

**MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ İLE  
DOĞAL KUM ZAMBAĞI (*Pancreatium  
maritimum* L.) POPULASYONLARINDA  
GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

**Ceren ELİBOL**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. B. Banu BİLGİN**

**2016**

**T.C.**  
**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ İLE DOĞAL KUM ZAMBAĞI**  
**(*Panocratium maritimum* L.) POPULASYONLARINDA GENETİK**  
**ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

**Ceren ELİBOL**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN**

**TEKİRDAĞ-2016**

**Her hakkı saklıdır.**

Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **NKUBAP.03.YL.15.005** numaralı proje ile desteklenmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN danışmanlığında, Ceren ELİBOL tarafından hazırlanan "Mikrosatellit Belirteçleri ile Doğal Kum Zambağı (*Pancretium maritimum* L.) Populasyonlarında Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi" isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Cüneyt AKI

*İmza:*

Üye: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN (Danışman)

*İmza:*

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ İLE DOĞAL KUM ZAMBAĞI (*Panocratium maritimum* L.) POPULASYONLARINDA GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

**Ceren ELİBOL**

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGİN

Soğanlı bitkiler çeşitli sanayi alanlarında büyük bir kullanım potansiyeline sahip olmalarından dolayı Türkiye biyoçeşitliliğinde önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde özellikle Akdeniz kıyılarında ve yalnızca bazı sahillerde görülen, genel olarak kumullarda yayılım gösteren kum zambağı (*Panocratium maritimum* L.), önemli soğanlı bitkilerimizden biridir. Bu çalışmada İğneada Longoz Ormanları Milli Parkı (Kırklareli), Çamlıkoy Tabiat Parkı (Tekirdağ), Pamucak Sahili (İzmir) ve Belek Sahili'nden (Antalya) toplanan 4 kum zambağı popülasyonunun 4 nSSR primeri kullanılarak genetik yapısı ve popülasyonların genetik çeşitliliği belirlendi. Çalışmada kullanılan 4 nSSR lokusundan (SSR-15, SSR-20, SSR-27, SSR-38) 3 tanesi (SSR-20 hariç) polimorfik (%75) olarak saptandı. Analiz edilen 81 örnekte dört lokus için toplam 20 allel bulundu. Genetik çeşitlilik parametrelerinden; lokus başına düşen ortalama allel sayısı ( $N_a=3,313$ ), etkili allel sayısı ( $N_e=2,190$ ), Shannon sabiti ( $I=0,728$ ), gözlenen heterozigotluk ( $H_o=0,449$ ) ve beklenen heterozigotluk ( $H_e=0,396$ ) değerleri hesaplandı. Popülasyonların genetik çeşitliliğinin büyük oranda (%81) popülasyon içerisinde olduğu, popülasyonlar arası çeşitliliğin düşük olduğu (%19) gözlemlendi. Çalışma sonucunda elde edilen UPGMA dendrogramına göre, coğrafik olarak birbirine yakın bulunan İğneada ve Çamlıkoy popülasyonlarının bir grup, Antalya ve Pamucak popülasyonlarının diğer grubu oluşturduğu gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar, çalışılan popülasyonların genetik yapısı hakkında önemli bilgiler içermektedir. Ayrıca kum zambağı ve yakın akraba türlerle yapılacak olan çeşitli genetik çalışmalara ve gen kaynaklarını koruma stratejilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara yardımcı olacak niteliktedir.

**Anahtar kelimeler:** genetik çeşitlilik, kum zambağı, moleküler belirteçler, nSSR, *Panocratium maritimum*

2016, 61 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN NATURAL POPULATIONS OF SEA DAFFODIL (*Pancratium maritimum* L.) WITH MICROSATELLITE MARKERS

**Ceren ELİBOL**

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Behiye Banu BİLGEN

Bulbous plants have important role in Turkey's biodiversity due to their great potential use in various industries. Sea daffodils (*Pancratium maritimum* L.) are one of the important bulbous plants which are generally spreading in sand dunes and seen only in Mediterranean coast and certain beaches in our country. In this study, the genetic structure and genetic diversity of four natural sea daffodil populations from İğneada Longoz Forests National Park (Kırklareli), Çamlıkoy National Park (Tekirdağ), Pamucak Coast (İzmir) and Belek Coast (Antalya) was determined by 4 nuclear microsatellite (nSSR) primers. Four 4 nSSR (SSR-15, SSR-20, SSR-27 and SSR-38) loci were analyzed. All, except SSR-20, were found to be polymorphic (75%). A total of 20 alleles were determined for the analyzed four loci in 81 samples. Genetic diversity parameters; mean number of alleles for each loci ( $N_a=3.313$ ), effective allele number ( $N_e=2.190$ ), Shannon's information index ( $I=0.728$ ), observed heterozygosity ( $H_o=0.449$ ) and expected heterozygosity ( $H_e=0.396$ ) were calculated. Rather high proportion of the genetic diversity (81%) was due to within population variation and the remaining part (19%) was due to variation between populations. According to acquired UPGMA dendrogram, İğneada and Çamlıkoy populations, which are geographically close, takes place in one group, Antalya and Pamucak populations occurs in other group. The results of this study include important informations about the genetic structure of the studied populations. Also, the data obtained from this study is valuable to provide important contributions to the national and international studies with sea daffodil and other related species, and the determination of genetic resources conservation strategies.

**Keywords:** genetic diversity, sea daffodil, molecular markers, nSSR, *Pancratium maritimum*

**2016, 61 pages**

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>4</b>
2.1 Soğanlı Bitkilere Genel Bakış .....	4
2.1.1 Soğanlı bitkilerin kullanım alanları .....	5
2.1.2 Soğanlı bitkilerin yetiştirilmesi .....	5
2.1.3 Soğanlı bitkilerin Türkiye biyoçeşitliliğindeki rolü .....	5
2.1.4 Nergisgiller ( <i>Amaryllidaceae</i> ) familyası ve önemi .....	6
2.2 Kum zambağına ( <i>Pancreatium maritimum</i> ) Genel Bakış .....	8
2.2.1 Kum zambağının yaşam döngüsü .....	10
2.2.2 Yapraklanma ve çiçeklenme .....	10
2.2.3 Soğan yapısı .....	11
2.2.4 Toprak isteği .....	11
2.2.5 Meyveler ve tohumlar .....	12
2.2.6 Çoğalma şekilleri .....	12
2.3 Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanım Alanları .....	13
2.4 Kum zambağında Yapılmış Çalışmalar .....	15
2.4.1 Genetik çeşitlilik çalışmaları .....	15
2.4.2 Mikroçoğaltım ve klasik ıslah çalışmaları .....	17
2.4.3 Kimyasal içerik ve eczacılık alanındaki çalışmalar .....	19
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>21</b>
3.1 Kum Zambağı Populasyonları .....	21
3.2 DNA İzolasyonu .....	23
3.3 İzole Edilen DNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini .....	25
3.4 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez .....	27

3.5 Verilerin İstatistiksel Analizi.....	34
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>36</b>
4.1 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi .....	36
4.2 Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik .....	38
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>44</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>61</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2015 yılı için doğadan toplanarak ihracatı yasak olan 20 çiçek soğanı.....	7
Çizelge 3.1. Özütleme tamponu içeriği .....	24
Çizelge 3.2. Kum zambağı populasyonlarına ait bazı DNA örneklerinin miktar ölçüm sonuçları.....	26
Çizelge 3.3. Di Maio ve De Castro (2013) tarafından <i>P. maritimum</i> 'a özgü olarak karakterize edilmiş ve çalışmada kullanılmak üzere seçilmiş nSSR primerlerine ait bilgiler .....	28
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları....	28
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri ....	29
Çizelge 4.1. Çalışmada analiz edilen dört nSSR lokusuna ait allellerin dört kum zambağı populasyonundaki frekansları .....	36
Çizelge 4.2. Doğal kum zambağı populasyonlarına ait genetik çeşitlilik parametreleri .....	40
Çizelge 4.3. Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları .....	41
Çizelge 4.4. Çalışılan <i>P. maritimum</i> populasyonları arasındaki $F_{ST}$ ve $N_m$ değerleri .....	41
Çizelge 4.5. <i>P. maritimum</i> populasyonları arasında Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri.....	43

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Soğanlı bitkilerden zambak ( <i>Lilium spp.</i> ) soğanları.....	4
Şekil 2.2. İzmir Pamucak Sahili'ndeki kum zambaklar .....	8
Şekil 2.3. Kum zambağının doğal yaşam alanı (Pamucak Sahili, İzmir) .....	12
Şekil 3.1. Çalışılan kum zambağı populasyonlarının Türkiye haritasındaki yerleşimi (Google Earth 2016) .....	21
Şekil 3.2. Çamlıkoy Tabiat Parkı (A) ve İğneada Longoz Ormanları'ndaki (B) doğal kum zambağı populasyonları .....	22
Şekil 3.3. Pamucak Sahili (A) ve Belek Sahili'ndeki (B ve C) doğal kum zambağı populasyonları.....	22
Şekil 3.4. Örneklere özütleme tamponu eklenmesi ve inkübasyon aşaması .....	25
Şekil 3.5. Antalya (A), Pamucak (P), İğneada (I) ve Çamlıkoy (C) populasyonlarına ait bazı DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri.....	27
Şekil 3.6. Örneklerin PCR analizine hazırlanması, Thermal Cycler cihazlarında DNA amplifikasyonları ve Elektroforez.....	30
Şekil 3.7. Antalya (A) ve Pamucak (P) populasyonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü .....	30
Şekil 3.8. SSR-15 primerine ait allellerin GeneMapper Software 5.0 programındaki görüntüsü.....	31
Şekil 3.9. SSR-20 primerine ait allelin GeneMapper Software 5.0 programındaki görüntüsü.....	31
Şekil 3.10. SSR-27 primerine ait allellerin GeneMapper Software 5.0 programındaki görüntüsü.....	32
Şekil 3.11. SSR-38 primerine ait allellerin GeneMapper Software 5.0 programındaki görüntüsü.....	33
Şekil 4.1. Çalışmada analiz edilen polimorfik nSSR lokuslarının [a) SSR-15, b) SSR-27, c) SSR-38] her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre çalışılan populasyonlardaki frekans dağılımları .....	38
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan nSSR lokuslarındaki allellerin 4 kum zambağı populasyonunda frekans dağılımları .....	39
Şekil 4.3. Çalışılan <i>P. maritimum</i> populasyonlarının $N_m$ değerleri ile coğrafik mesafeleri arasındaki ilişki .....	42
Şekil 4.4. <i>P. maritimum</i> populasyonlarının nSSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram (UPGMA'ya göre) .....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

A	: Adenin nükleotidi
C	: Sitozin nükleotidi
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
f	: Frekans
g	: Gram
G	: Guanin nükleotidi
M	: Molarite
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
n	: Tekrar sayısı
ng	: Nanogram
rpm	: Rounds Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
s	: Saniye
T	: Timin nükleotidi
U	: Ünite (Enzim birimi)
Volt	: Voltaj
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece

## Kısaltmalar

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Artırılmış Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)
AMOVA	: Analysis of Molecular Variance (Moleküler Varyans Analizi)
ark.	: arkadaşları
BAP	: 6-Benzylaminopurine, benzyl adenine veya BA
bp	: Base pair (Baz çifti)
<i>C. cilicium</i>	: <i>Cyclamen cilicium</i> (Sıklamen)
<i>C. coum</i>	: <i>Cyclamen coum</i> (Sıklamen)
<i>C. hederefolium</i>	: <i>Cyclamen hederefolium</i> (Sıklamen)
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide
dH <sub>2</sub> O	: Distile Su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
<i>F. imperialis</i>	: <i>Fritillaria imperialis</i> (Ters lale)
<i>F. persica</i>	: <i>Fritillaria persica</i> (Adıyaman lalesi)
<i>G. elwesii</i>	: <i>Galanthus elwesii</i> (Kardelen)
<i>G. woronowii</i>	: <i>Galanthus woronowii</i> (Kardelen)
GC/MS	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
H <sub>e</sub>	: Beklenen heterozigotluk değeri
H <sub>o</sub>	: Gözlenen heterozigotluk değeri
I	: Shannon sabiti
IUCN	: International Union for Conservation Nature
L	: Linnee
<i>L. martagon</i>	: <i>Lilium martagon</i> (Türk zambağı)
<i>L. candidum</i>	: <i>Lilium candidum</i> (Ak zambak)
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum Klorür
MS	: Murashige and Skoog medium
N	: Örnek sayısı
N <sub>a</sub>	: Gözlenen allel sayısı
N <sub>e</sub>	: Etkili allel sayısı
NAA	: 1-Naphthaleneacetic acid

NKÜ	: Namık Kemal Üniversitesi
no	: Numara
nSSR	: Nuclear Simple Sequence Repeats (Nükleer Basit Dizi Tekrarları)
<i>P. maritimum</i>	: <i>Pancreatium maritimum</i> (Kum zambağı)
PCR	: Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIC	: Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
Primer F	: Forward (İleri) primer
Primer R	: Reverse (Geri) primer
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA (Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş fragmentlerin uzunluk polimorfizmi)
<i>S. lutea</i>	: <i>Sternbergia lutea</i> (Karaçiğdem)
spp	: Species (Türler)
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
STR	: Short Tandem Repeats (Kısa Bitişik Tekrarlar)
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
TBE	: Tris-Borat-EDTA Tamponu
$T_M$	: DNA'nın erime sıcaklığı
UPGMA	: Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average
UV	: Ultraviyole Işığı

## ÖNSÖZ

Soğanlı bitkiler gerek sanayi alanında ticari amaçlı, gerekse süs bitkisi olarak büyük bir kullanım potansiyeline sahip olmalarından dolayı, Türkiye biyoçeşitliliğinde önemli bir yer tutmaktadırlar. Ülkemizin biyolojik zenginliklerinden biri olan ve özellikle Akdeniz kıyılarındaki kumullarda yetişen kum zambağı (*Pancratium maritimum* L.) önemli soğanlı bitkilerimizdendir. Kum zambağı, güzel kokulu beyaz çiçekleri ile dekoratif bir bitki olmasının yanı sıra, içerdiği bazı flavonoidler ve alkaloidler sebebiyle de önemli tıbbi nitelikler taşımaktadır. Bu alkaloidlerin antiviral, analjezik, anti-kolinesteraz ve anti-kanserojen gibi farmakolojik özellikler taşıdıkları bilinmektedir. Kum zambağının içerdiği bazı maddelerin özellikle kanser tedavisinde kullanılıyor olması, bitkinin önemini daha da artırmaktadır.

Türün varlığının tehlike altında olması ise, değerini artıran bir başka faktördür. Türkiye'de Kırklareli, Tekirdağ, İstanbul, Bolu, Bartın, Sinop, Samsun, Giresun, Trabzon, Antalya, Mersin, İzmir ve Adana'nın kumul sahillerinde doğal olarak bulunan kum zambağının yaşam alanlarının, özellikle turizm ve şehirleşme nedeniyle tahrip edilmesi sonucu türün varlığı gittikçe daha büyük bir tehlike altına girmektedir. Doğal yaşam alanları olan kumul sahillerin plaj olarak kullanılması, turizme yönelik olarak gereğinden fazla ve plansız inşa edilen oteller, yazlık konutlar ve buna bağlı olarak sahillerin kapatılması, bitkinin çiçeklerinin insanlar tarafından bilinçsizce koparılması, çiğnenmesi ve soğanlarının toplanması gibi unsurlar, türe yönelik önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2015 yılı için doğadan toplanarak ihracatı yasak olan 20 çiçek soğanı arasında kum zambağı da bulunmaktadır.

Bu tehlikenin en aza indirgenmesi için yapılabilecek en yararlı çalışmalar; doğal kum zambağı populasyonlarının in vitro çoğaltım yoluyla yetiştirilmesi ve genetik yapısının belirlenmesidir. Bu doğrultuda çeşitli üniversiteler ve araştırma kurumları tarafından yapılmış ve halen yapılmakta olan pek çok çalışma bulunmaktadır. Moleküler düzeydeki mevcut çalışmalarda, kum zambağı populasyonlarının genetik karakterizasyonu çoğunlukla RAPD primerleri, kloroplast DNA belirteçleri ve AFLP analizleri kullanılarak belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise, genetik karakterizasyonu belirlemede izlenebilecek en etkili ve kullanışlı metodlardan biri olan nükleer mikrosatellit belirteçleri (nSSR) kullanılmıştır. Karakterizasyonu yapılacak olan kum zambağı populasyonları Tekirdağ, Kırklareli, İzmir ve Antalya'dan seçilerek, toplam 81 örnek toplanmıştır. Bu 81 örneğin her biri için yaprak dokusundan DNA izole edilmiş ve nükleer mikrosatellit belirteçleri (nSSR) kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda elde edilen lokuslar ve alleller belirlenerek genotiplenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen verilerin, kum zambağı ve yakın akraba türleri ile yapılacak diğer genetik çalışmalara katkı sağlamasını ve gen kaynaklarını koruma stratejilerinin belirlenmesinde yardımcı olmasını umut ederim.

Bu tez çalışmasının baştan sona tüm aşamalarında yardımları ve bilgisi ile yanımda olan, desteğini daima hissettiren, öğrencisi olmaktan büyük mutluluk ve kıvanç duyduğum kıymetli hocam ve akademik danışmanım Yrd. Doç. Dr. Behiye Banu BİLGEN'e (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) ve beni yetiştirip donatan Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü hocalarıma minnetlerimi sunarım. Ayrıca tezin son şeklini almasıyla yapıcı eleştirileri ve önerileriyle değerli katkılarını esirgemeyen Tez Savunma Sınav Jüri Üyeleri Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ'a (NKÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, birlikte bir takım ve aile olmayı öğrendiğimiz lisansüstü arkadaşlarım Ahmet Kubilay BARUT'a ve Selman ÖZKAN'a; beni daima cesaretlendiren, moral veren ve destekleyen sevgili arkadaşım Emel TÜTEN SEVİM'e; arazi çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan ve yardımcı olan eski dostum Hasan Caner GAVASER'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, tüm araştırmalarım ve çalışmalarım boyunca varlıklarını yanımda hissettiğim değerli arkadaşlarıma ve hayattaki en büyük destekçim, dayanağım, biricik annem Nursel ELİBOL'a çok teşekkür ederim.

Kasım 2016

Ceren ELİBOL

## 1. GİRİŞ

Türkiye; jeomorfolojik yapısı, coğrafik konumu ve kendine özgü ekolojisi dolayısıyla, dünyanın en önemli gen merkezlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca Asya ve Avrupa kıtaları arasında bir geçit oluşturması ve 3 ayrı bitki coğrafyası bölgesinin geçiş alanında bulunması sonucu zengin floristik yapıya sahiptir (Özhatay ve ark. 2003, Şekercioğlu ve ark. 2011). Biyolojik çeşitlilik, bir bölgedeki gen, tür, ekosistem ve işlevsel zenginliğini ifade etmektedir (Özhatay ve ark. 2009, Atik ve ark. 2010). Bununla birlikte biyolojik çeşitlilik, yeryüzünde canlılığın ve insanlığın devamı için gereklidir. Biyolojik çeşitlilik, her ülke için olduğu gibi Türkiye için de önemli bir zenginlik ve güç kaynağıdır (Demir 2013). Fakat bu eşsiz ve zengin floristik yapıya rağmen bazen yasal boşlukların etkisiyle doğal bitkilerimiz ciddi anlamda korunamamaktadır. Amerika ve Avrupa Birliği ülkeleri başta olmak üzere birçok ülkede bitkilerin korunmasına yönelik çalışmalar büyük önem kazanmaktadır (Godt ve ark. 1995, Rossetto ve ark. 1995, Frese ve ark. 2014). Bulunduğu bölgenin ekolojik şartları sebebiyle yalnızca belirli bölgede yetişebilen, dünyanın başka yerinde yetişme ihtimali olmayan, yöreye özgü bitki türüne "endemik bitki" adı verilir. Latince *endemos* (*indigenous*) sözcüğünden gelir ve "yerli, o yere ait" anlamında kullanılır. Türkiye florasında, yaklaşık 3500 kadarının endemik olduğu 12054 civarında çiçekli bitki türü bulunmaktadır (Kaya ve Aksakal 2005, Özhatay ve Byfield 2005, Özel ve Erden 2010, Özhatay ve ark. 2011, Demir 2013). Avrupa ülkeleriyle karşılaştırıldığında, bu ülkelerin toplamında 2500 kadar endemik türün bulunduğu görülmekte ve böylece ülkemizin biyoçeşitlilik açısından zenginliği de daha iyi anlaşılmaktadır. Fakat ne yazık ki, Türkiye'deki endemik ve endemik olmayan birçok tür aşırı otlatma, bilinçsiz kesim/söküm, yangın, yapılaşma, şehirleşme ve kontrolsüz herbisit kullanımı gibi tehlikelerle karşı karşıyadır. Bu olumsuz faktörler bitkinin yok olmasına, bir anlamda türün yeryüzünden silinmesine neden olabilmektedir.

