10822 11983 11039 11541 12102 14554 13441 13493 11974 10997 12465 5208 9847 9806 8605 10625 11600 3487 12289 4886 5406 8855 3649 4163 7554 4822 5638 5111 4373 4593 5553 3313 5312 4823 7936 4742 4885 3531 4773 3664 .000
44 9703 9696 9103 11025 9655 8091 9764 11558 9178 9674 8748 8918 9627 7968 5548 8646 7692 8801 7389 5946 6280 8364 9109 10533 8007 8449 7324 10179 8659 4608 5897 7415 4188 6701 6304 6099 16118 10518 8930 5544 5231 9005 4713 .000
45 11561 11868 10132 14928 11500 12412 13379 13846 11488 12943 10446 11454 10207 9058 7194 11956 9205 7269 8914 6313 8912 9725 10004 9890 8524 10619 10435 10387 8667 9530 9517 5603 7107 5299 8176 6991 13983 7681 5729 7812 5771 8875 7098 4957 .000
46 6249 6242 7038 8333 6963 5758 8374 7614 6170 6850 5759 5894 6135 8507 3511 6586 5901 6236 4771 5466 4490 9125 9245 8647 9091 9117 5977 10263 9083 5338 5391 6250 3567 6313 6253 5169 18202 11481 9186 5697 4982 10130 6230 1666 3399 .000
47 3858 6371 6556 5607 5367 4837 6038 5072 4148 4320 4135 4532 5725 9246 4129 5095 6256 5251 5274 6875 6495 10794 10888 10380 10959 10521 7019 11496 9976 7282 4990 7053 4450 6765 7870 7484 18465 11491 9684 7604 6813 11730 7329 5909 6382 1800 .000
48 7820 7425 8384 9842 8498 7456 7489 8731 6726 7464 5839 6735 6951 5389 6001 7214 6070 6645 5221 6037 5429 8464 8268 7645 7216 6492 3436 7559 7182 4926 3904 4851 4112 4964 4894 5781 17323 10101 7803 5715 4070 8200 5321 2397 4744 1731 2929 .000
49 12983 12588 13202 14639 14429 12611 11550 13182 12128 13050 11400 10758 10347 6095 8306 11273 8730 12456 8091 5578 7204 8560 9127 7880 7200 7591 4630 8979 9431 2384 4612 3859 3088 4801 5237 3919 14308 9054 7331 3688 4208 5789 3478 3518 6187 4053 7201 2817 .000
50 10266 10259 11885 11031 11086 9812 7978 9526 9038 9534 8536 7953 8276 6539 6073 7819 7644 10099 6565 5577 5803 8728 9486 7533 8675 8317 4059 10047 8527 2646 3140 3637 1048 5555 3807 4161 13195 9179 7996 4139 4329 7690 4456 2450 6280 2858 4526 2587 1841 .000
51 11975 11320 11208 11333 10621 10450 9619 10988 9593 10677 8827 9318 9050 8392 6644 8685 7194 9566 7122 5461 7123 8784 9015 7823 8629 8695 7394 9961 8781 4756 4098 3560 2405 3876 4759 3753 11223 7867 7088 4187 4818 68600 4248 3237 4317 2765 4999 3644 2309 1726 .000
52 17870 17475 11465 12503 12034 11790 15235 16796 14671 15749 13190 12615 12280 4808 12397 4499 6942 11052 4770 5450 9723 6306 7046 6891 5852 6984 6704 4436 6009 5457 10475 7555 7431 4344 6600 5519 1612 4687 7460 5845 8793 5969 3554 5396 3547 .000
53 34273 34580 24065 24066 23810 27565 23395 2477 26038 27493 23874 24227 24648 11488 21740 19302 10874 17976 20060 11079 26825 9052 10066 15289 9426 12191 18753 11270 8521 20546 16411 12500 15215 12743 7848 10263 1940 4469 7390 9312 10512 5290 10264 18446 16311 19958 20793 18771 15756 14643 13551 12803 .000