Endemik bitki zenginliğinin yanı sıra, ülkemizde doğal olarak yetişmekte olan geofit (soğanlı, rizomlu, yumrulu) bitki türü sayısı da yaklaşık 600'ü bulmakta, bu da ülkemizi süs bitkileri açısından avantajlı bir konuma yükseltmektedir (Gümüş 2015). Türkiye'de bulunan endemik türlerden Türkiye florasında, 26 cinse bağlı 540 geofit türü bulunduğu kaydedilmektedir (Kaya ve Aksakal 2005, Özhatay ve Byfield 2005, Özel ve Erden 2010, Özhatay ve ark. 2011). Geofit adı verilen ve soğan, tuber, rizom gibi toprak altı organlarına sahip olan soğanlı bitkiler Türkiye'deki biyoçeşitliliğin oluşmasına önemli katkılar sağlamaktadır. Süs bitkisi olarak değerlendirilmek üzere yurtdışına gönderilen soğan ve yumruların %90'lık kısmı doğadan sökülmemekte olup, geriye kalan %10'luk kısmı ise kültürü



yapılan türlerden oluşmaktadır. Her yıl doğadan yapılan sökümler doğal populasyonun hızla azalmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da ülkemiz geofitleri yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır (Ekim ve ark. 1992, Ildır 1993, Sandal ve Söğüt 2010, Kahraman ve Özzambak 2015). Soğanlı bitkilere ait ihtiyaç duyulan bitkisel materyalin karşılanması, doğadan toplama yerine yeterli miktarda üretim yapılarak doğayı korumanın gerekliliği de gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır.

Ülkemizde doğal olarak yetişen bitkilerden hem ülke içinde yararlanılmakta hem de bir kısmı ihraç edilmektedir. Bu tür zenginliği içinde yer alan ve ihraç edilen geofit bitkiler içinde yeri büyüktür. Yurdumuz geofitlerinin büyük kısmı Zambakgiller (*Liliaceae*), Nergisgiller (*Amaryllidaceae*) ve Süsengiller (*Iridaceae*) familyaları kapsamında bulunurken, bu familyalar endemik türler bakımından da oldukça zengindir (Titiz ve ark. 2000). Nergisgiller (*Amaryllidaceae*) 85 cinsine ait 1100 türü içeren, özellikle *Pancretium maritimum* L. (Kum zambağı) gibi bazı türleri Avrupa ve Amerika'da bulunan bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilen bir familyadır. Bu familya Türkiye'de yurt dışı kaynaklı olup süs bitkisi olarak çoğaltılanlar hariç 5 cinsine ait 28 tür ve 33 taksonla temsil edilmektedir (Muhtar ve Şener 1997, Güner ve ark. 2000, Gümüş 2015). Nergisgiller familyasına dahil olan türler, genellikle dekoratif amaçlı kullanılmaktadır. *Pancretium*, Nergisgiller familyasına ait bir cins olup dünyada 21 türü bulunmaktadır (Anonim 2016). *Pancretium* cinsine ait türlerden Türkiye'de doğal olarak yetiştiği bilinen ve kayıt altına alınan tek tür *P. maritimum*'dur (Baytop 1984). Kum zambağı, isminden de anlaşıldığı gibi kumul alanlarda yayılış göstermekte olan, önemli biyolojik zenginliklerimizden biridir. Kum zambağının dekoratif bir bitki olmasının yanı sıra bitkide bulunan alkaloidler ve flavonoidlerin tıbbi olarak özellikle kanser tedavisinde kullanılması, bitkinin değerini daha çok artırmaktadır (Ioset ve ark. 2001).

Kum zambakları ülkemizde; Trakya bölgesi (Kırklareli ve Tekirdağ), İstanbul, Bolu, Bartın, Sinop, Samsun, Giresun, Trabzon, Antalya, Mersin, İzmir ve Adana'nın kumul sahillerinde doğal olarak bulunmaktadır (Davis 1984, Yaltırık ve Efe 1996, Gümüş 2015). Kum zambağı nesli tehlike altında bulunan bir türdür. Kum zambağının, doğal yaşam alanı olan kumul sahillerin plaj olarak kullanılması, plansız bir şekilde turizme yönelik sahillerin kapatılması, bitki soğanlarının toplanması nedeni ile doğal yaşam alanında gelişmesi tehlike altındadır. 'Sürdürülebilir Kalkınma' stratejisi, doğal kaynakların kullanılmasını yasaklamak yerine bu kaynaklara zarar vermeden uzun yıllar kullanma yollarının araştırılmasını hedeflemektedir. Hem ekonomik hem de çeşitlilik açısından büyük öneme sahip olan kum zambağında gen kaynaklarını koruma ve uygun üretim çalışmalarının yapılabilmesi için moleküler çalışmalarla genetik yapının belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Biyolojik

çeşitliliğin önemli bileşenlerinden biri olan genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ekosistemin sağlıklı olabilmesi ve sürdürülebilirliği için önemlidir. Bu bitkinin doğal populasyonlarının azalmasının önüne geçebilmek için hem geleneksel hem de biyoteknolojik yöntemlerle koruma ve üretim çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmakta ve yapılan çalışmaların moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında Tekirdağ, Kırklareli, İzmir ve Antalya illerinden toplanan 4 doğal kum zambağı populasyonunun nükleer mikrosatellit belirteçleri (nSSR) kullanılarak genetik yapısının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasında;

- 1) 4 farklı kum zambağı populasyonunun ilgili nükleer mikrosatellit lokusları (nSSR) açısından genetik yapılarının ortaya konulması,
- 2) Çalışılan populasyonların genetik parametrelerinin tahmin edilmesi ile genetik çeşitlilik düzeylerinin belirlenmesi,
- 3) Çalışılan populasyonların nSSR belirteçleriyle belirlenen genetik çeşitlilik düzeylerinin literatürde mevcut olan diğer çalışmalarla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Soğanlı Bitkilere Genel Bakış

Soğanlı bitkiler; yılın büyük bir kısmını yeraltında, yani toprak içinde soğan, yumru ve rizom şeklinde geçirmelerine rağmen, ilkbahar ve sonbahar aylarında albenili çiçekler açan; dekoratif ve/veya tıbbî ve aromatik amaçlarla kullanılabilen ve "geofit" olarak adlandırılan bitkilerdir (Şekil 2.1). Bu bitki grubu gerçek soğan, yumru, corm ve rizomlardan oluşmaktadır. Soğan ya da yumrunun en geniş bölgesine "çap" denir. Bu bitkiler genellikle geç sonbaharda ve erken ilkbaharda çiçeklenmektedir. Bu durum bu aylardaki sınırlı olan çiçek çeşitliliğinin artmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda baharın yaklaşmakta olduğunun müjdesini de vermektedir. İlkbaharda çiçek açanlar soğuklara dayanıklı, çiçek açmak için soğuklanma ihtiyacı duyan ve sonbaharda dikilmesi gereken türlerdir. Yazın çiçek açanlar ise düşük sıcaklıklarda zarar görür ve ilkbaharda dikilirler (Arslan ve ark. 2002).



Şekil 2.1. Soğanlı bitkilerden zambak (*Lilium* spp.) soğanları

Soğanlı bitki türünün yayılma alanının geniş veya dar olması bize önemli bilgiler verir. Ama eğer türün yetiştiği alan dar ise bitkinin spesifik çevre koşullarında yetiştiği ve yetiştiriciliğinin kolay olmadığı söylenebilir. Soğanlı bitkiler topraktan çıkarıldıktan sonra uygun koşullarda (sıcaklık ve nem gibi) depolanmalıdır. Her türün kendine özgü depolama sıcaklığı ve nem isteği vardır. Soğanlarda muhafaza süresini belirleyen en önemli kriterlerden birisi klorofil kaybına bağlı olarak meydana gelen sararmadır. Bu ürünlerde, renkte meydana gelen bu değişimler ürün bünyesinde üretilen etilen ve ürünün bulunduğu ortamdaki etilen nedeniyledir (Toivonen ve Sweney 1998).

### **2.1.1 Soğanlı bitkilerin kullanım alanları**

Soğanlı bitkilerin genel olarak besin, baharat ve süs bitkisi olarak kullanımını çok eskilere dayanmaktadır. Bunların yanı sıra soğanlı bitkiler, hem süs bitkisi olarak, hem de kozmetik, parfümeri ve ilaç gibi çeşitli sanayi alanlarında da büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir. Türkiye'nin hemen hemen tüm bölgelerinde doğal olarak yetişirler. Türkiye'de bulunan geofit bitki türleri tarla açmalar ve aşırı otlatma, sanayileşme, tarımsal mücadeleler, orman yangınları, karayollarının yol genişletme ve yeni yol açma faaliyetleri, izinsiz toplayıcılar ayrıca da ihracat ürünü olarak kullanılması nedeniyle tehdit altındadır (Ekim ve ark. 1989). Soğanlı bitkilerin süs bitkisi olarak değerlendirilmelerinin dışında modern tıpta da bu bitkilerden faydalanılmaktadır. Soğanlı bitkilerden özellikle kum zambaklarının estetik görünümü ve güzel kokusunun yanı sıra, yapısında bulundurduğu alkaloidler sebebiyle tıp alanında da kullanılıyor olması; bu alanda daha detaylı çalışmalar yapılması için itici güç niteliği taşımaktadır (Nikopoulos ve ark. 2008, Rokbeni ve ark. 2016).

### **2.1.2 Soğanlı bitkilerin yetiştirilmesi**

Soğanların dikim derinlikleriyle ilgili genel kural, soğanın boyunun iki katı derinliğe dikilmeleri gerektiğidir. Küçük canlı çiçek soğanları, birbirlerine yakın olacak şekilde (yaklaşık 10'ar cm aralıklarla), daha büyük soğanlar ise yaklaşık 12-13 cm aralıklarla dikilebilirler. Bu dikim derinlikleri ortalama bir değer niteliğinde olup, türlere göre farklılıklar göstermektedir. Alınacak soğan tam büyüklükte olmalıdır. Soğan ne kadar büyük olursa, bitki o yıl o kadar güzel ve gösterişli çiçek verir. Ezik ve yumuşak soğanlar, hastalıklı ya da zarar görmüş olabilir; bu nedenle alınmamalıdır. Kökleri gelişmeye başlamış olanlar ise dinlenme (uyku) dönemini atlatmış olacağından, dikim için gecikmiş sayılır. Çiçek kalitesi düşük olacak bu tür soğanlar, alınmamalı ve dikilmemelidir (Alp 2016). Soğanların pek çoğu aynı zamanda çok yıllık bitkiler olduklarından toprakta yerlerinde bırakılabilir ve bir sonraki sene de çiçeklenmeleri beklenebilir.

### **2.1.3 Soğanlı bitkilerin Türkiye biyoçeşitliliğindeki rolü**

Türkiye florasında bulunan, geofit adı verilen ve soğan, tuber, rizom gibi toprak altı organlarına sahip olan soğanlı bitkiler, Türkiye'deki biyoçeşitliliğin oluşmasına önemli bir katkı sağlamaktadır (Özel ve Erden 2010). Soğanlı bitkilerin tohumdan çiçek açacak konuma gelmesi için 4-5 yıl gibi uzun bir zamanın geçmesi gerekir. Farklı kullanım alanlarına sahip olan bu bitkilere ihtiyacın sürekli artması, doğadan olan sökümlerin de artmasına yol

açmaktadır. Bu da soğan ile çoğalan bitkilerin doğadaki stoklarının azalmasına neden olmaktadır (Karaoğlu 2010). Önlem alınmadığı takdirde bu bitkilerin neslinin tükenmesi söz konusu olacaktır (Özhatay ve ark. 2011).

Birçok soğanlı bitki türü çeşitli tehlike kademelerinde bulunmakta olup, bazılarının doğadan sökümü yasaklanmıştır (Çizelge 2.1). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 1989 yılında çıkarılan yönetmelik 1991, 1995, 2005, 2013 ve 2015 yıllarında yeniden düzenlenerek yayınlanmıştır. Bu yönetmelik ile ülkemiz florasının korunması, çiçek soğanlarının tahrip edilmeden ve tüketilmeden doğadan toplanması, üretilmesi, depolanması ve ihracatı konuları disiplin altına alınmıştır. Bu yönetmeliğe göre Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından oluşturulan teknik komite her yıl ihracatı yapılan çiçek soğanlarının cins, tür, miktar, doğa kontenjanı, söküm takvimini belirlemekte ve hazırlanan doğal çiçek soğanı ihracat listesi de her yıl Ekim-Kasım aylarında resmi gazetede tebliğ edilmektedir. Bu listenin dışında teknik komitenin izni olmadan doğadan ticari amaçlarla çiçek soğanı toplayıp ihraç etmek yasaktır (Anonim 2015).

Anadolu'daki soğanlı bitkilerin, 15. yüzyıldan bu yana yabancı ülkelere gönderilmek amacıyla toplandığı bilinmektedir. Zamanla, toplu kıyım dönüşen bu sürecin önlenmesi amacıyla yetiştirme çalışmaları başlatılmış; örneğin beyaz zambağın tamamen üretilerek dış ülkelere satılması aşamasına gelinmiş, gölsoğanı, kardelen, terslale ve Adıyaman lalesinin üretiminde de gelişmeler sağlanmış, konuyla ilgili hukuki düzenlemeler yapılmıştır (Anonim 2015).

#### **2.1.4 Nergisgiller (*Amaryllidaceae*) familyası ve önemi**

Nergisgiller (*Amaryllidaceae*) familyasından kardelenler (*Galanthus*), göl soğanı (*Leucojum aestivum*), karaçiğdem (*Stenbergia lutea*); zambakgiller (*Liliaceae*) familyasından beyaz zambak (*Lilium candidum*), terslale-ağlayan gelin (*Fritillaria imperialis*), Adıyaman lalesi (*Fritillaria persica*), çoban lalesi (*Tulipa humilis*); düğünçiçeğigiller (*Ranunculaceae*) familyasından sarıkokulu (*Eranthis hyemalis*); yoğurtçiçeği (*Anemone blanda*); çuhaçiçeğigiller (*Primulaceae*) familyasından ise sıkklamen (*Cyclamen* spp.) ve süsengiller (*Iridaceae*) familyası soğanlı bitkilerin yaygın bilinen örnekleridir (Davis 1984).

Nergisgiller familyası; *Asparagales* takımına ve *Liliopsida* (tek çenekliler) sınıfına aittir. Toprak altında soğan veya rizomları bulunan çok yıllık otsu bitkileri kapsayan bu familyanın üyelerinde, yapraklar genellikle şeritsi, bazen etli, sert ve liflidir. Çiçekler çoğunlukla şemsiyeye benzer durumlarda toplanırlar. Çiçek örtüsü altı parçalıdır. Taç yapraklarının iç kısmında ayrı bir taç vardır. Bu familyaya dahil olan tüm türlerde

pankratistatin, nivalin, galanthamin, tazettin ve likorenin gibi sayısı 150'yi bulan ve "Amaryllidaceae alkaloidleri" olarak adlandırılan alkaloidler bulunmaktadır (Şener ve ark. 2003). Bu alkaloidlerin biyolojik aktiviteleri yüksek olup, yapılarına göre antikanser, antiviral, antimikrobiyal, antileukaemial ve savunma sistemini güçlendirici etkilere sahip oldukları bilinmektedir (Koyuncu ve ark. 1993, Şener ve ark. 1999).

**Çizelge 2.1.** Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2015 yılı için doğadan toplanarak ihracatı yasak olan 20 çiçek soğanı (doğal çiçek soğanlarının 2015 yılı ihracat listesi hakkında tebliğ (tebliğ no: 2014/56)in ekinde düzenlenmiştir)

1. <i>Allium</i> (Yabani soğan) türlerinin hepsi
2. <i>Crocus</i> (Çiğdem) türlerinin hepsi
3. <i>Fritillaria</i> türleri ( <i>F. persica</i> , <i>F. imperialis</i> hariç)
4. <i>Lilium</i> (Zambak) türleri ( <i>L. candidum</i> ve <i>L. martagon</i> hariç)
5. <i>Muscari</i> (Muskari) türlerinin hepsi
6. <i>Sternbergia</i> (Kara çiğdem) türleri ( <i>S. lutea</i> hariç)
7. <i>Tulipa</i> (Lale) türlerinin hepsi
8. <i>Eminium</i> türlerinin hepsi
9. <i>Biarum</i> türlerinin hepsi
10. <i>Nymphaeaceae</i> (Nilüfer) familyasına dahil türlerin hepsi
11. <i>Orchidaceae</i> (Salep) familyasına dahil türlerin hepsi
12. <i>Arum</i> (Yılanyastığı) türlerinin hepsi ( <i>Arum italicum</i> , <i>Arum dioscorides</i> hariç)
13. <b><i>Pancratium maritimum</i> (Kum zambağı)</b>
14. <i>Hyacinthus orientalis</i> (Şark sümbülü)
15. <i>Gentiana lutea</i> (Censiyan)
16. <i>Cyclamen</i> (Sıklamen) türleri ( <i>C. coum</i> , <i>C. cilicium</i> ve <i>C. hederefolium</i> hariç)
17. <i>Galanthus</i> (Kardelen) türleri ( <i>G. elwesii</i> ve <i>G. woronowii</i> hariç)
18. <i>Iris</i> (Süsen) türleri
19. <i>Paeonia</i> (Şakayık) Türleri
20. Diğer yumrulu ve soğanlı türler

## 2.2 Kum zambağına (*Pancretium maritimum*) Genel Bakış

Kum zambağı, Nergisgiller (*Amaryllidaceae*) familyasına ait, özellikle Akdeniz kumullarında yetişen, çok yıllık, soğanlı bir bitki türüdür (Şekil 2.2). Güzel kokulu ve zarif görünümlü beyaz çiçekleriyle süs bitkisi olarak, içerdiği kimyasallar ve alkaloidler ile de tıbbi anlamda önem taşımaktadır (Petit ve ark. 1995, Georgiev ve ark. 2011, Sanaa ve ark. 2012, Di Maio ve De Castro 2013).



Şekil 2.2. İzmir Pamucak Sahili'ndeki kum zambaklar

Cins adı *pancratium*, Yunanca “bütün, hep” demek olan *pan* sözcüğü ile "güçlü" demek olan *cratys* sözcüklerinin birleştirilmesi ile oluşmuştur. *Maritimum* ise Latince kökenli olup "denize yakın, denize ait" anlamındadır.

Cins adındaki "güçlü" sıfatına yakışır bir biçimde tıbbi açıdan çok önemli bitkilerdir. Arizona Eyalet Üniversitesi Kanser Araştırma Enstitüsü'nde yapılan bir araştırmada kanser tedavisinde etkili bir madde olan *Pancreatistain*'in, kum zambağında bulunduğu tespit edilmiştir (Petit ve ark. 1995).

Anavatanı Akdeniz bölgesi olan kum zambağı, Akdeniz havzasında yer alan ülkeler ile Güneybatı Avrupa'da, Atlantik, Karadeniz ve Hazar denizinde doğal olarak yayılış göstermektedir (Dothan 1986). Dünyada Yunanistan, Fransa ve İspanya sahillerinde bulunan kum zambağı; ülkemizde Kırklareli, Tekirdağ, İstanbul (Kilyos-Şile sahil şeritlerinde), Bolu, Bartın, Sinop, Samsun, Giresun, Trabzon, Antalya, Mersin ve Adana'nın kumlu sahillerinde doğal olarak bulunmaktadır (Davis 1984, Yaltrık ve Efe 1996). İngilizce'de yaygın adları "sea daffodil (deniz nergisi/deniz gülü)" ve "sand lily (kum zambağı)"dir (De Felice ve ark. 2013).

Kum zambakları genellikle denize birkaç metre uzaklıkta olan bölgelerde görülmektedir. Dipten çıkan uzun mızrağı andıran 40 cm boyuna ulaşabilen yapraklarını kışın dökmez. Bütün yıl plaj kumlarının altında beklerler ve yaz ortasında çok hızlı bir gelişmeyle çiçeklerini açarlar. Çok yıllık, soğanlı ve yumrulu, genişçe uzun şeritsi yapraklı, yaklaşık 40-45 cm boyunda, beyaz çiçekli ve çiçek sayısı 3 ila 15 arasında değişen bir bitkidir. Çiçeklenme zamanı Ağustos ve Ekim ayları arasındadır. Ekstrem iklim koşullarına ve tuzluluğa dayanıklı, güneşi seven bir bitkidir. Diploid kromozom sayısı  $2n=22$ 'dir (Fernandez ve ark. 2000, Şenel ve ark. 2002).

Kum zambağı çiçekleri güzel kokuludur ve en çok geceleri koku salar. Kum zambağı, kışın en fazla  $-10^{\circ}\text{C}$  soğuğa kadar dayanabilir. Yaz sıcaklarında susuz kalınca veya kışın don olaylarında yapraklar tamamen kuruyabilir; fakat fazla bir zararı yoktur. Bunlar olmadığında tüm yıl yeşil kalır ve soğanlar daha güçlü olup daha fazla gelişirler. Bir geofit olan kum zambağı kışı istirahat halinde geçirmekte olup aşırı yaz sıcaklarında su ihtiyacını atmosfer neminden ya da gece oluşan çiğden sağlayabilmektedir. Ayrıca denizden gelen taban suyunu da kullanabilmekte olup, dolayısıyla tuz toleransı yüksek bir türdür. Türün nesli tehlike altındadır ve Türkiye'deki tehdit, ihraç amacıyla sökümden çok, kıyıların bilinçsiz bir şekilde kullanıma ve kentleşmeye açılması, bu bitkilerin tahrip edilmesi şeklindedir (Gümüş 2015). *Panocratium maritimum* türünde yapılan birçok çalışmada, türün doğal yayılış alanında özellikle Akdeniz'in kumul sahillerinde aşırı derecede toplanması, kentleşme ve turizm nedeni ile ciddi bir şekilde tehdit altında olduğu bildirilmektedir (De Castro ve ark. 2012, Di Maio ve De Castro 2013). Türün İtalya, Fransa, İspanya ve Girit'teki populasyonları büyüklük ve sayı açısından önemli derecede azalmıştır ve tehlike altında kategorisinde kabul edilmektedir (Zahreddine ve ark. 2004). Hem doğanın korunması hem de ekonomik açıdan önem taşıyan bitki türlerimizin geleceği doğal yaşam alanlarının tahrip edilmesi ve doğadan aşırı toplama gibi nedenlerle tehdit altında bulunmaktadır.

Eisikowitch ve Galil (1971) *P. maritimum* bitkisinin yabancı tozlanan bir bitki türü olduğunu, çiçeklerinin döllenmesinin özellikle *Lepidoptera* ve *Sphingidae* üyesi kelebekler ve böcekler tarafından yapıldığını belirtmiştir. Grassi ve ark. (2005) ise tozlanmanın bölgelerdeki farklı organizmalara bağlı olduğunu ve değişiklik gösterdiğini ifade etmektedir. Kahraman (2016) tarafından yapılan çalışmada 4 arı (*Hymenoptera*) türü (*Xylocopa violacea* L., *Anthophora* sp., *Apis mellifera* L., *Anthophora bimaculata* Panzer) ve 1 güve (*Lepidoptera*) türünün (*Agrius convolvuli* L. syn. *Herse convolvuli* L.) tozlaşmada etkili olduğu bildirilmiştir.

İçerdiği 150'den fazla alkaloid bakımından tıbbi bir bitki niteliği taşımakta ve ilaç yapımında kullanılmaktadır. *Panocratium* türleri ekonomik öneme sahip oldukları gibi tıbbi bitki



olarak önemli potansiyele sahiptir. Bazı türleri süs bitkisi olarak kullanılırken, bazıları da çok değerli alkaloidlerinin kansere karşı kullanılan ilaçlarda yer alması nedeniyle kıymetlidir (Ioset ve ark. 2001). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın listesine dahil olan kum zambağı bitkisi dekoratif bir bitki olmasının yanı sıra bitkide bulunan pankratistatin alkaloidinin tıbbi açıdan kanser tedavisinde kullanılması da bitkinin önemini daha çok artırmaktadır (Petit ve ark. 1995, Di Maio ve De Castro 2013). Bu bitkinin Türkiye için bir gen kaynağı olması ve gelecekte milli ekonomiye büyük oranda katkı sağlamasından dolayı doğal yetişme alanlarında korunmalı ve çoğalması sağlanmalı, kum zambaklarının doğal yayılım gösterdikleri bölgelerde halk bilinçlendirilmelidir.

### **2.2.1 Kum zambağının yaşam döngüsü**

Kum zambağı bitkisi, çimlendikten 3-4 yıl sonra çiçek açar ve çiçek tozlaşır. Tozlaşmanın ardından büyük bir tohum kapsülü şeklindeki meyve oluşur. Olgunlaşan her bir kapsülün içinde belirli bir şekle sahip olmayan, 10-40 arası sayıda, kömüre benzeyen, siyah renkte tohumlar bulunur. Kapsülün açılmasıyla birlikte bu tohumlar serbest kalır. Tohumlar, dış kabuk dokularının süngerimsi olması nedeniyle çok hafiftir. Bu hafiflik sayesinde suda yüzebilirler ve rüzgarda savrulurak kilometrelerce uzaktaki başka bir plaja taşınabilirler. Tohumlar uygun bir plaj kumulu bulur bulmaz çimlenirler. Çimlenen tohumlar 3-4 sene boyunca olgunlaşarak güçlü soğanlar oluştururlar. 3-4 yıl sonra ise bitki yeniden çiçeklenir ve tozlaşarak yaşam döngüsünü tamamlamış olur (Anonim 2014).

### **2.2.2 Yapraklanma ve Çiçeklenme**

Çiçeklerden önce görülen mavimsi yeşilimsi renkli kum zambağı yaprakları, geniş, şeritsi ve etli yapıdadır. Bu yapraklar tek yıllıktır (Gümüş 2015). Yani her yıl bahar aylarında ortaya çıkarlar ve yaz veya sonbaharda kuruyarak yok olurlar. Fakat hava şartları uygun olup susuz kalmadığı takdirde yapraklar daha uzun süre yaşayabilir. İlbaharda havaların ısınmasıyla birlikte, kum zambağı yeni yapraklar oluşturmaya başlar. Yazın susuz kalmazsa yapraklanma yavaş yavaş devam eder. Çiçek açtıktan sonra ise yaprak sayısı maksimum düzeye çıkar. Kış boyunca yaprakların çoğu bozular. İlbaharda yeniden yapraklanırken eğer yaz sıcaklarında susuz kalırsa, tüm yapraklarını kaybedebilir; fakat yaz sonunda çiçeklendiği zaman tekrar yapraklanır. Etlili yapraklar, büyüme mevsimi boyunca fotosentezle soğanın büyümesini ve besin depolamasını sağladıktan sonra, Haziran-Temmuz ayları arasında yavaş yavaş kururlar (Anonim 2014).

Nisan-Mayıs aylarında çok sayıda taze etli yaprak bulunduğu için, bitki bu aylarda daha kolay farkedilir. Yaprakların boyları bitkinin bulunduğu şartlara göre değişmekle beraber; genellikle 10-60 cm arasındadır ve genişlikleri 2-4 cm arasında değişir. Yaprakların alt yüzü ve üst yüzü aynı olup, sırt-kenar doğrultusunda yassılaşımaktadır. Bu nedenle yaprakların orta kısmı kenar kısımlarına göre daha kalındır. Yaprakların uç kısmı nispeten sivri, kenarları ise düzdür (Anonim 2014).

Çiçeklenme Temmuz sonu ile Ağustos sonu arasında başlar ve Ekim ayına kadar devam eder. Kum zambakları günde en az 4 saat çok kuvvetli güneş ışığı almak isterler. Bunun dışındaki saatlerde de, gündüz boyunca yeri son derece aydınlık olmalıdır, yoksa çiçek açması beklenemez. İlkbahar ortasından itibaren şiddetli güneş ışığını 2 ay kadar hissettikten sonra çiçeklenir (Davis 1984).

Saksılarda yetiştirilenler, doğadakilere göre daha erken ve çok çiçeklenebilirler (bakıma göre değişir). Tek bir soğan; büyüklüğüne ve gücüne göre peş peşe 2 çiçek sapı çıkarabilir, pek güçlü değilse sadece tek bir çiçek sapı çıkarır. Çiçek sapları 5-13 mm'dir. Kum zambağının gösterişli çiçekleri, üzerinde yaprak bulunmayan bir sap üzerinde bulunur. Bu sapların boyu ise 10-40 cm arasında değişir. Yeşil renkli olan bu saplar silindirik şekilli olup uca doğru incelen bir yapıya sahiptir. Bu sapların ortası genellikle doludur. Tek bir sapın üzerinde 3-10 arasında çiçek bulunur. Bu çiçekler "şemsiye (umbrella)" adı verilen bir çiçek durumu oluştururlar. Çiçek örtüsü parçaları şeritsi-mızraksı şekildedir (Gümüş 2015).

### **2.2.3 Soğan yapısı**

Doğada, soğanı kendisini 30 cm derine çekmekte ve köklerini de 1 metreden daha derinlere uzatmakta; böylece alt tabaka toprağa kadar ulaşabilmektedir. Derinlere inen kökler, gerekli mineralleri bulabilmektedir. Kuraklığa ve ekstrem koşullara dayanıklı olmaları da bu sayededir. Soğanlı gövde, ilkbaharda (Mart-Nisan gibi) uzun etli yapraklar çıkar. Her yıl ya besin depolamış olan soğanlar gelişir ya da tohumdan çimlenme ile yeni bitki gelişimi devam eder. Soğanların gelişimiyle ortaya çıkan bireyler, tohumdan çimlenen bireylere göre daha bol yapraklıdır ve daha geniş koloni oluştururlar (Anonim 2014). Kum zambağı soğanları küremsi oval şekilde, kahve renkli, 14-16 cm çevre uzunluğunda ve tuniklidir (Gümüş 2015).

### **2.2.4 Toprak isteği**

Kum zambakları ekstrem iklim koşullarına ve kumul, kurak koşullara çok dayanıklıdır (Meerow ve ark. 2002). Kum zambağı bir güneş bitkisidir. Bu nedenle kumulların ıslak

olmadığı, kararlı (stabil) kumullarda ve diğer bitki türlerinin zayıf olduğu açık alanları tercih etmektedir (Şekil 2.3) (Anonim 2014).

*P. maritimum* ile birlikte yayılış gösteren bazı bitki türlerinden özellikle odunsu olanlar, kum zambağı için “koruyucu” görev yapmaktadır. Şöyle ki, daha iri yapılı ve yoğun yapraklı olan bu odunsu türler kumul hareketini nispeten durdurmakta, dolayısıyla soğanların ya açığa çıkmasını ya da daha derinlere gömülmesini engelleyerek kum zambağının gelişmesine mikro-habitat hazırlamaktadır (Anonim 2014).



**Şekil 2.3.** Kum zambağının doğal yaşam alanı (Pamucak Sahili, İzmir)

### 2.2.5 Meyveler ve tohumlar

Meyveleri kapsül şeklinde ve elips yapıdadır, olgunlukta açılırlar (Medrano ve ark. 2000, Anonim 2012). Kum zambağı tohumları siyah renkte ve son derece hafiftirler (yaklaşık 4-8 mg), anemokori (rüzgârla taşınma) ve hidrokori (suyla taşınma) için özelleşmişlerdir (Werker ve Fahn 1975, Keren ve Evenari 1974). Tohumlar süngerimsi yapıları ve hafif olma özelliklerinden dolayı, su yüzeyinde batmadan kalabilmektedirler. Deniz suyu içerisinde yaklaşık 50 gün bozulmadan yüzebildikleri tespit edilmiştir (Keren ve Evenari 1974). Tohumlar Kasım ayından itibaren olgunlaşarak dökülür. Tohumun yayılmasında rüzgâr ve kum hareketleri önemli rol oynar (Gümüş 2015).

### 2.2.6 Çoğalma şekilleri

Kum zambakları iki şekilde çoğalmaktadır. Soğan yoluyla çoğalmada ergin bitkinin toprak altında bulunan büyük soğanlarının yanında oluşan küçük soğanlar yeni bitkilerin oluşmasını sağlamaktadır. Rüzgâr ve çeşitli nedenlerle ya da kum hareketleriyle yer değiştiren soğanlar uygun ortamlarda gelişerek yeni bireyler meydana getirmektedir. Tohum yoluyla

çoğalma da olgunlaşan ve serbest kalan tohumlar hafif oldukları için rüzgârla kolayca başka yerlere yayılırlar. Yayılan tohumlar bir sonraki yılın ilkbaharında çimlenirler. Polenleri ise ya rüzgârla (anemofil) ya da arı ve böceklerle (entomofil) dağılmaktadır (Gümüş 2015).

### **2.3 Mikrosatellitler (Basit Dizi Tekrarları) ve Kullanım Alanları**

Populasyon genetiği çalışmalarında kullanılmak üzere bilim adamları tarafından DNA tabanlı genetik belirteçler (SSR, RFLP, PCR-RFLP, AFLP, RAPD, STR gibi) geliştirilmiştir. Genetik çeşitlilik ve karakterizasyon, akrabalık araştırmaları gibi moleküler seviyede yapılan çalışmalarda kullanılan en hızlı ve etkili metotlardan birisi, mikrosatellitlerin veya basit dizi tekrarlarının (SSRs) çeşitliliğinden faydalanmaktır. Yüksek yapılı organizmaların genomlarında bulunan basit tekrarlı diziler; satelit DNA'lar, minisatellitler ve mikrosatellitler olmak üzere 3 çeşittir (Ellegren 1993). Genomda bir lokusta arka arkaya gelen rastgele tekrar dizilerine kısa ardışık tekrarlar (STR-“Short Tandem Repeat”) denilmektedir. STR'lerin 1–6 bç tekrarlarından oluşmuş belirteçler ise mikrosatellit markörler veya basit dizi tekrarları (SSR-“Simple Sequence Repeat”) olarak isimlendirilmektedir (Weber ve May 1989, Liu 1998). Mikrosatellitlerin avantajları arasında yer alan yeniden üretilebilirlik, çok allellik, kodominant kalıtım ve bol miktarda genom kapsama gibi özellikler nedeniyle SSR belirteçleri populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan yüksek etkili moleküler araçlardır. SSR belirteçleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı genetik belirteçler olup araştırılan gen-içi ve/veya genler-arası bölgelerdeki tekrar sayısındaki farklılıkların belirlenmesine dayanmaktadır. Mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesinde, çalışılan tekrarlı bölgenin veya lokusun yan bölgelerine komplementer primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır ve elde edilen parçalar (fragmentler) elektroforetik olarak analiz edilir (Anzidei ve ark. 1999, Scotti ve ark. 1999, Bandelj ve ark. 2004, Varshney ve ark. 2005).

Mikrosatellitler içerisinde en yaygını dinükleotid (örneğin ATATAT) tekrarlardır ve yüksek organizmalara ait kromozomlar üzerinde bol ve rastgele bir dağılım gösterirler (Tautz 1989). Yaygın olarak 2 nükleotidli tekrarlardan [(CA)<sub>n</sub>] oluşmakla birlikte farklı formlarda da [(TG)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub>, (TAT)<sub>n</sub>, (AAT)<sub>n</sub>] bulunabilmektedirler (Ellegren ve ark. 1997, Orti ve ark. 1997, Bruford ve ark. 2003). Burada, "n" toplam tekrar sayısını ifade eder ve toplam tekrarlanan dizin sayısı en az 10'dur. (AT)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub> ve (AAT)<sub>n</sub> gibi tekrarlar bitkilerde çok yaygındır (Akkaya ve ark. 1992, Hancock 1998, Navascues ve Emerson 2005, Oliveira ve ark. 2006, Semagn ve ark. 2006).

Mikrosatellitler temel olarak tüm populasyon içerisinde benzer özellikler göstermesine rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar göstermektedirler (Catherine ve ark. 1992).

Mikrosatellitlerin belirli bir tür içerisinde polimorfik olmaları ve temelde benzer olmasına rağmen bireyden bireye küçük farklılıklar içermeleri, moleküler genetik alanında belirteç olarak kullanılmalarını uygun hale getirmektedir (Ün ve ark. 2000). Polimorfizm, kaynağını tekrar sayısından alır ve aynı sayıdaki tekrarları temsil eden her bant, farklı bir allele işaret eder (Schlotterer ve Tautz 1993). Moleküler belirteç sistemlerinin aranan özellikleri, yüksek polimorfizm, kodominant kalıtım, genomda sık dağılım gösterme, hızlı sonuç alma, tekniğin kolay uygulanması, düşük maliyetli ve tekrarlanabilir olmasıdır (Gökdoğan ve Kaya 2015). Mikrosatellitlerin tek bir lokusta pek çok allelin tanımlanmasına izin vermesi, genom boyunca dağılmış olmaları, popülasyon genetiği ile ilgili detaylı bilgi vermesi, kodominant olmaları, yüksek derecede polimorfik, spesifik ve oldukça tekrarlanabilir olmaları, gereksinim duyulan DNA miktarının az olması, ucuz ve kolay olmaları gibi özellikleri avantajları arasındadır (Gillet 1999, Robinson ve Harris 1999, Scotti ve ark. 1999, Bandelj ve ark. 2004, Park ve ark. 2009, Abdel-Mawgood 2012, Özşensoy ve Kurar 2012). SSR belirteçleri popülasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Powell ve ark. 1996).

Mikrosatellit analizlerinin pek çok avantaj sağlamasının yanı sıra, bazı dezavantajları da söz konusu olabilir. Bunlardan ilki; SSR analizleri sırasında "null (geçersiz)" allellere rastlanmasıdır. Bu alleller amplifiye olmadıkları için jelde görülmezler. Bu sebeple heterozigotların eksik değerlendirilmesine neden olabilirler. Ancak, bu durum sıklıkla rastlanılan bir durum değildir (Robinson ve Harris 1999, Scotti ve ark. 1999, Varshney ve ark. 2005). Mono ve di-nükleotid tekrarların analizinde amplifikasyon sırasında DNA polimerazın yanlışlıkla farklı büyüklüklerdeki ürünler vermesi, SSR analizlerindeki bir diğer dezavantajdır. Bu ürünler çoğunlukla istenilen veya çalışılan bölge ürününden daha az yoğun olmakta ve göz ardı edilmektedir. Bununla birlikte, heterozigot bireylere ait farklı ürünlerde (istenilen ve yanlışlıkla çoğaltılan) çakışma olursa istenilen bölge ürününün ayrıştırılması zorlaşmaktadır. Daha önce çalışılmış ve bant büyüklüğü bilinen iç standart kullanılması bu problemi çözülebilir (Robinson ve Harris 1999, Scotti ve ark. 1999, Oliveira ve ark. 2006).

Mikrosatellit bölgelerinin belirlenmesi, izolasyonu, dizi analizleri ve belirteçlerin denenmesi, zaman ve uzmanlık gerektiren pahalı bir işlemdir. Etkin bir şekilde yeni primerlerin elde edilmesi için; kaynakların taranarak uygun primerlerin tespit edilmesi, veri bankalarındaki dizilerden yararlanarak yeni primerlerin dizayn edilmesi, primer geliştiren alanında uzman bir araştırma laboratuvarı ile birlikte çalışılması gerekmektedir (Scotti ve ark. 1999, Varshney ve ark. 2005).

## 2.4 Kum zambağında Yapılmış Çalışmalar

Literatürde, birçok farklı soğanlı bitki türü üzerine yapılmış biyoteknolojik çalışmalar mevcuttur. Kum zambağında da farklı araştırmacılar tarafından moleküler teknikler kullanılarak genetik çeşitlilik çalışmaları, mikroçoğaltım ve klasik ıslah çalışmaları, kimyasal içerik ve eczacılıkla ilgili çalışmalar yapılmıştır.

### 2.4.1 Genetik çeşitlilik çalışmaları

Kum zambağında genetik çeşitlilik, genetik karakterizasyon, eşleşme sistemi ve gen koruma stratejilerinin belirlenmesi konusunda yapılmış farklı çalışmalara rastlanılmaktadır. Zahreddine ve ark. (2004), Akdeniz'de yayılım gösteren tehdit altındaki doğal türlerin durumu ile ilgili yaptıkları çalışmada, Lübnan'daki *P. maritimum* türlerinin genetik çeşitliliğini ele almışlardır. Çalışmada genetik karakterizasyonun belirlenmesinde Williams ve ark. (1990)'a ait protokolda belirtilen 10 farklı RAPD primerleri kullanılmıştır. Çalışılan RAPD primerlerinin %93 oranında polimorfizm gösterdiği bildirilmiştir. Moleküler varyans analizi, populasyon içi çeşitliliğin belirgin olduğunu (%53) ve yüksek derecede farklılığın bu populasyonlarda hâlâ mevcut olduğunu göstermiştir.

Grassi ve ark. (2005) tarafından İtalya açıklarında yer alan Kuzey Tiren Denizi bölgesinde bulunan 10 *P. maritimum* populasyonu için biyoçeşitliliğin değerlendirilmesi ve koruma stratejilerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada 6 adet AFLP belirteci kullanılmış ve %3,56 oranında polimorfizm gözlenmiştir. Populasyonlar arası genetik ilişkinin belirlenmesinde ise UPGMA dendrogramından faydalanılmıştır. UPGMA dendrogramı, çalışılan populasyonlardan bazılarının azalan genetik çeşitliliğini ortaya koymuş, *in situ* ve *ex situ* koruma çalışmalarının hızlanması gerektiğine dikkat çekilmiştir. Ayrıca populasyonlar arası gen akımının ( $N_m=0,4673$ ) düşük olduğu vurgulanmıştır.

Sanaa ve Ben Fadhel (2010), nesli tehlike altında bulunan Tunus'da yayılış gösteren *P. maritimum*'un 5 ada ve 14 anakara populasyonlarındaki genetik çeşitlilik üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada ada ve anakarada yayılış gösteren 19 populasyondan örneklenen 20'şer birey 7 izoenzim (ICD, 6-PGD, PGM, MDH, PGI, EST ve GOT) kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışılan 7 enzimde 18 lokus belirlenmiş bunlardan 12 tanesinin polimorfik olduğu bildirilmiştir. Genetik farklılık değerleri ile yapılan UPGMA analizi, ada populasyonları ile anakara populasyonlarının kesin bir şekilde birbirinden ayrı kümelendiğini göstermiştir.