EK 6. Çalışmada Kullanılan Latince Terimlerin Türkçe Karşılıkları

Alternat	Almaşık, almalı dizilişte olan. Her nodyumda bir yaprak ve yapraklar arasında belirli bir açı bulunan yaprak dizilişi.
Aktinomorf	(Radyal = Işınsal) İki den fazla simetri düzlemi mevcuttur.
Akuminat	Uç kısmı doğru aniden daralarak sivrilmiş olan
Bidentat	İkili dişli. İri ve keskin olan dişlerin eksenleri yaprağa dikey durumdadır.
Bilateral	Birbirine dik iki simetri düzlemi, çiçeği iki farklı simetrik parçaya ayırır.
Brakte	Çiçeklerin eksen üzerinde koltuğundan çıktıkları küçük taşıyıcı yaprak
Dentat	Dişli. İri ve keskin olan dişlerin eksenleri yaprağa dikey durumdadır.
Endemik	Belli bir yere özgü, sadece o bölgelerde bulunabilen
Filament	Bir stamenin iplik gibi ince yapıdaki sap kısmı
Herbaryum	Kurutulmuş ve usullerine göre hazırlanmış bitki örneklerinin muhafaza edildiği merkezler.
Kaliks	Bir çiçek yapısında dıştan içe doğru 4 halka mevcuttur. Korollanın dışında bulunan yeşil renkteki örtü yaprakları
Kaolin yaprak	Bitkide bulunan gövde yaprağı
Kapsül	Birden fazla karpelden (sinkarp ovaryum) oluşurlar. Olgunlaşan meyvenin açılması karpelin belirli yerlerinden olur
Karpel	meyve yaprağı, pistilin tohum taşıyan birimi
Konikal	Huni şeklinde
Konkav	İçbükey
Korolla	Taç yapraklarının tümü.çiçek örtüsünün (periant) değişik renklerde olabilen ikinci halkası
Linear	şerit şeklinde, şeritsi. Karşı kenarları birbirine az çok paralel olan uzun ve ince yapı veya bu şekilde olan basit yaprak
Lokulus	Yumurtalık veya sporangiyum içerisindeki boşluk
Lomentum	Kırılgan meyva, boğumlu meyva. Her bir bölümde bir boğum bulunacak şekilde boğumlu olan ve boğumlardan kırılan kuru açılmayan ve üst durumlu bir ovaryumdan oluşan meyva
Loplu	Yuvarlakça, yuvarlak şekilli parçalı
Nomenklatur	İsimlendirme
Nuks	Perikarp taş gibi sertleşmiştir. Karakteristik olarak tek bir tohum içerir. Tohum yapışık değildir. Örneğin; Corylus sp.(Fındık) (Fındıksı Meyve)
Oblong	Dikdörtgenimsi
Obovat	Ters yumurta şeklinde, ters yumurtamsı. Sapı yumurta kesitindeki yapının dar tarafında bulunan basit yaprak.
Operkulat	Bir sporangiyumunun peristomunu koruyan kapak ya da şapkacık
Ovaryum	Pistilin genişlemiş olan ve yumurtayı taşıyan bölgesi, yumurtalık
Ovoid	Yumurta şeklinde

panikula	bileşik salkım
Petal	Korolla'nın her bir parçası (bkz. Korolla)
Petiol	Yaprak sapı
Pinnatifid	Tüysü bölmeli. Yaprak ayasının orta damara doğru üçte birinden az bir şekilde parçalanması
Pinnatisekt	Tüysü derin parçalı. Yaprak ayasının orta damara kadar derin parçalanmış olması.
Rasemus (Salkım)	Uzamış ana eksen üzerindeki braktelerin koltuğundan saplı çiçekler çıkar. Örneğin; <i>Capsella bursa-pastoris</i> (Çoban çantası), <i>Hyacinthus</i> sp.(Sümbül).
Rozet	Tabanda yoğun bir şekilde toplanmış yaprak kümesi.
Seksiyon	Bölüm, tür altı katagoriyi ifade eder
Sepal	Kaliksin her bir parçası (bkz Korolla, Kaliks)
Silikva	İki karpelden meydana gelir. İki karpel arasında yalancı bir bölme ile meyve iki kısma ayrılır. Olgunlaştığı zaman 2 karpel kapak halinde yarılarak tohumları taşıyan yalancı bölmeden ayrılır. Meyvenin boyu, eninin 3 katıdır. Örneğin; <i>Cruciferae</i> (Hardalgiller = Turpgiller) familyasından <i>Brassica</i> sp. örnek olarak verilebilir
Sinonim	Eş anlamlı
Spatulat	Spatula şeklinde. Uca doğru düzgün bir şekilde genişleyen küt uçlu basit yaprak.
Stamen	Çiçeğin polen üretmekle görevli yapısı üzerinde anteri taşır.
Stigma	Dişicik tepesinin polen tutan yeri
Stipula	yaprağın gövdeye bağlandığı yerdeki iki adet küçük yaprakçık
Tetrakolpat	Polenleri dört yarıklı
Trikolpat	Polenleri üç yarıklı
Zigomorf	Tek simetrikli çiçekler

ÖZGEÇMİŞ

Tokat ili Erbaa ilçesinde 1966 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini ilçe de tamamladı. 1984 yılında girdiği Ondokuzmayıs Üniversitesi Eğitim fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden 1988 yılında Biyoloji Öğretmeni ünvanıyla mezun oldu. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığının açmış olduğu öğretmenlik sınavında Türkiye 18. si olarak öğretmenliğe başladı. 1995 yılında girdiği Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 1997 yılında yüksek lisansını tamamladı. 1999 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde doktorayı birincilikle kazanarak başladı. Aynı yıl 35. madde kapsamında Gaziosmanpaşa Üniversitesi adına kadrosuyla birlikte Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne geçiş yaptı. Halen Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü kadrosunda araştırma görevlisi olarak çalışmakta olup, evli ve 3 çocuk babasıdır.