Hocagil ve ark. (2010) tarafından Türkiye'de yapılan çalışmada, *P. maritimum* genotiplerinin genetik farklılıkları araştırılmış ve bunun için Mersin ilinden iki farklı bölgeden

örneklenen 24 kum zambağı genotipi kullanılmıştır. 5 adet RAPD ve 3 adet SRAP primer kombinasyonu kullanılarak yapılan çalışma sonucunda; RAPD primerleri için %63, SRAP primerleri için %67 polimorfizm saptanmıştır. Genotipler arasındaki genetik farklılık değerinin ise 0,71 ile 0,99 arasında değişmekte olduğu gözlenmiştir.

El-Hadidy ve ark. (2012), Mısır'da yayılış gösteren *Panocratium* türleri arasındaki morfolojik ve moleküler farklılıklar ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada Doyle ve Doyle (1990)'nin CTAB protokolünden modifiye edilerek geliştirilmiş Porebsky ve ark. (1997)'in metoduna göre genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Çalışmada morfolojik özelliklerin yanısıra 11 adet RAPD primeri kullanılmıştır. Değerlendirmeye alınan 140 RAPD lokusunun 111 tanesinin polimorfik olduğu gözlenmiştir. RAPD sonuçları kullanılarak genetik uzaklık değerleri hesaplanmış ve UPGMA dendrogramı yardımıyla dört *Panocratium* türü üç ana kümeye ayrılarak sınıflandırılmıştır.

De Castro ve ark. (2012), Akdeniz'deki *Panocratium* türleri için, plastid sekans verilerine dayanan filogenetik ve biyocoğrafik sonuçlar üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada iki gen bölgesi (*rbcL* and *ndhF*), bir intergenik bölge [*trnL*(UAA)–*trnF*(GAA)] ve intron [*trnL*(UAA)] belirteç olarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara dayanılarak cinse ait bazı türlerin evrimsel tarihi ve sınıflandırmadaki yerinin belirlenmesi esas alınmıştır.

Di Maio ve De Castro (2013), İsrail, İtalya ve İspanya'dan toplanan 48 *P. maritimum* örneğini kullanarak *P. maritimum* türüne özgü 21 mikrosatellit belirteci geliştirmişlerdir. Çalışılan örneklerde 21 mikrosatellit belirtecinden 2 tanesi monomorfik diğerleri ise polimorfik olarak ( $0,198 < PIC < 0,752$ ) saptanmıştır. Bu belirteçlerin, gelecekte *P. maritimum*'a yönelik yapılacak gen koruma, gen akımı, genetik çeşitlilik ve genetik yapı çalışmalarında katkı sağlayacağı belirtilmiştir.

Giovino ve ark. (2015), *P. maritimum*'a ait taksonomi, koruma ve orta Akdeniz'deki akrabalarına ilişkin bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, bu taksona ait fenotipik ve genetik çeşitliliğe ulaşmak için üç farklı plastid DNA bölgesinin (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*) sekans verileri kullanılmış ve türün orta Akdeniz'deki benzer türlere (özellikle *Panocratium linosae*) çok yakın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *P. maritimum*'a ait gen havuzunun diğer çalışılan türlerden farklı olduğu vurgulanmış ve korunmasının öneminden bahsedilmiştir.

Sanaa ve ark. (2015), *P. maritimum*'un Tunus ada populasyonlarında hidrokorinin (su ile yayılma) etkilerinin Petri nets metodu ile örneklenmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada kullanılacak materyalin temini için 14 anakara ve 5 ada olmak üzere, Tunus'taki 19 kumul mekan seçilmiştir. Sanaa ve Ben Fadhel (2010) tarafından yapılan çalışmadan elde edilen genetik çeşitlilik verileride bu çalışmada kullanılarak kum zambağının evrimsel

gelişiminin incelendiği bu çalışma sonucunda oluşturulan dendrogramlara bakılarak kuzey ve güney ada populasyonları arasında belirgin bir sınıflanma olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hidrokorinin yalnızca ekolojik açıdan önemli olmadığı; bununla birlikte türlerin bölgeler arası taşınmasını sağlayarak *P. maritimum* populasyonlarının korunmasında da rol oynadığının altı çizilmiştir.

De Castro ve ark. (2016a), *P. maritimum*'da kontrollü çaprazlama, tohum çimlendirme ve moleküler analizler yoluyla kloroplast kalıtımı üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 'end-point PCR' tekniği kullanılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen veriler, ebeveynler, polen ve F<sub>1</sub> döllerinden cpDNA çoğaltımında 'end-point PCR' tekniğinin kullanılmasının kloroplast kalıtımının hızlı bir şekilde belirlenmesine yardımcı olduğu ve polende plastid DNA varlığının anasal kalıtımı belgelediğini göstermiştir.

De Castro ve ark. (2016b), coğrafik alanlardaki çevresel unsurların kum zambağının genetik yapısı üzerine etkilerini inceleyen bir başka çalışma daha yapmışlardır. Çalışmada 48 lokaliteden toplanan 867 birey kullanılarak 6 adet nSSR primeri (SSR-15, SSR-25, SSR-27, SSR-30, SSR-31 ve SSR-38) ile genetik analizler yapılmıştır. Çalışma sonucunda ortalama gözlenen heterozigotluk (H<sub>o</sub>) değeri 0,60 ve ortalama beklenen heterozigotluk (H<sub>e</sub>) değeri 0,54 olarak bulunmuştur. Çalışılan 48 populasyonun 17 tanesinde populasyona özgü alleller (private alleles) tespit edilmiştir.

#### **2.4.2 Mikroçoğaltım ve klasik ıslah çalışmaları**

Kum zambağı ile ilgili ilk mikroçoğaltım çalışması Dragassaki ve ark. (2003) tarafından yapılmıştır. Çalışmada, NAA ve BA içeren MS ortamında kültüre alınan *P. maritimum* eksplantlarına, farklı dozlarda büyüme düzenleyicilerle muamele edilmiştir. Daha sonra kültür ortamlarından toprağa transfer edilen bitkilerin hayatta kalma oranları belirlenmiştir.

Kum zambağı ile ilgili ülkemizde yapılan ilk mikroçoğaltım çalışması ise Gümüş ve Ellialtıoğlu (2006)' na aittir. Çalışmada, *P. maritimum*'un soğan pul yaprakları eksplant olarak kullanılmış ve yüzey sterilizasyonu için farklı uygulamalar denenmiştir. Çalışmanın ilerleyen kısmında canlılığını korumakta olan eksplantlar KNAA, BAP ve sakkaroz içeren besin ortamında kültüre alınarak soğancık oluşumu sağlanmıştır. Fakat soğancıkların canlılıklarını sürdürmeleri mümkün olmamıştır.

Bogdanova ve ark. (2008), çalışmalarında doğadan topladıkları olgun *P. maritimum* tohumlarını kullanmışlardır. Yüzey sterilizasyonunun ardından su ve agardan oluşan kültür ortamına aldıkları tohumların hızla çimlendiğini, NAA ve BAP içerikli katı MS ortamında



sürgün gelişiminin yavaş ilerlediğini, yine bu MS ortamına eklenen oksin ve sitokin hormonlarıyla gelişim hızının artırılabilirdiğini gözlemlemişlerdir.

Nikopoulos ve Alexopoulos (2008) tarafından yapılan mikroçoğaltım çalışmasında olgun tohumlar kullanmışlardır. Çalışmada tohumlar yarı katı MS ortamında kültüre alınmış ve %98-100 oranında çimlenme gözlenmiştir. Çimlenen bitkilerin kültür ortamlarına transferlerinden sonra NAA, BA ve sukroz oranlarının soğancık oluşum başarısına etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda %93 oranında soğancık oluşumu belirlenmiştir.

Nesi ve ark. (2009), *P. maritimum*'un tahrip edilen doğal yaşam alanlarının iyileştirilmesi ve kumul alanların bitkilendirilmesi amacıyla, türün hızlı çoğaltımı için *in vitro* tekniklerin kullanımı ve geliştirilmesinin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Bu doğrultuda yapılan çalışmada eksplant olarak soğan pulları kullanılmış ve yüzey sterilizasyonunun ardından, BA ve sukroz içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Eksplantlardan soğancık oluşumu gözlenmiş ve bu soğancıklardan da bitkiler gelişerek dış ortama transfer edilmiştir.

Bogdanova ve ark. (2009), *Panocratium maritimum*'un *in vitro* kültürleri aracılığıyla, antiviral ve antitümör etkileri olduğu bilinen Likorin biyosentezi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada Bulgaristan'ın Karadeniz sahilindeki doğal kum zambağı popülasyonlarından toplanan tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar, BAP ve NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. *P. maritimum*'un 3 yıllık *in vitro* kültürlerinde yapılan kromatografik analizler, biyosentetik aktivitenin varlığını doğrulamıştır. Likorin'in, *in vitro* koşullarda üretilen tek alkaloid olduğu belirlenmiştir.

Balestri ve ark. (2001), *P. maritimum* ve diğer iki kumul bitki türünden yaprak protoplastı izolasyonu hakkında bir çalışma yapmışlardır. Yeniden üretilen bitkiler için optimal kültür koşulları sağlandığında, protoplast tespitinin seleksiyon ve daha geniş kapsamlı restorasyon programları için bitkisel materyal üretimi konusunda yardımcı olacağı belirtilmiştir.

Kum zambağı ile ilgili yapılmış klasik ıslah çalışmaları sayıca çok azdır. Balestri ve Cinelli (2004), türün Kuzeybatı İtalya kıyılarındaki çimlenme ve gelişimi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada tohumlar farklı derinliklere ekilerek çıkış oranları, bunu takiben çimlenmiş fidelerin hayatta kalma oranları gözlenmiştir. Diğer yandan laboratuvar ortamında da çimlendirilmekte olan bir başka tohum grubunun çimlenme yeteneği, ilk grupla karşılaştırılmıştır. Laboratuvarda çimlendirilen tohumların diğerlerine oranla %87,5-100 oranında çimlendiği ve daha düşük dormansi gösterdiği belirlenmiştir.

Ulun ve ark. (2010), kum zambağını kültüre alma çalışmaları yapmışlardır. Çalışmada, yılın farklı zamanlarında ekilen tohumların ve çimlenmeye alınan soğanların çimlenme ve fide

oluşturma oranları gözlenmiştir. Oluşan fidelerin hangi yetiştirme ortamında daha iyi gelişme göstereceklerini belirlemek amacıyla farklı ortamlar hazırlanmış ve fideler bu ortamlara transfer edilmiştir. Çalışma sonucunda en iyi gelişme ortamının kum olduğu ve soğandan oluşan bitkilerin, tohumdan oluşanların aksine ikinci yıl tekrar çiçeklenebildiği tespit edilmiştir.

### 2.4.3 Kimyasal içerik ve eczacılık alanındaki çalışmalar

Berkov ve ark. (2004), *P. maritimum*'un yaprak, soğan ve köklerinde elde edilen özütleri GC/MS ile analiz etmiş, belirlenen 16 alkaloidden 5 tanesinin ilk defa bu bitkide tanımlandığını rapor etmişlerdir.

Şener ve ark. (2003), aralarında *P. maritimum*'un da bulunduğu, *Amaryllidaceae* familyasına ait üç farklı bitki türündeki alkaloidleri incelemişlerdir. Araştırmacılar tarafından dört alkaloid grubu izole edilmiş ve bu alkaloidlerin (Likorin, Tazettin, Krinin ve Galantamin) sıtmaya karşı bir aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Laurentis ve ark. (2004), *P. maritimum*'dan elde edilen Likorin alkaloidinin bazı maya türlerinin gelişimine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda mayaların Likorin'e duyarlı oldukları görülürken, fungusların direnç gösterdikleri belirlenmiştir.

Berkov ve ark. (2010), *P. maritimum*'da *in vitro* organogenesis sırasındaki apolar metabolit değişimleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Başlangıç materyali olarak, bitkinin Bulgaristan'dan toplanmış olan genç meyveleri (tohum oluşumunun erken evresi) kullanılmıştır. Sterilizasyon aşamasından sonra genç meyveler dilimlenerek, sukroz ve agar içeren MS ortamına yerleştirilmiştir. Ortama farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda büyüme düzenleyiciler eklenmiştir. Çalışma sonucunda *P. maritimum*'daki alkaloid sentezinin, doku farklılaşmasıyla yakından ilgili olduğu görülmüştür.

Georgiev ve ark. (2011), *P. maritimum*'un sıvı ortamlardaki sürgün kültüründe alkaloid biyosentezi üzerine bir çalışma yapmışlar ve 22 farklı bileşik tespit etmişlerdir. Kültür ortamlarında ağırlıklı olarak Likorin varlığına, sürgünlerde ise Likorin'in yanı sıra Tiramin ve Haemantamin'e de rastlanılmıştır.

Sanaa ve ark. (2012) yapmış oldukları başka bir çalışmada, Tunus'ta nesli tehlike altında bulunan *P. maritimum* populasyonlarında, çiçekteki uçucu madde kompozisyonunun çeşitliliğini araştırmışlardır. Çalışmada farklı coğrafik bölgelerden toplanmış 5 ada, 8 anakara populasyonu kullanılmıştır. *P. maritimum* çiçeğinden elde edilen toplam ekstraktta, popülasyona bağlı olarak %64,20-84,29 oranında 18 farklı bileşik tespit edilmiştir. Türden elde edilen bazı bileşikler anti-kanser etkilidir ve tümör hücrelerinin bölünmelerini durdurmaktadır (Adany ve ark. 1994). Ayrıca varyans analizleri populasyonlar arasında, türler arası yüksek

kimyasal çeşitliliği gösteren bileşik miktarı açısından yüksek oranda belirgin ( $P<0,001$ ) veya belirgin ( $P<0,05$ ) farklılıklar olduğunu göstermiştir.

Hetta ve Shafei (2013), Mısır'daki *P. maritimum* bitkilerinin çiçek ve meyvelerinden elde edilen alkaloidlerin, insan kolon kanseri gelişimi ile bazı funguslar ve bakterilere etkisini araştırmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kum zambağı alkaloidlerinin kolon kanserine karşı bir etki gösterdiği ve kuvvetli bir antibiyotik olarak görev yaptıkları belirtilmiştir.

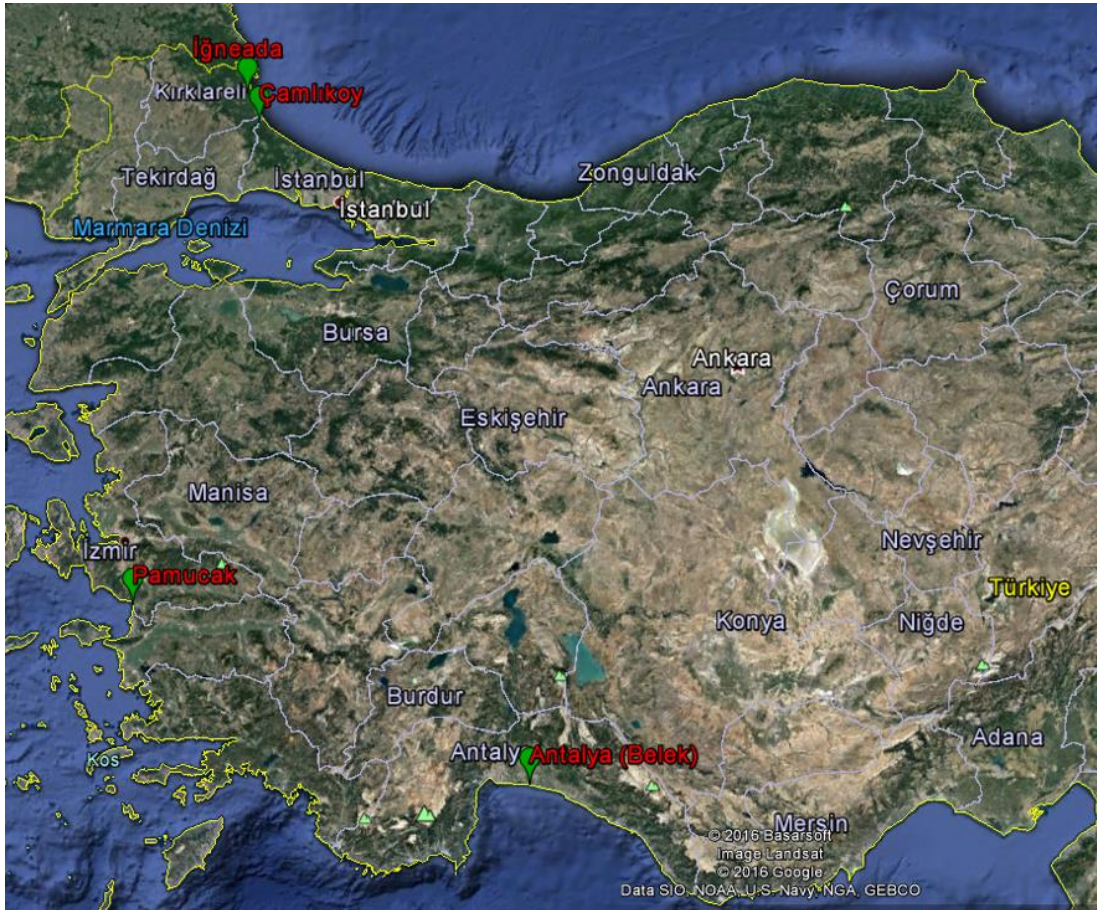
Ibrahim ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, *P. maritimum*'un taze çiçekleri ile yumrularını kullanmışlardır. Bu materyallerden 4 yeni alkaloid izole etmişler ve bunların insan prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını engelleyen bir aktivite sergilediklerini belirlemişlerdir.

Sanaa ve ark. (2014), Tunus'ta tehdit altındaki *P. maritimum* populasyonları arasındaki genetik ve kimyasal yapıyla ilgili bir çalışma yapmıştır. Çalışmada, ada ve anakara habitatlarından 13 populasyonun (5 ada ve 8 anakara) genetik ve uçucu madde çeşitliliğinin 7 izoenzim ve 18 uçucu bileşik kullanılarak belirlenmesi esas alınmıştır. Uçucu madde yüzdeleri ve allel frekanslarına dayanan populasyon yapısına ulaşmak için, temel bileşenler analizi (PCA) uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, *P. maritimum*'un kimyasal ve genetik populasyon yapısı yüksek bulunmuş ve bunun da genetik sürüklenmeye populasyonun tükenmesine yol açabileceği tahmin edilmiştir. Tunus'ta sahil habitatındaki tahribatın endişe verici boyuta ulaştığı ve koruma çalışmalarının hızlandırılması gerektiği vurgulanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Kum Zambağı Populasyonları

Bu tez çalışmasında; Tekirdağ iline bağlı Çamlıkoy Tabiat Parkı, Kırklareli iline bağlı İğneada Longoz Ormanları Milli Parkı, İzmir iline bağlı olan Pamucak Sahili (Selçuk ilçesi) ve Antalya iline bağlı olan Belek Sahili (Serik ilçesi)'nde yer alan doğal kum zambağı populasyonları kullanıldı (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3). Populasyonlara ait bireyler rastlantısal olarak aralarında en az 10 m mesafe olacak şekilde seçildi. Her bir populasyondan en az 20'şer bireyin sağlıklı ve genç yapraklarından örnekler Haziran-Ağustos ayları arasında toplandı. Toplanan örnekler, ayrı ayrı alüminyum folyolara sarılıp populasyon adı ve birey numarası ile adlandırılarak buz içerisinde muhafaza edilerek laboratuvarımıza getirildi. Bütün örnekler DNA izolasyonu yapıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

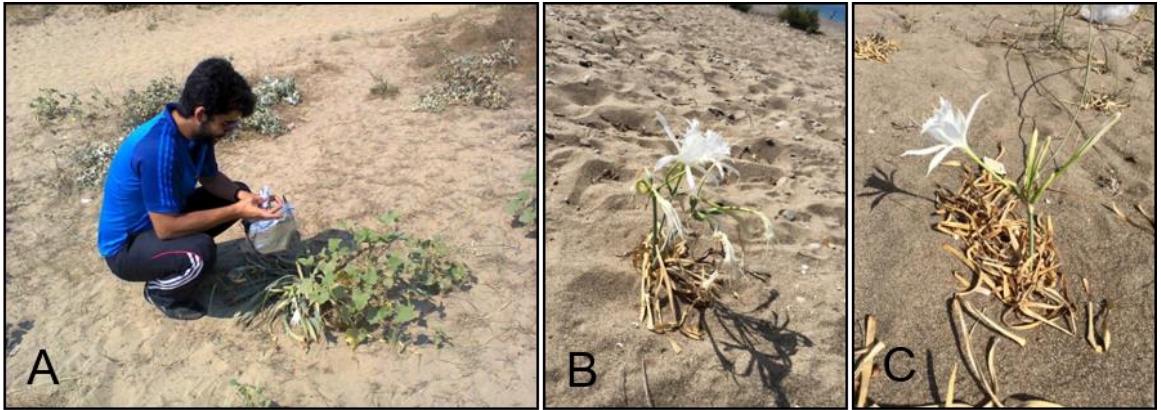


Şekil 3.1. Çalışılan kum zambağı populasyonlarının Türkiye haritasındaki yerleşimi (Google Earth 2016)





Şekil 3.2. Çamlıkoy Tabiat Parkı (A) ve İğneada Longoz Ormanları'ndaki (B) doğal kum zambağı populasyonları



Şekil 3.3. Pamucak Sahili (A) ve Belek Sahili'ndeki (B ve C) doğal kum zambağı populasyonları

### 3.2 DNA İzolasyonu

Kalite ve miktar olarak en iyi DNA izolasyonunu yapabilmek için birçok manuel DNA izolasyon yöntemi ve bu yöntemlerin modifikasyonları denendi (Dellaporta ve ark. 1983, Doyle ve Doyle 1990, Li ve ark. 2007, Azmat ve ark. 2012, Healey ve ark. 2014). Ayrıca farklı DNA izolasyon kitleri de (NANObiz Bitki Genomik DNA İzolasyon Kiti, Vivantis GF-1 *Plant DNA Extraction Kit* ve i-genomic Plant DNA Extraction Mini Kit) denendi. Kum zambağı yapraklarının kalın etli yapısı ve DNA izolasyonunun zorlu olması sebebiyle, DNA izolasyonu optimizasyonları sonucunda kalite ve miktar açısından en iyi olan ve PCR analizlerinde istenilen kalitede sonuç veren DNA örneği ‘i-genomic Plant DNA Extraction Mini Kit’ kullanılarak elde edildiğinden kit kullanılarak DNA izolasyonu tercih edildi. DNA izolasyonu üretici firmanın prosedürleri doğrultusunda yapıldı.

Çalışmada, yaprak örnekleri Retsch® MM400 model homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin etkinliğini arttırmak için bitki örnekleri bir-iki gün önce hazırlanıp -20 °C’de muhafaza edilmeli veya homojenizasyon işleminden hemen önce mümkün ise sıvı azot içinde 5-10 saniye beklettikten sonra homojenizasyon işlemine geçilmelidir. Böylece, bitki materyali daha kuru bir hale gelmekte ve homojenizasyonu kolaylaşmaktadır. Kum zambağı yaprak örnekleri, homojenizasyondan bir-iki gün önce hazırlanıp -20 °C’de bekletilmiştir. -20°C’den alınan yaprak örneklerinin dış yüzeyindeki ince zar, bistüri yardımıyla yapraktan ayrıldı. 2 ml’lik santrifüj tüplerine, zarlarından temizlenmiş yaprak örneklerin her birinden yaklaşık 1 g konuldu. Bu tüplerin içine, örnekleri ezecek olan 2 mm boyutundaki çelik bilyelerden 3'er adet eklendi. Homojenizasyon süresi olarak dörder dakikadan oluşan iki kısım olmak üzere toplam sekiz dakika kullanıldı. Titreşim frekansı ise saniyede 28 olarak ayarlandı. Örneklerin iyi bir şekilde homojenize olup/olmadığı kontrol edildikten sonra homojenizasyon işlemine son verildi. Eğer örnekler çok iyi homojenize olmamışsa (toz veya kına şeklinde değilse) bir-iki dakika daha tekrar homojenizasyon yapıldı. Örneklerin bir kısmı ise sıvı azot kullanılarak homojenize edildi. DNA izolasyonunda kullanılan yöntemin basamakları şu şekilde sıralanmaktadır:

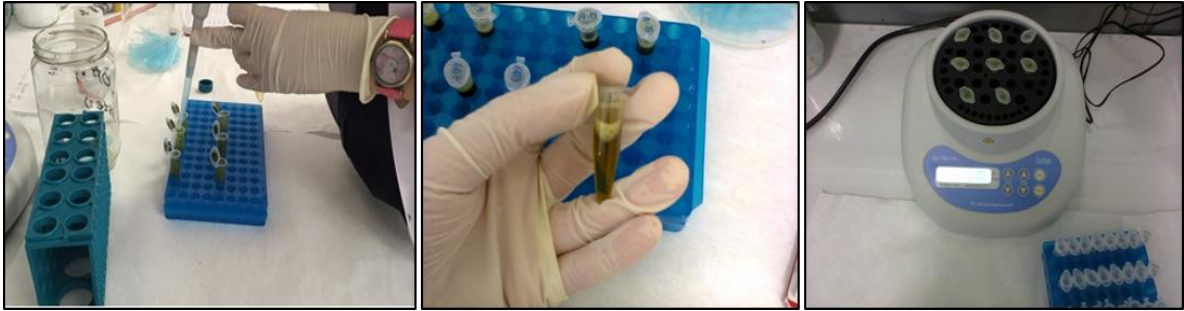
- 1) Homojenize edilmiş yaprak örneklerinin bulunduğu santrifüj tüplerine hazırlanmış olduğumuz özütleme tamponundan (Çizelge 3.1) her bir örneğin üzerine 300'er µl eklendi ve bu şekilde 3'er çelik bilye ile 4 dk boyunca 1 kez daha ezildi.

### Çizelge 3.1. Özütleme tamponu içeriği

Özütleme Tamponu İçeriği	Miktar (1X)
Buffer PG	390 µl
Enhancer solution	7 µl
Proteinase K	20 µl
RNAse A	5 µl

- 2) Ögütücüden alınan örneklerin içindeki çelik bilyeler, mıknatıs yardımıyla çıkarıldı ve örnekler DNA izolasyonuna hazır hale getirildi.
- 3) Tüplerdeki ezilmiş yaprak örneklerinin her birinin üzerine, 122 µl daha özütleme tamponu eklendi.
- 4) Özütleme tamponu eklenen örnekler, ısıtıcı blokta 65°C'de 40 dk boyunca inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.4). Örnekler 10 dakikada bir nazikçe karıştırıldı.
- 5) İnkübasyon aşamasından sonra, her bir örneğe 100 µl PPT tamponu eklendi ve 5-6 kez nazikçe karıştırıldı.
- 6) Tampon eklenen örnekler, içi buz dolu bir kaptaki 5 dk boyunca bekletildi.
- 7) Buzdan alınan örnekler oda sıcaklığında 13000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi.
- 8) Santrifüj aşamasıyla birlikte fazlara ayrılan örnekler, cihazdan dikkatlice ve çok sarsmadan çıkarıldı, supernatant (üst faz) otomatik pipet yardımıyla mümkün olduğu kadar temiz bir şekilde çekildi (yaklaşık 500 µl kadar).
- 9) Çekilen üst faz, 1,5 ml'lik yeni Eppendorf tüplere aktarıldı.
- 10) Yeni tüplere alınan örneklerin üzerine, 650 µl PB tamponu eklendi ve nazikçe 5-6 kez ters düz edilerek karıştırıldı.
- 11) Bu karışımdan otomatik pipet yardımıyla 650 µl alınarak, 2 ml 'spin column' tüplere aktarıldı.
- 12) 'Spin column' tüpler, oda sıcaklığında 13000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında, istenmeyen ve işimize yaramayacak olan sıvı kısım tüplerin alt kısmına inmiş, DNA'lar üst kısımdaki filtrede kalmış oldu.
- 13) Cihazdan dikkatlice çıkarılan tüplerin alt kısmındaki istenmeyen sıvı kısım döküldü.
- 14) PB tamponu eklenerek hazırlanmış olan karışımdan geriye kalan 200 µl de yine bu tüplerin üstüne eklenerek işlem tekrarlandı, 13000 rpm'de 2 dk daha santrifüj edildi.
- 15) Yine cihazdan dikkatlice çıkarılan tüplerin alt kısmındaki sıvı döküldü, üst kısımdaki filtreli bölüm çıkarılarak 2 ml'lik temiz tüplere oturtuldu.

- 16) Filtrenin üzerine 700 µl PWA buffer eklendi. 13000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edildi.
- 17) Santrifüj işleminden sonra cihazdan alınan tüplerin alt kısmına çöken PWA yıkama tamponu döküldü.
- 18) Yıkama işlemine PWB buffer ile devam etmek için, her bir örneğin üzerine bu kez de 700 µl PWB buffer eklendi ve 13000 rpm'de 1,5 dk kadar santrifüj edildi.
- 19) İşlem tekrarlanarak, tüplerin alt kısmına çökmüş olan yıkama tamponu döküldü ve son kez, 13000 rpm'de 30 s boyunca santrifüj edildi ve alt kısımdaki sıvı döküldü. Böylece filtrede kalmış olan çok az miktardaki yıkama tamponu da alt kısma çöktürülerek DNA'dan uzaklaştırılmış ve yıkama işlemi tamamlanmış oldu.
- 20) Üstteki filtrelili kısım tekrar çıkarılarak, 1,5 ml'lik temiz tüplere yerleştirildi.
- 21) Tüplerin her birine, 125 µl PE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
- 22) İnkübasyon sonrası 13000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj işlemine tabii tutuldu ve DNA izolasyonu aşaması tamamlanmış oldu.
- 23) İzole edilen genomik DNA örnekleri, PCR analizleri yapılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.



**Şekil 3.4.** Örneklere özütleme tamponu eklenmesi ve inkübasyon aşaması

### **3.3 İzole Edilen DNA Örneklerinde Miktar ve Kalite Tayini**

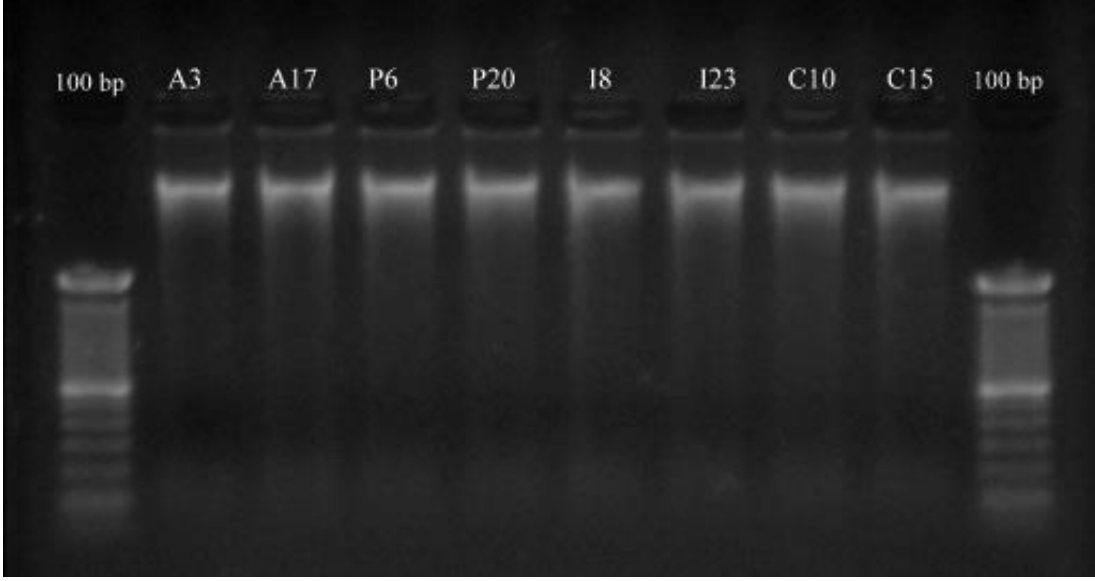
Elde edilen DNA örneklerinde miktar tayini için Qubit® 2.0 Fluorometer cihazı kullanıldı. Bu ölçümde öncelikle her bir örnek için 198 µl çalışma solüsyonu (çalışma solüsyonu Qubit reagent ve Qubit buffer'dan oluşmaktadır) ile 2 µl örnek karıştırılarak oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında DNA miktarı ng/µl olarak cihaz ekranında okundu ve kaydedildi (Çizelge 3.2). İzole edilen genomik DNA örnekleri PCR reaksiyonu için konsantrasyonu 10 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.



**Çizelge 3.2.** Kum zambağı populasyonlarına ait bazı DNA örneklerinin miktar ölçüm sonuçları

Populasyon adı-Örnek no	Miktar (ng/µl)
Antalya-3	33,5
Antalya-17	51,2
Pamucak-6	46,3
Pamucak-20	39,4
İğneada-8	40,2
İğneada-23	36,8
Çamlıkoy-10	49,7
Çamlıkoy-15	45,3

DNA'ların kalite tayini için ise, örnekler %1'lik agaroz jellerde yürütüldü. %1'lik agaroz jel hazırlanırken; 1 g agaroz tartılarak, 100 ml 1X TBE tamponuyla erlenmayer içinde karıştırıldı. Bu karışım, agarozun tampon içinde çözünmesini ve homojen bir yapıya kavuşmasını sağlamak için, mikrodalga fırında yaklaşık 4 dk kadar ısıtıldı. Mikrodalga fırından çıkarılan jel karışımı, donmaması ve homojen yapısını kaybetmemesi için 4-5 dk kadar nazikçe çalkalanarak biraz soğutuldu. Ardından jelin içine, bantların UV ışık altında görüntülenmesini sağlayan "RedSafe Nucleic Acid Staining Solution" boyasından 2 µl eklendi ve yine nazikçe çalkalanarak karıştırıldı. Karıştırma sırasında ısısı biraz düşmüş olan jel, hazırlanmış ve tarakları takılmış olan tray içine, baloncuk oluşmaması için bir köşesinden yavaşça döküldü ve donmaya bırakıldı. Yaklaşık 20 dk içerisinde donmuş olan agaroz jelin üzerindeki taraklar dikkatlice çıkarıldı ve jel, tray ile birlikte tankın içindeki 1X TBE tamponunun içine yerleştirildi. Diğer yandan, bir parça parafilm üzerine, yüklenecek DNA örneği sayısı kadar yükleme boyası (Loading Dye) damlatıldı (her bir örnek için 2 µl). Yükleme boyalarının üzerine, yüklenecek DNA örneklerinin her birinden 5'er µl eklendi. Jeldeki ilk kuyucuğa 7 µl 100 bp Ladder, diğer kuyucuklara ise yükleme boyasıyla karıştırılmış örnekler sırasıyla yüklendi. Örnekler parafilm üzerinden çekilirken, yükleme boyası ile karışmaları için pipetleme yapıldı. Jeldeki kuyucuklara yüklenen DNA örnekleri, 80 Volt akımda 30 dk yürütüldü. Elektroforez işleminden sonra tanktan çıkarılan jel, Gel Imaging System Vilber Lourmat Quantum ST5 cihazı ile UV ışık altında görüntülendi (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** Antalya (A), Pamucak (P), İğneada (I) ve Çamlıkoy (C) populasyonlarına ait bazı DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri

### **3.4 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerinin Belirlenmesi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri ve Elektroforez**

Tez çalışmasında kullanılacak nSSR primerlerinin seçiminde;

- 1) Primerlerin polimorfik olması,
- 2) Polimorfizmi sağlaması için allel sayısının yeterli derecede çok olması,
- 3) Farklı florasan boya ile işaretlenerek multipleks PCR analizi yapabilmek için PCR ürünlerinin uzunlukları birbirinden farklı olması,
- 4) Bağlanma (annealing) sıcaklıklarının birbirine yakın olması,
- 5) PIC (polimorfik bilgi içeriği) değeri yükseldikçe polimorfizm de artacağı için, PIC değerinin yüksek olması gibi kriterler dikkate alınmıştır.

Di Maio ve De Castro (2013) tarafından *P. maritimum*'a özgü olarak karakterize edilmiş ve geliştirilmiş olan 21 mikrosatellit (nSSR) primerinden 4 nSSR primer çifti, bu kriterler de göz önüne alınarak çalışmamızda kullanılmak üzere seçilmiştir (Çizelge 3.3). Seçilen primer çiftlerinin ileri (forward) primerleri 5' uçlarından DNA parça (fragment) analizi için uygun florasan boya (PET, NED, VIC, 6-FAM) ile işaretli olarak sentezletirilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Di Maio ve De Castro (2013) tarafından *P. maritimum*'a özgü olarak karakterize edilmiş ve çalışmada kullanılmak üzere seçilmiş nSSR primerlerine ait bilgiler

<b>Primer adı</b>	<b>Primer dizisi (sekansı) 5' → 3'</b> [F: Forward (ileri) primer, R: Reverse (geri primer)]	<b>Tekrar motifi</b>	<b>T<sub>M</sub> (°C)</b>
SSR-15	F: 5'-PET-GATATCCTCAAACGCC-3' R: CGTCTTCCCCTTCTCTGG	(GA) <sub>8</sub>	54
SSR-20	F: 5'-NED-GACTATTGGGCCATATTGGG-3' R: CCTGAATACTCGCAATCC	(GT) <sub>6</sub>	56
SSR-27	F: 5'-VIC-ATGGAGGTTTATGAGATGGC-3' R: CATATCTCTCTCCTCCACC	(GA) <sub>12</sub>	56
SSR-38	F: 5'-FAM-TGACGAGGATGAAGCTCC-3' R: ACCTGTTTGACCCCTCAC	(GA) <sub>20</sub>	54

Çalışmada nSSR primerleri için PCR analizleri Di Maio ve De Castro (2013) tarafından yapılan çalışmadaki reaksiyon koşullarında ve PCR döngülerinde denendi, ayrıca laboratuvar şartlarımıza uygun gerekli optimizasyonları yapıldı. PCR optimizasyonu için değişik DNA miktarı (10, 20 ve 50 ng), primer (5 pmol ve 10 pmol), dNTP (0,2, 0,3, 0,5 ve 0,8 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM, 2 mM ve 2,5 mM) ve *Taq* DNA polimeraz (1U ve 2U) konsantrasyonları denenmiştir. Optimum reaksiyon koşulları Çizelge 3.4'de verilmiştir. Ayrıca çalışmada kum zambağı için optimize edilen PCR döngüleri Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilmiş PCR koşulları

<b>PCR Karışımı</b>	<b>Kullanılan Miktar 1X</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
<b>10X PCR Tamponu</b>	1,5 µl	1X
<b>MgCl<sub>2</sub> (50 mM)</b>	0,6 µl	2 mM
<b>dNTPs (10 mM)</b>	1,2 µl	0,8 mM
<b>Primer F* (5 pmol/µl)</b>	1 µl	5 pmol
<b>Primer R (5 pmol/µl)</b>	1 µl	5 pmol
<b>Taq Polimeraz (5U/µl)</b>	0,4 µl	2 U
<b>DNA (10 ng/µl)</b>	5 µl	50 ng
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	4,3 µl	-
<b>Total</b>	15 µl	-

\* Kullanılan primer 5' ucundan florasan boya ile işaretlidir.

**Çizelge 3.5.** Çalışmada kullanılan SSR primerleri için optimize edilen PCR döngüleri

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
1	95 °C	5 dk	1
2	95 °C	1 dk	35
3	*T <sub>M</sub> °C	1 dk	
4	72 °C	1 dk	
5	72 °C	10 dk	1

\* (T<sub>M</sub> = DNA'nın erime sıcaklığı, SSR-15 ve SSR-38 primerleri için 54 °C, SSR-20 ve SSR-27 primerleri için 56 °C'dir.)

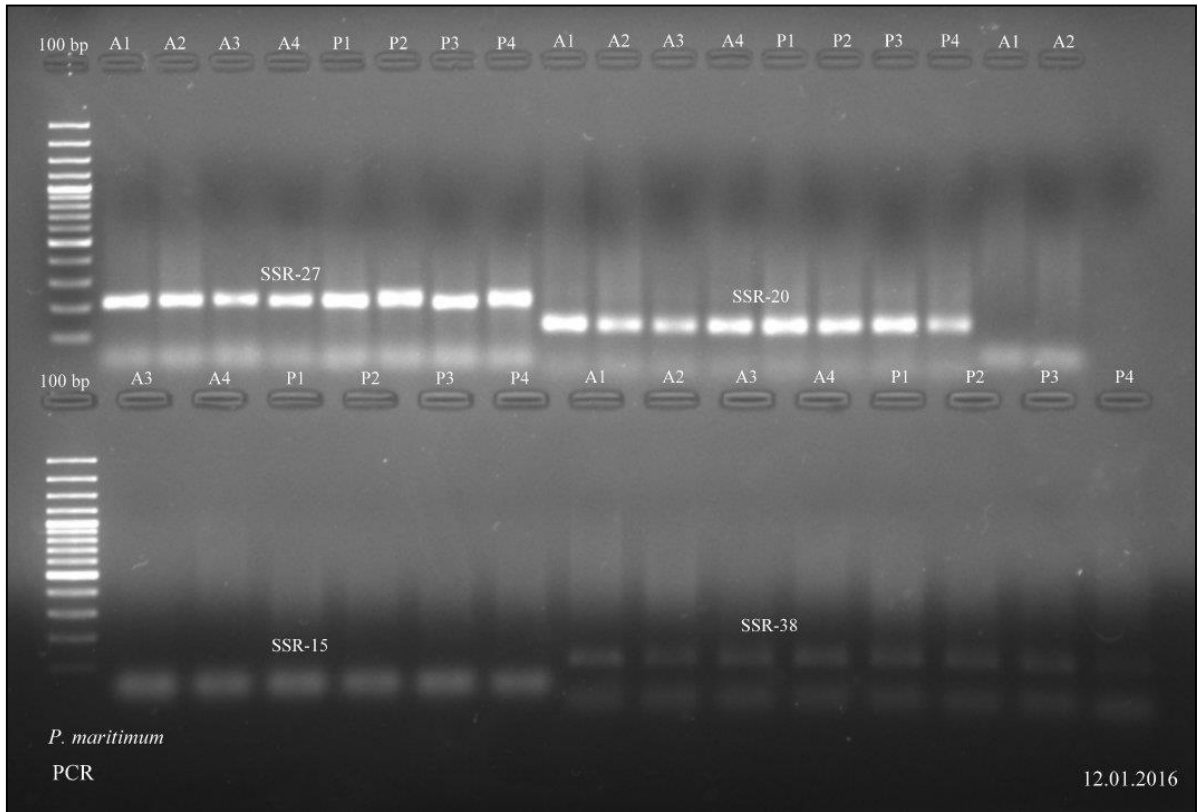
PCR işlemine başlarken, öncelikle her bir DNA örneğinden 5 µl (yaklaşık 50 ng) 0,2 ml PCR tüplerine konuldu ve daha sonra ise PCR karışımı (mastermix) hazırlandı. Karışımın içeriği Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Hazırlanan karışım Vortex karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra, her bir tüpe 10 µl dağıtılıp toplam hacim 15 µl olarak ayarlandı. DNA amplifikasyonları Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de verilen koşullarda Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler ve Applied Biosystems® ProFlex™ PCR System Thermal Cycler kullanılarak yapıldı (Şekil 3.6).

PCR ürünleri elektroforez işlemine kadar, alüminyum folyoya sarılmış şekilde +4°C'de saklandı. Bantların istenilen nitelikte olup olmadıklarını kontrol etmek için %2'lik agaroz jellerde yürütüldü (Şekil 3.6). %2'lik agaroz jel hazırlanırken; 2 g agaroz tartılarak 100 ml 1X TBE tamponu ile karıştırıldı. Bu karışım, mikrodalga fırında 5 dk kadar ısıtıldı. Mikrodalga fırından çıkarılan jelin içine, bantları UV ışık altında görüntüleyebilmemiz için "RedSafe Nucleic Acid Staining Solution" boyasından 2 µl eklendi ve nazikçe karıştırıldı. Jel, tarakları takılmış olan tray içine yavaşça döküldü ve donmaya bırakıldı. Yaklaşık 20 dk içerisinde donmuş olan agaroz jelin üzerindeki taraklar dikkatlice çıkarıldı ve jel, tray ile birlikte tankın içindeki 1X TBE tamponunun içine yerleştirildi. Diğer yandan parafilm üzerine, yüklenecek PCR ürünü sayısı kadar yükleme boyası (Loading Dye) damlatıldı (her bir örnek için 2 µl). Yükleme boyaının üzerine, 7'er µl PCR ürünü eklendi. Jeldeki ilk kuyucuğa 7 µl 100 bp Ladder, diğer kuyucuklara ise yükleme boyasıyla karıştırılmış PCR ürünleri yüklendi. Jeldeki kuyucuklara yüklenen PCR ürünleri, 80 Volt akımda 1 saat yürütüldü. Elektroforez işleminden sonra tanktan çıkarılan jel, Gel Imaging System Vilber Lourmat Quantum ST5 cihazı ile UV

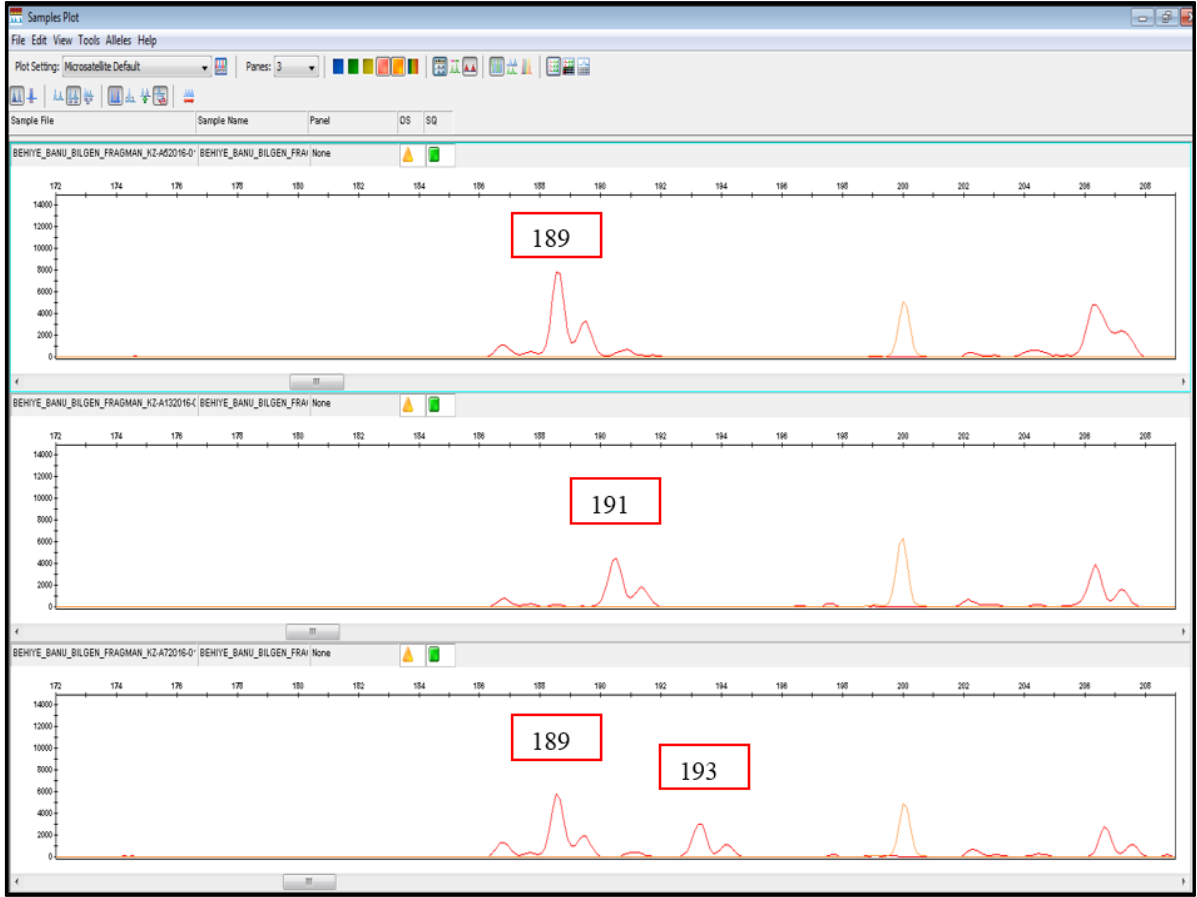
ışık altında görüntüledi (Şekil 3.7). PCR ürünleri elde edildikten sonra, ürünlerin DNA parça (fragment) büyüklüklerinin belirlenmesi hizmet alımı ile yapıldı. Çalışılan populasyonlardaki örneklerin DNA parça (fragment) analizlerinin sonucu laboratuvarımızda GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak değerlendirildi ve her bir primerin oluşturduğu parçaların (fragmentlerin) baz büyüklükleri belirlendi (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).



**Şekil 3.6.** Örneklerin PCR analizine hazırlanması, Thermal Cycler cihazlarında DNA amplifikasyonları ve Elektroforez



**Şekil 3.7.** Antalya (A) ve Pamucak (P) populasyonlarına ait bazı örneklerin PCR ürünlerinin UV ışık altındaki jel görüntüsü



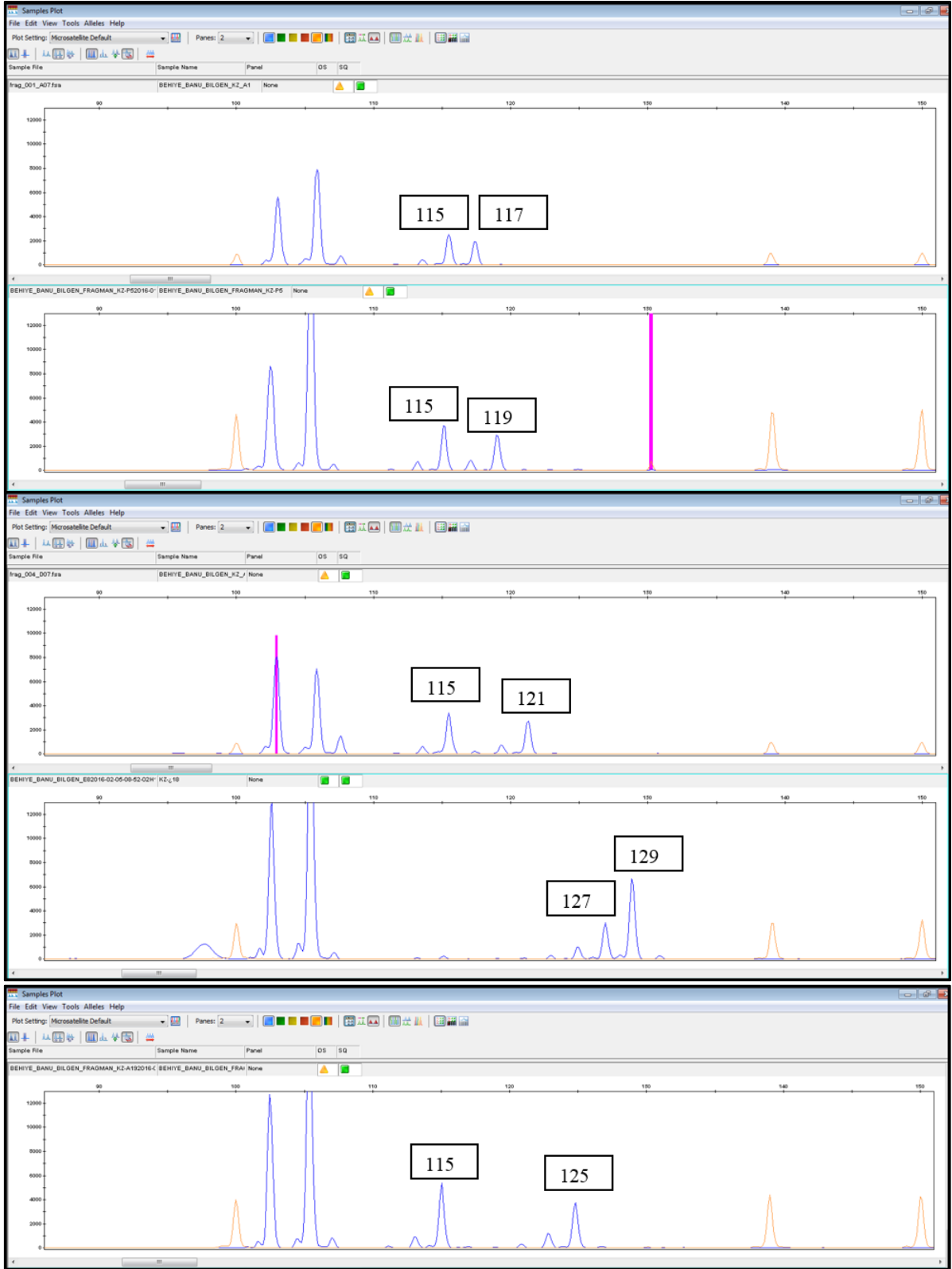
Şekil 3.8. SSR-15 primerine ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.9. SSR-20 primerine ait allelin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



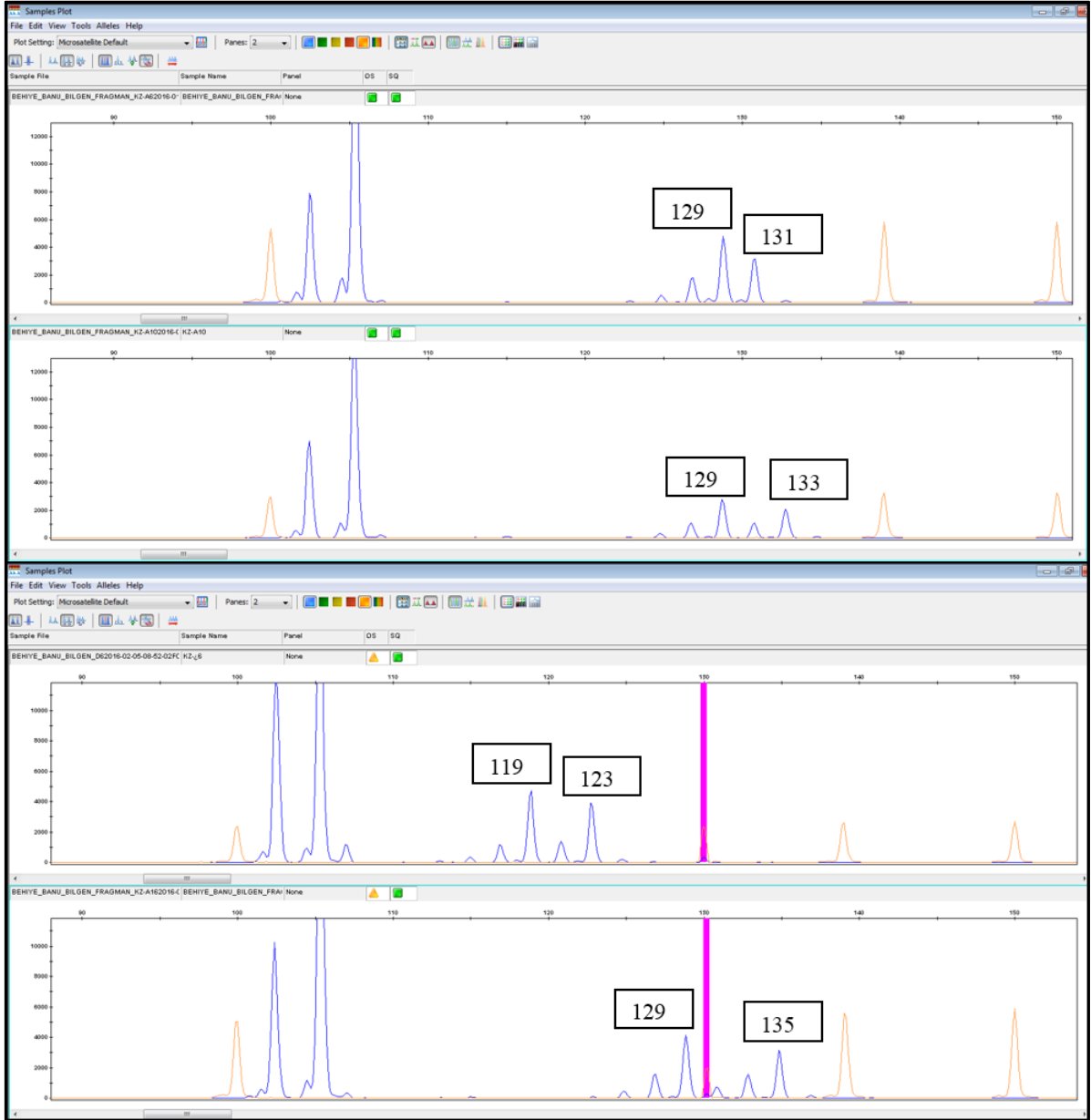
Şekil 3.10. SSR-27 primerine ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



**Şekil 3.11.** SSR-38 primerine ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü



Şekil 3.11. devam



Şekil 3.11. SSR-38 primerine ait allellerin GeneMapper Software 5.0 (Applied Biosystems) programındaki görüntüsü

### 3.5 Verilerin İstatistiksel Analizi

Polimorfizm ölçütü olarak, bir lokustaki allel sayısı dikkate alındı. Şöyle ki, bütün populasyonlar göz önüne alındığında iki ve/veya daha fazla allele sahip olan mikrosatellit bölgesi polimorfik lokus olarak değerlendirilmektedir. Populasyonların genetik çeşitliliğini belirleyebilmek için her bir populasyonda, polimorfik lokuslar ve yüzdeleri, polimorfik lokuslardaki gözlenen allel sayısı ( $N_a$ ), etkili allel sayısı ( $N_e$ ), beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ), gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ), Shannon sabiti ( $I$ ) ve standart hataları hesaplandı. Polimorfik

lokusların toplam lokus sayısına bölünmesi ile polimorfizm yüzdesi belirlendi. Ortalama allel sayısı, çalışılan her bir populasyondaki her bir lokusun sahip olduğu allel sayısının aritmetik ortalaması alınarak bulunur. Her bir populasyonun genetik çeşitliliği, gözlenen ve Hardy-Weinberg dengesinde beklenen heterozigotluk düzeyleri hesaplanarak belirlenir (Hartl ve Clark 1989). Polimorfik bilgi içeriği (PIC), bir belirtecin populasyon içindeki polimorfizm değerini belirlemede kullanılan bir parametredir. PIC değeri, bir lokusa ait allel sayısına ve allellerin populasyon içindeki dağılımına göre değişebilir. Çalışmada kullanılan bireylerdeki her bir nSSR lokusu için polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri, aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı.

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j$$

Formüldeki "p", bir nSSR lokusundaki her bir allelin frekansını, "n" ise bir nSSR lokusundaki allel sayısını ifade etmektedir (Botstein ve ark. 1980).

Wright'ın  $N_m = [(1-F_{ST})/4F_{ST}]$  eşitliği kullanılarak her kuşakta populasyonlar arasındaki gen akımı miktarı tahmin edildi (Wright 1978, Mitton 1992). Ayrıca populasyon çiftleri arasındaki kuş uçuşu mesafe (km) ile populasyon çiftleri arasındaki gen akımı ( $N_m$ ) değerleri arasında ilişki olup olmadığını belirleyebilmek için regresyon ve korelasyon analizleri yapıldı (Sokal ve Rohlf 1995). Nei'nin (1987) populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma düzeyini belirleyebilmek ve yakın bağlantı ağaçlarını (neighbor-joining trees) oluşturmak için Nei'nin tarafsız genetik mesafe katsayısı hesaplandı (Nei 1987). Sonuçların görsel bir grafik üzerinde görülebilmesi için, Nei'nin tarafsız genetik mesafe katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) kümelendirme yöntemi kullanılarak, bir dendrogram oluşturuldu (Sneath ve Sokal 1973, Işık ve ark. 2005). Bu yöntemler genel olarak nümerik taksonomide farklı taksonların (alt tür, tür veya daha üst düzey taksonomik birimlerin) birbirleri ile olan benzerlik veya farklılık derecelerini bulmak için kullanılır (Sneath ve Sokal 1973).

İstatistik analizler, elde edilen ham veriler kullanılarak POPGENE (Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic analysis, Version 1.32) (Yeh ve ark. 1999) ve GenAEx [(Version 6.5) (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAEx/>)] (Peakall ve Smouse 2006) istatistik paket programları kullanılarak yapıldı.

Basamaklı mutasyon modeline göre moleküler varyans analizinde (AMOVA) ARLEQUIN [(Versiyon 3.11) (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>)] (Excoffier ve ark. 2005) istatistik programından yararlanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Nükleer Mikrosatellit (nSSR) Primerlerine ait Allellerin Belirlenmesi

Nükleer mikrosatellit (nSSR) primerlerine ait çalışılan her bir primer bir lokus ve her bir primerin çoğalttığı farklı nükleotid uzunluğundaki DNA parçaları tek bir allel olarak değerlendirildi. Bu ilkeye dayanarak, analiz edilen her bir primer için, 4 kum zambağı popülasyonundan çalışılan toplam 81 bireyin her birinin sahip olduğu alleller belirlendi ve frekansları ayrı ayrı hesaplandı (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Çalışmada analiz edilen dört nSSR lokusuna ait allellerin dört kum zambağı popülasyonundaki frekansları

Primer	Allel	Allel Frekansları (f)			
		Antalya (A)	Pamucak (P)	İğneada (I)	Çamlıkoy (C)
SSR-15	189	0,375	0,275	0,500	0,500
	191	0,600	0,725	0,500	0,500
	193	0,025*	0,000	0,000	0,000
SSR-20	130	1,000	1,000	1,000	1,000
SSR-27	196	0,000	0,050	0,425	0,425
	198	0,875	0,850	0,575	0,575
	200	0,050*	0,000	0,000	0,000
	202	0,075*	0,000	0,000	0,000
	204	0,000	0,100*	0,000	0,000
SSR-38	115	0,275	0,325	0,000	0,000
	117	0,050	0,025	0,025	0,056
	119	0,000	0,200	0,600	0,417
	121	0,025	0,100	0,075	0,110
	123	0,000	0,000	0,050	0,111
	125	0,075	0,000	0,050	0,000
	127	0,025	0,025	0,000	0,056
	129	0,275	0,175	0,175	0,139
	131	0,075	0,000	0,025	0,111
	133	0,125	0,150	0,000	0,000
135	0,075*	0,000	0,000	0,000	

\* Popülasyona özgü (private) alleller

Çalışılan dört nSSR lokusuna (SSR-15, SSR-20, SSR-27 ve SSR-38) ait alleller ve baz çifti (bç) olarak büyüklükleri belirlenmiştir. Dört nSSR primerinden, SSR-20 primeri monomorfik (130 bç'lik tek allel), diğer primerler ise polimorfik olarak saptanmıştır. Analiz edilen kum zambağı populasyonlarına ait örneklerde dört lokus için toplam 20 allel belirlenmiştir. Analizlerde kullanılan primerlerden en çok allel (11) SSR-38 primerinde, en az allel (1) ise monomorfik olan SSR-20 primerinde görülmüştür. SSR-15 primerinde 3 allel ve SSR-27 primerinde 5 allel gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

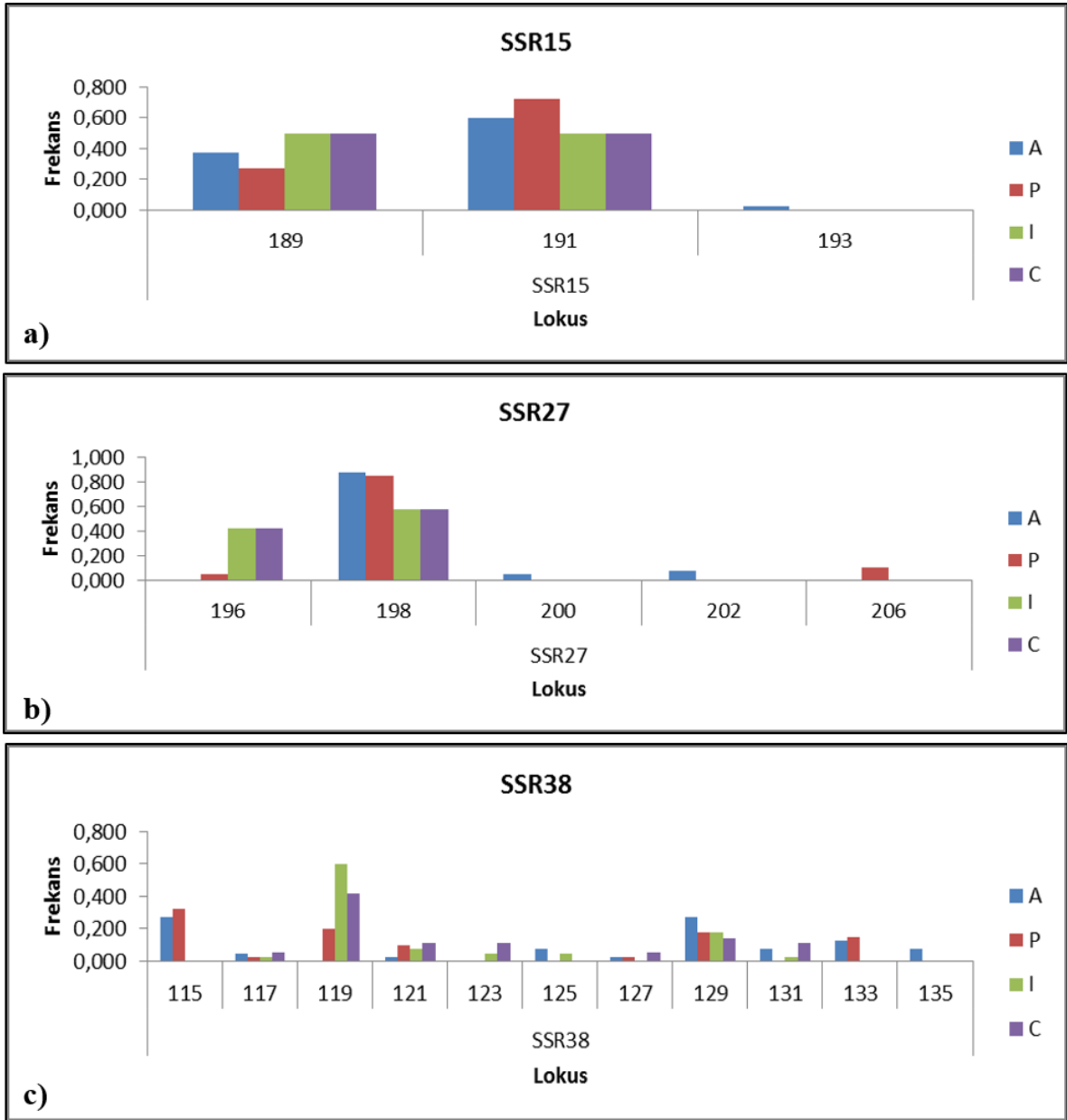
SSR-15 primeri için hesaplanan allel frekansı değerleri göz önüne alındığında 189 ve 191 bç'lik alleller bütün populasyonlarda görülmüştür. 193 bç'lik allel ise sadece Antalya populasyonunda gözlenmiştir ( $f=0,025$ ) ve Antalya populasyonuna özgü allel (private allel) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). 191 bç büyüklüğündeki allel, Antalya populasyonunda %60, Pamucak populasyonunda %72,5 oranla, İğneada ve Çamlıkoy populasyonlarında ise %50 oranla gözlenmiştir. 189 bç büyüklüğündeki allel, Antalya populasyonunda %37,5, Pamucak populasyonunda %27,5 oranla, İğneada ve Çamlıkoy populasyonlarında ise %50 oranla gözlenmiştir (Şekil 4.1a).

SSR-27 primeri için hesaplanan allel frekansı değerlerine bakıldığında 198 bç'lik allelin frekansının en yüksek olduğu belirlenmiş ve bu allel bütün populasyonlarda görülmüştür. (Şekil 4.1b). 196 bç'lik allel ise Antalya populasyonu hariç diğer bütün populasyonlarda gözlenmiştir. 200 ve 202 bç'lik alleller ise sadece Antalya populasyonunda gözlenmiştir (sırasıyla;  $f=0,050$  ve  $f=0,075$ ) ve Antalya populasyonuna özgü alleller (private allel) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). 204 bç'lik allel ise sadece Pamucak populasyonunda gözlenmiştir ( $f=0,100$ ) ve Pamucak populasyonuna özgü allel (private allel) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

SSR-38 primeri için hesaplanan allel frekansı değerleri göz önüne alındığında 117, 121 ve 129 bç'lik 3 allelin çalışılan bütün populasyonlarda varlığı tespit edilmiştir. 115 ve 133 bç'lik alleller sadece Antalya ve Pamucak populasyonlarında gözlenmiştir. 119 bç'lik allel Antalya populasyonu hariç diğer bütün populasyonlarda gözlenmiştir. 123 bç'lik allel sadece İğneada ve Çamlıkoy populasyonlarda gözlenmiştir. 119 bç'lik allel Antalya populasyonu hariç diğer bütün populasyonlarda gözlenmiştir. 127 bç'lik allel İğneada populasyonu hariç diğer bütün populasyonlarda gözlenmiştir. 135 bç'lik allel ise sadece Antalya populasyonunda gözlenmiştir ( $f=0,075$ ) ve Antalya populasyonuna özgü allel (private allel) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1c).

Her bir lokustaki allellerin populasyonlara göre dağılımına bakıldığında, bazı allellerin sadece bir populasyona özgü allel olduğu (private allel) görülmüştür. Populasyona özgü alleller en çok Antalya populasyonunda (4 allel) gözlenmiştir. Pamucak populasyonunda 1 allel

populasyona özgü olarak belirlenmiş, diğer populasyonlarda ise populasyona özgü allel gözlenmemiştir.



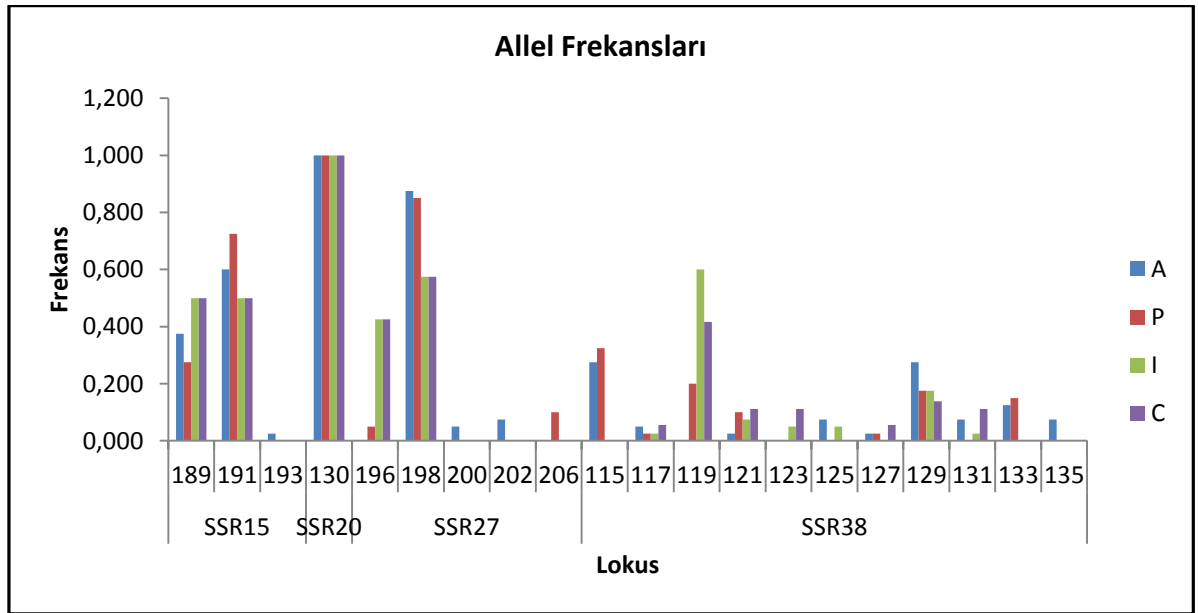
**Şekil 4.1.** Çalışmada analiz edilen polimorfik nSSR lokuslarının [a) SSR-15, b) SSR-27, c) SSR-38] her birindeki allellerin, allel büyüklüklerine göre çalışılan populasyonlardaki frekans dağılımları

#### 4.2 Gen Frekansları ve Genetik Çeşitlilik

Çalışma kapsamında 4 kum zambağı populasyonundan belirlenen toplam 81 bireyde 4 farklı nSSR lokusuna ait toplam 20 allel belirlenmiştir. Her bir lokusta ve her bir populasyonda gözlenen alleller karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Bu tez çalışmasında

örneklene Antalya (A), Pamucak (P), İğneada (I) ve Çamlıkoy (C) doğal kum zambağı popülasyonlarının genetik çeşitliliğine ait bilgiler ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) (Botstein ve ark. 1980) Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Ortalama allel sayısı ( $N_a$ ) 3,00 ile 4,00 arasında, etkili allel sayısı ( $N_e$ ) ise 1,860 ile 2,405 arasında değişmektedir. Allel sayısı en yüksek (16 allel) Antalya popülasyonunda, en düşük (12 allel) İğneada ve Çamlıkoy popülasyonlarında görülmüştür. Bütün örnekler ele alındığında ortalama  $N_e$  değeri  $2,190 \pm 0,344$  olarak bulunmuştur. Shannon sabiti (I),  $0,779 \pm 0,402$  değeri ile en yüksek Antalya popülasyonunda,  $0,666 \pm 0,264$  değeri ile en düşük İğneada popülasyonunda hesaplanmıştır. Yüksek I değeri popülasyon içinde önemli oranda varyasyon olduğunu göstermektedir. Nei’nin (1987) beklenen ( $H_e$ ) ve gözlenen ( $H_o$ ) heterozigotluk değeri her popülasyon için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Gözlenen ( $H_o$ ) ve beklenen ( $H_e$ ) heterozigotluk değeri en yüksek Çamlıkoy popülasyonunda saptanmıştır (sırasıyla 0,546 ve 0,438).

Çalışmada kullanılan dört nSSR belirteci için ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri, Antalya popülasyonunda 0,350, Pamucak popülasyonunda 0,332, İğneada popülasyonunda 0,328 ve Çamlıkoy popülasyonunda 0,371 olarak hesaplanmıştır. Analiz edilen bütün örnekler ele alındığında ortalama PIC değeri, 0,345 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, en yüksek PIC değeri SSR-38 lokusunda, en düşük PIC değeri ise SSR-27 lokusunda hesaplanmıştır (SSR-20 lokusu monomorfik olduğundan PIC değeri sıfır olarak hesaplanmıştır) (Çizelge 4.2).



**Şekil 4.2.** Çalışmada kullanılan nSSR lokuslarındaki allellerin 4 kum zambağı popülasyonunda frekans dağılımları

Çizelge 4.2. Doğal kum zambağı populasyonlarına ait genetik çeşitlilik parametreleri

Populasyon	Lokus	N*	N <sub>a</sub> *	N <sub>e</sub> *	I*	H <sub>o</sub> *	H <sub>e</sub> *	PIC*
Antalya (A)	SSR-15	20	3,000	1,995	0,767	0,450	0,499	0,397
	SSR-20	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0
	SSR-27	20	3,000	1,292	0,461	0,050	0,226	0,214
	SSR-38	20	9,000	5,333	1,887	0,950	0,813	0,789
	Ortalama	20	4,00 (±1,732)	2,405 (±0,998)	0,779 (±0,402)	0,363 (±0,220)	0,384 (±0,175)	0,350
Pamucak (P)	SSR-15	20	2,000	1,663	0,588	0,450	0,399	0,319
	SSR-20	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0
	SSR-27	20	3,000	1,361	0,518	0,200	0,265	0,247
	SSR-38	20	7,000	4,762	1,691	0,900	0,790	0,760
	Ortalama	20	3,250 (±1,215)	2,196 (±0,866)	0,699 (±0,356)	0,388 (±0,194)	0,363 (±0,165)	0,332
İğneada (I)	SSR-15	20	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,375
	SSR-20	20	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0
	SSR-27	20	2,000	1,956	0,682	0,450	0,489	0,369
	SSR-38	20	7,000	2,484	1,290	0,550	0,598	0,566
	Ortalama	20	3,00 (±1,354)	1,860 (±0,311)	0,666 (±0,264)	0,500 (±0,205)	0,397 (±0,134)	0,328
Çamlıkoy (C)	SSR-15	18	2,000	2,000	0,693	1,000	0,500	0,375
	SSR-20	21	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0
	SSR-27	20	2,000	1,956	0,682	0,350	0,489	0,369
	SSR-38	18	7,000	4,235	1,693	0,833	0,764	0,739
	Ortalama	19,25 (±0,750)	3,00 (±1,354)	2,298 (±0,686)	0,767 (±0,349)	0,546 (±0,228)	0,438 (±0,159)	0,371
<b>Toplam</b>	<b>Ortalama</b>	19,813 (±0,188)	3,313 (±0,656)	2,190 (±0,344)	0,728 (±0,155)	0,449 (±0,097)	0,396 (±0,072)	0,345

\*N = örnek sayısı, N<sub>a</sub> = gözlenen allel sayısı, N<sub>e</sub> = etkili allel sayısı, I = Shannon sabiti, H<sub>o</sub> = gözlenen heterozigotluk, H<sub>e</sub> = beklenen heterozigotluk (Nei 1987), PIC = Polimorfik bilgi içeriği, ± standart hata.

Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre çalışılan dört kum zambağı populasyonları arasındaki varyasyonun büyük oranda (%81) populasyon içerisinde olduğu, populasyonlar arası genetik çeşitliliğin düşük olduğu (%19) gözlenmiştir ( $F_{ST} = 0,194$ ) (Çizelge 4.3). İstatistiki analizler sonucunda, bütün örnekler ele alındığında  $F_{ST}$  değerleri SSR-15 lokusu için 0,036, SSR-27 lokusu için 0,149 ve SSR-38 lokusu için 0,107 olarak bulunmuştur.  $F_{IS}$  ve  $F_{IT}$  değerleri bütün lokuslar ele alındığında sırasıyla ortalama -0,111 ve -0,019 olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.3.** Basamaklı mutasyon modeline göre yapılan moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçları

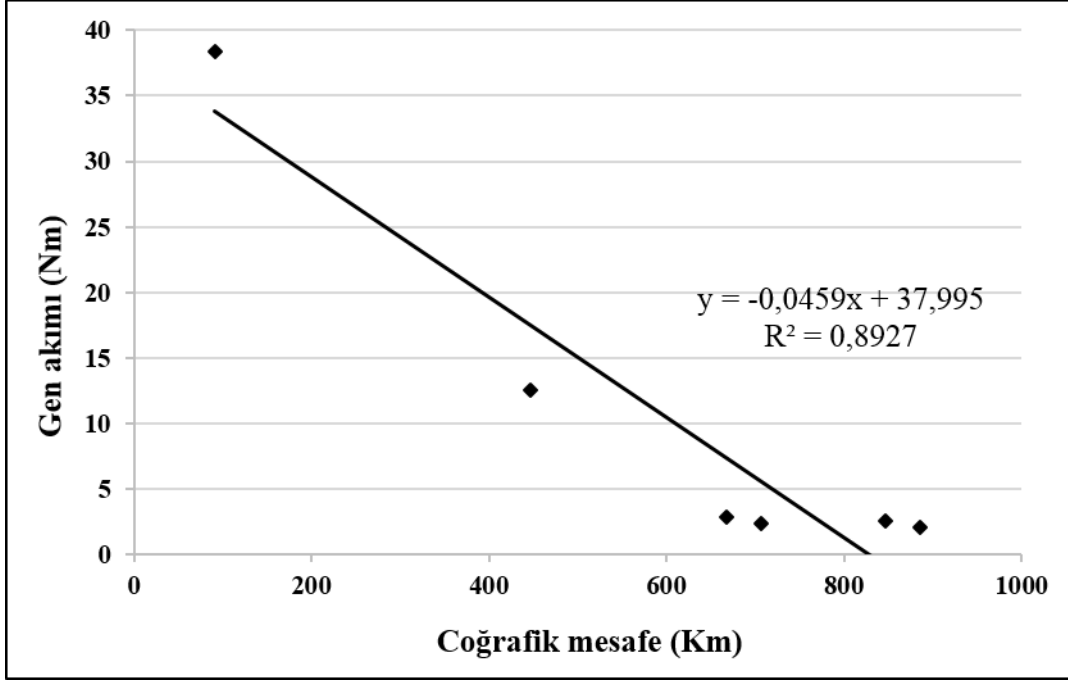
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Varyans (%)
Populasyonlar-arası	3	28,678	0,392	% 19
Populasyonlar-içi	77	125,100	1,625	% 81
<b>Toplam</b>	80	153,778	2,017	% 100

Çalışılan dört populasyonun  $N_m$  değerlerini bulmak için  $F_{ST}$  değerleri kullanıldı.  $F_{ST}$  değerleri kullanılarak tüm populasyonlar hep birlikte değerlendirildiğinde  $N_m$  değeri ortalama 10,13 olarak hesaplanmıştır. Populasyon çiftleri arasındaki  $F_{ST}$  ve  $N_m$  değerleri Çizelge 4.4'te sunuldu. Populasyonların coğrafik mesafeleri (km) ve  $N_m$  değerleri arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemek için korelasyon analizi yapılmıştır (Şekil 4.3). Buna göre, populasyon çiftleri arasındaki coğrafik mesafe ve gen akımı değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulunmuştur ( $r = -0,945$ ,  $p \leq 0,05$ ,  $sd:4$ ). Populasyonlar arası coğrafik mesafe arttıkça, gen akımı azalmaktadır ( $r_{tablo} = 0,812$ ).

**Çizelge 4.4.** Çalışılan *P. maritimum* populasyonları arasındaki  $F_{ST}$  ve  $N_m$  değerleri (sol alt diyagonal:  $F_{ST}$  değerleri, sağ üst diyagonal:  $N_m$  değerleri)

Populasyonlar	Antalya	Pamucak	İğneada	Çamlıkoy
Antalya	***	12,500	2,089	2,555
Pamucak	0,020	***	2,429	2,809
İğneada	0,107	0,093	***	38,394
Çamlıkoy	0,089	0,082	0,006	***





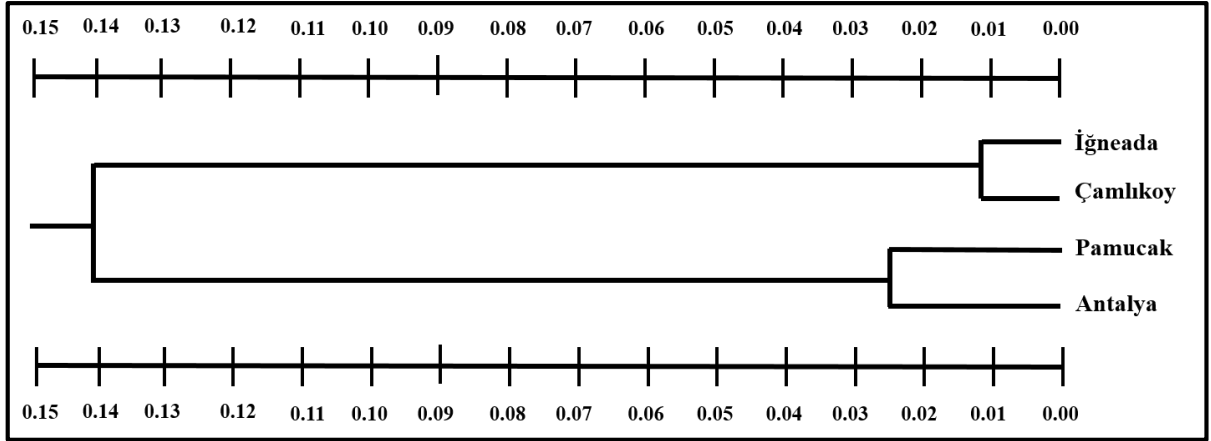
**Şekil 4.3.** Çalışılan *P. maritimum* populasyonlarının  $N_m$  değerleri ile coğrafik mesafeleri arasındaki ilişki

Nei'nin tarafsız genetik benzerlik veya farklılık katsayısı kullanılarak populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın düzeyi belirlenmiştir (Nei 1987). Çalışmada kullanılan 4 nSSR lokusuna ait bilgilere dayanarak elde edilen genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Genetik benzerlik değerleri 0,840 ile 0,989 arasında değişiklik göstermiştir. Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi genetik mesafe değeri en düşük (0,011) Çamlıkoy-İğneada populasyonları arasında, en yüksek (0,175) İğneada-Antalya populasyonları arasında bulunmuştur. Mümkün olan bütün populasyon çiftleri göz önüne alındığında ortalama genetik mesafe değeri 0,100 olarak hesaplanmıştır.

Çalışılan dört doğal kum zambağı populasyonunda genetik farklılaşmanın görsel bir grafik üzerinde izlenebilmesi için, genetik farklılaşma değerleri UPGMA kümelendirme yöntemi kullanılarak sınıflandırıldı ve bir dendrogram yapıldı (Şekil 4.4). Bu dendrograma bakılarak populasyonlar arasındaki genetik farklılıklar görsel olarak da anlaşılmaktadır. Dendrograma bakıldığında coğrafik olarak da birbirine yakın olan İğneada ve Çamlıkoy populasyonlarının, Antalya ve Pamucak populasyonlarının genetik yapılarının birbirine benzer olduğu ve 2 ayrı grubu oluşturduğu görülmektedir. Pamucak populasyonu coğrafik olarak yakın olmasının da etkisi ile İğneada-Çamlıkoy çiftine genetik olarak Antalya populasyonuna kıyasla daha yakın bulunmuştur (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** *P. maritimum* populasyonları arasında Nei (1987)'ye göre hesaplanan genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri (sol alt diyagonal: genetik benzerlik, sağ üst diyagonal: genetik mesafe değerleri)

Populasyonlar	Antalya	Pamucak	İğneada	Çamlıkoy
Antalya	***	0,025	0,175	0,141
Pamucak	0,975	***	0,134	0,115
İğneada	0,840	0,875	***	0,011
Çamlıkoy	0,869	0,891	0,989	***



**Şekil 4.4.** *P. maritimum* populasyonlarının nSSR analizleri sonucunda genetik mesafe değerlerine göre oluşturdukları dendrogram (UPGMA'ya göre)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, kum zambağının ülkemizde doğal yayılış gösterdiği dört farklı populasyondan (İğneada, Çamlıkoy, Pamucak ve Antalya) toplanan taze yaprak örnekleri kullanılarak genetik analizler yapılmıştır. Toplanan yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA örnekleri kullanılarak dört nSSR lokusu (SSR-15, SSR-20, SSR-27, SSR-38), PCR ile çoğaltılmıştır. DNA parça (fragment) analizleri ile nSSR lokuslarına ait toplam 20 allel belirlenmiştir. Çalışmada; her populasyon için örnek sayısı (N), gözlenen allel sayısı ( $N_a$ ), etkili allel sayısı ( $N_e$ ), Shannon sabiti (I), gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ) ve beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ) gibi genetik parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Çizelge 4.3'teki veriler ise AMOVA sonuçlarını ortaya koymaktadır. Analizler sonucu elde edilen verilerle doğal kum zambağı populasyonlarının genetik çeşitliliği ve türün genetik yapısı hakkında önemli bilgilere ulaşılmıştır.

Kum zambağı ile ilgili daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde; kum zambağında alkaloid biyosentezi, kimyasal kompozisyon ve eczacılıkla ilgili çalışmalar, genetik karakterizasyon, farklı bölgelere ait kum zambağı populasyonları arasındaki morfolojik ve moleküler farklılıklar gibi konularda çalışmalara rastlanılmaktadır. Kum zambağı ile ilgili farklı ülkelerde farklı araştırmacılar tarafından izoenzim (Sanaa ve ark. 2010), RAPD (Zahreddine ve ark. 2004, El-Hadidy ve ark. 2012), AFLP (Grassi ve ark. 2005), plastid DNA belirteçleri (De Castro ve ark. 2012) ve SSR (Di Maio ve De Castro 2013, De Castro ve ark. 2016b) gibi belirteçler kullanılarak filogenetik, biyocoğrafik veya genetik yapıyı ve çeşitliliği belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ülkemiz populasyonlarından örneklenen moleküler düzeyde yapılmış sadece bir çalışma mevcuttur. 2010 yılında IV. Ulusal Süs Bitkileri Kongresinde poster olarak yayınlanmış bu çalışmada Mersin ilinden iki farklı bölgeden toplanan kum zambağı genotiplerinin genetik farklılıklarının SRAP ve RAPD belirteçleri kullanılarak belirlendiği bildirilmiştir (Hocagil ve ark. 2010).

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan 4 nSSR lokusundan (SSR-15, SSR-20, SSR-27, SSR-38) 3 tanesinin (SSR-20 hariç) %75 oranında polimorfik olduğu saptanmıştır. Benzer genetik çalışmalarla karşılaştırıldığında; Zahreddine ve ark. (2004)'nın Lübnan'da yayılış gösteren kum zambağı populasyonlarının genetik yapısını belirlemek için 10 RAPD primeri kullanarak yaptıkları çalışmada, kullanılan 10 primerde 110 tanesi polimorfik olmak üzere toplam 118 bant belirlendiği görülmektedir. Grassi ve ark. (2005) tarafından yapılan ve Kuzey Tiren Denizi bölgesindeki 4 farklı ülkenin (Fransa, İspanya, İtalya ve Yunanistan) 10 farklı yerinden toplanan kum zambaklarıyla yapılan, biyoçeşitlilik değerlendirmesi çalışmasında, 6

farklı AFLP primeri kullanılmıştır. Çalışılan 10 *P. maritimum* popülasyonunda 956 bant belirlenmiş ve bunlardan 34 tanesinin (%3,56) polimorfik olduğu bildirilmiştir. Sanaa ve ark. (2010)'nın Tunus'taki 5 ada ve 14 anakara popülasyonunda yaptıkları çalışmada 7 izoenzim kullanılmış, çalışmalar sonucunda 18 lokustan 12 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. El-Hadidy ve ark. (2012), Mısır'daki *Panocratium* türlerinin taksonomik revizyonunu belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 26 kantitatif morfolojik karakter ve 11 adet RAPD primerleri kullanmışlardır. Çalışmada, %74,13'ü polimorfik olmak üzere 140 bant belirlenmiştir. Toplam bant sayısı 140 (ortalama 12,72) ve polimorfik bant sayısı ise 111 (ortalama 10,09) olarak bildirilmiştir. Di Maio ve De Castro (2013), SSR protokolü uygulayarak 21 mikrosatellit belirteci geliştirme ve karakterizasyonu konusunda bir çalışma yapmışlardır. Geliştirilen 21 belirteçten 19 tanesi polimorfik bulunurken, 2 tanesinin monomorfik olduğu gözlenmiştir. De Castro ve ark. (2016b)'nin, çevresel değişkenlerin Akdeniz havzasındaki *P. maritimum* üzerine etkilerini ve türün genetik yapısını analiz etmeye yönelik yaptıkları çalışmada, 6 adet nSSR primeri kullanılmıştır. 48 *P. maritimum* popülasyonu için yapılan analizler sonucunda, popülasyonlar içi polimorfik lokus oranı %67-100 arasında, ortalama olarak %94,44 bulunmuştur.

Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan 4 nSSR belirteci için ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC) değeri, Antalya popülasyonunda 0,350, Pamucak popülasyonunda 0,332, İğneada popülasyonunda 0,328 ve Çamlıkoy popülasyonunda 0,371 olarak hesaplanmıştır. Di Maio ve De Castro (2013), İsrail, İtalya ve İspanya'dan örneklenen toplam 48 bireyde 21 mikrosatellit belirteci için PIC değerlerini hesaplamak için CERVUS v3.0.3 (Kalinowski ve ark. 2007) programını kullanmışlar ve bu değerlerin 0 ile 0,752 arasında değiştiğini, ortalama olarak ise 0,39 olduğunu belirlemişlerdir. Di Maio ve De Castro (2013) tarafından yapılan çalışmada en yüksek PIC değerinin SSR-38 lokusunda olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da bütün popülasyonlar ele alındığında en yüksek PIC değeri SSR-38 lokusunda saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2'deki veriler dört kum zambağı popülasyonuna ait bireylerin genetik çeşitliliğine ait bilgileri ortaya koymuştur. Çalışılan dört nSSR lokusu (SSR-15, SSR-20, SSR-27, SSR-38) ele alındığında toplam 20 allel saptanmıştır. Bütün SSR lokusları birlikte düşünüldüğünde popülasyon başına düşen ortalama allel sayısı 12,25 olarak belirlenmiştir. Her bir SSR lokusu ayrı olarak değerlendirildiğinde popülasyondaki her bir lokus için ortalama allel sayısı 3,313 ( $\pm 0,656$ ) olarak hesaplanmıştır. De Castro ve ark. (2016b) tarafından yapılan çalışmada altı nSSR lokusu kullanılarak (3 tanesi bu tez çalışmada kullanılan lokuslar ile ortak) 48 kum zambağı popülasyonunda yapılan çalışmada lokus başına 17 ile 27 arasında allel

belirlenmiş, lokus başına düşen ortalama allel sayısı 22 ( $\pm 1,53$ ) olarak bildirilmiştir. De Castro ve ark. (2016b)'nın çalışmasında elde edilen bu değerin bu tez çalışmasından elde edilenden yüksek olmasının nedeni Cezayir (3), Hırvatistan (2), Fransa (5), Yunanistan (4), İsrail (1), İtalya (19), Libya (1), Malta (1), Fas (3), Portekiz (1), İspanya (6), Tunus (1) ve Türkiye (1) gibi farklı ülkelerden populasyonlara ait yüksek sayıda (toplam 867) birey üzerinde analizlerin gerçekleştirilmesi ve her bölgedeki populasyonun farklı gen havuzlarına sahip olması olabilir. Ayrıca her bir SSR lokusu ayrı olarak değerlendirildiğinde popülasyondaki her bir lokus için allelik zenginlik 2,14 ile 3,85 arasında, ortalama allel sayısı 2,84 ( $\pm 0,06$ ) olarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen etkili allel sayısı (allel zenginlik) 1,86 ile 2,405 arasında (ortalama  $2,190 \pm 0,344$ ) olarak hesaplanmıştır, hesaplanan değer ile De Castro ve ark. (2016b)'nin çalışmasında elde edilen değer arasında paralellik bulunmaktadır. Sanaa ve ark. (2010), Tunus'da tehlike altında bulunan *P. maritimum*'a ait 19 popülasyonunun genetik çeşitliliği üzerine 7 izoenzim beliteci kullanarak bir çalışma yapmıştır. Sanaa ve ark. (2010)'nın izoenzimleri kullanarak yaptıkları çalışmada gözlenen ortalama allel sayısını ( $N_a$ ) ada popülasyonları için 1,37, anakara popülasyonları için 1,30 olarak bildirmiştir. Di Maio ve De Castro (2013) tarafından yapılan çalışmada, 3 farklı popülasyonun (İsrail, İtalya ve İspanya) her birinden 16 birey olmak üzere toplam 48 bireyde karakterize edilen 21 mikrosatellit belirteci için allel sayıları 1 ile 11 arasında (ortalama 4,4) bulunmuştur.

Bu çalışmada Antalya popülasyonunda SSR-15 lokusuna ait 1, SSR-27 lokusuna ait 2 olmak üzere toplam 3 adet, Pamucak popülasyonunda SSR-27 lokusuna ait 1 adet popülasyona özgü (private) allel belirlenmiştir (Çizelge 4.1). De Castro ve ark. (2016b), çalışılan 48 popülasyonun 17 tanesinde toplam 42 adet popülasyona özgü (private) allel bulunduğunu bildirmiştir. Bildirilen 42 adet popülasyona özgü (private) allelin dağılımı; Cezayir 2, Hırvatistan 6, Fransa 2, Yunanistan 6, İsrail 6, İtalya 14, Libya 1, Malta 2, İspanya 2 ve Türkiye 1 olarak rapor edilmiştir.

Çalışmamız sonucunda genetik çeşitlilik parametrelerinden biri olan Shannon sabiti (I) en yüksek Antalya popülasyonunda ( $0,779 \pm 0,402$ ), en düşük İğneada popülasyonunda ( $0,666 \pm 0,264$ ) hesaplanmıştır. Yüksek I değeri (ortalama 0,728) popülasyon içindeki varyasyonun yüksek olduğunun göstergesidir. Bu çalışmada gözlenen ortalama heterozigotluk değeri ( $H_o$ ) 0,449 ve beklenen ortalama heterozigotluk değeri ( $H_e$ ) ise 0,396 olarak hesaplanmıştır. Di Maio ve De Castro (2013) tarafından yapılan çalışmada gözlenen heterozigotluk değeri her lokus için 0,000 ile 1,000 arasında değişirken, beklenen heterozigotluk değerinin 0,000 ile 0,830 arasında olduğu hesaplanmıştır. De Castro ve ark. (2016b) yaptıkları çalışmanın sonucunda, gözlenen ortalama heterozigotluk değerini 0,60, beklenen ortalama heterozigotluk değerini ise 0,54

bulmuşlardır. Sanaa ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada, gözlenen ve beklenen ortalama heterozigotluk değerlerini BIOSYS-1 programı (Swofford ve Selander 1981) kullanarak hesaplamışlardır. Sanaa ve ark. (2010) tarafından yapılan bu çalışmada ortalama beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ) 0,100 ve ortalama gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ) 0,086 olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada Hardy–Weinberg dengesinden istatistiki olarak önemli derecede sapmalar ve önemli derecede heterozigotluk eksikliği ( $F_{IS} = 0,195$ ) bildirilmiştir. Sanaa ve ark. (2010)'nın çalışmasından elde edilen sonuçların Hamrick ve Godt (1990) tarafından hayvanlarla tozlaşan karşılıklı döllen tohumlu bitkiler için bildirilen değerlerden biraz düşük olduğu görülmüştür ( $N_a = 1,54$ ,  $P = \%35,90$  ve  $H_e = 0,124$ ). Aynı çalışmada ortalama  $H_e$  değeri ada popülasyonunda 0,125, anakara popülasyonunda 0,075 olarak saptanmıştır, ada popülasyonlarında değerlerin anakaraya oranla yüksek olması şans, yüksek göç oranı ve farklılaşmış anakara popülasyonundan meydana gelen göçler ile açıklanabileceği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  ve  $F_{IT}$  değerleri bütün lokuslar ele alındığında sırasıyla ortalama 0,194, -0,111 ve -0,019 olarak bulunmuştur. De Castro ve ark. (2016b)'nın çalışmasında  $F_{ST}$  ve  $F_{IS}$  değerleri sırasıyla 0,21 ve -0,08 olarak bildirilmiştir.  $F_{IS}$  değerinin 0,1'den düşük olması çalışılan popülasyonlar arasında soy-içi üreme seviyesinin çok düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen  $F$  istatistiği değerleri ile De Castro ve ark. (2016b)'nın çalışmasındaki değerler arasında uyumluluk bulunmaktadır. Analiz edilen popülasyonlarda seyrek olarak gözlenen soy-içi üreme *P. maritimum* türünün farklı çevresel baskı altında farklı üreme stratejileri göstermesinden kaynaklanmaktadır (örneğin vejetatif üreme, popülasyon dışı veya popülasyon içi karşılıklı tozlaşma).

Basamaklı mutasyon modeline göre yapmış olduğumuz moleküler varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre, çalışılan dört kum zambağı popülasyonu arasındaki varyasyon büyük oranda (%81) popülasyon içerisindedir. Popülasyonlar arası genetik çeşitlilik ise daha düşüktür (%19). Zahreddine ve ark. (2004), AMOVA analizleri sonucu çalışılan Lübnan popülasyonları arası çeşitliliğin %47, popülasyon içi çeşitliliğin ise %53 olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlara göre, çalışılan popülasyonlarda hâlâ yüksek derecede çeşitlilik olduğu belirtilmiştir. De Castro ve ark. (2016b), AMOVA sonuçlarını baz alarak toplam genetik varyasyonun %23'ünü popülasyonlar arası farklara, %77'sini ise popülasyon içi bireyler arası farklılıklara dayandırmışlardır. Gen akımı ( $N_m$ ) genetik çeşitliliğin popülasyon içi ve arasındaki dağılımını etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Bu tez çalışmasında  $F_{ST}$  değerleri kullanılarak tüm popülasyonlar hep birlikte değerlendirildiğinde  $N_m$  değeri her bir kuşakta ortalama 10,13 olarak hesaplanmıştır. Popülasyonların coğrafik mesafeleri (km) ve  $N_m$  değerlerine göre, popülasyon çiftleri arasındaki coğrafik mesafe ve gen akımı değerleri arasında

istatistiksel olarak önemli bir ilişki bulunduğu ve populasyonlar arası coğrafik mesafe arttıkça, gen akımının azaldığı saptanmıştır. Sanaa ve ark. (2010),  $N_m$  değerini 0,77 olarak bildirmişlerdir. Grassi ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada ortalama genetik farklılaşma katsayısı ( $G_{st}$ ) 0,5169 olarak bildirilmiştir. Grassi ve ark. (2005)'in çalışmasından elde edilen  $G_{st}$  değerine göre farklı populasyonlar arası gen akımı oranının azaldığı görülmektedir. Aynı çalışmada  $N_m$  değerinin nesil başına 0,4673 olarak hesaplanması gen akım oranının azaldığını desteklemektedir ve bazı populasyonların genetik çeşitliliğinde meydana gelen azalma nedeniyle öncelikle bu populasyonlarda *in situ* ve *ex situ* koruma çalışmalarının gerekliliği çalışmada vurgulanmıştır.

Çalışmamızda populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma düzeyi, Nei'nin tarafsız genetik benzerlik veya farklılık katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır (Nei 1987). Kullanmış olduğumuz nSSR lokuslarına dayanarak hesaplanan genetik benzerlik değerleri 0,840 ile 0,989 arasında değişmektedir. Genetik farklılık değeri ise 0,011'lik değerle en düşük Çamlıkoy ve İğneada populasyonları arasında, 0,175'lik değerle de en yüksek İğneada ve Antalya populasyonları arasında bulunmuştur. Bu da İğneada ve Antalya populasyonlarının genetik olarak birbirinden en farklı iki populasyon olduğunu gösterirken, Çamlıkoy ve İğneada populasyonlarının coğrafik yakınlıkları nedeniyle yüksek benzerlik gösterdiklerini işaret etmektedir. Zahreddine ve ark. (2004) Nei'nin genetik benzerlik değerini ortalama 0,09 (0,06 ile 0,11 arası) bulmuşlardır. Grassi ve ark. (2005)'nin çalışmasında populasyon çiftleri arasındaki en yüksek genetik mesafe değerini 0,0156 olarak belirlemişlerdir. Genetik farklılaşma değerinin düşük olmasının populasyonların uzun vadede karşılaşabilecekleri biyotik ve abiyotik çevresel değişikliklere karşı hayatta kalma potansiyelini düşüreceğini belirtmişlerdir. Sanaa ve ark. (2010), Nei'nin genetik uzaklık değerini ortalama 0,024 bulmuşlardır, bu sonucun populasyonlar arası benzerliğin fazla olduğunu ve soy-içi üremenin kanıtı olabileceğini bildirmişlerdir. El-Hadidy ve ark. (2012) Nei'nin genetik uzaklık değeri ile *Panocratium*'un çalışılan türlerinin açıkça birbirinden farklı olduğunu bulmuşlardır. Tüm türlerin %15'ten daha yüksek bir oranda birbirlerinden farklı olduklarını belirtmişlerdir. En yüksek genetik mesafe değeri (0,56) *P. arabicum* ile *P. tortuosum* arasında, en düşük genetik mesafe değeri (0,15) ise morfolojik ve ekolojik olarak benzer olan *P. arabicum* ile *P. maritimum* arasında hesaplanmıştır Sanaa ve ark. (2015) ada populasyonları arasında Nei'nin genetik uzaklık değerini 0,003 ile 0,013 arasında olmak üzere, ortalama 0,007 olarak hesaplamışlardır.

Çalışmamız sonucunda elde edilen UPGMA dendrogramına göre, coğrafik olarak birbirine yakın bulunan İğneada ve Çamlıkoy populasyonlarının bir grup, Antalya ve Pamucak populasyonlarının diğer grubu oluşturduğu gözlenmiştir. Zahreddine ve ark. (2004), UPGMA

dendrogramına göre çalıştıkları Lübnan populasyonlarının 2 ana kümeye ayrıldığını, bu gruplamada hem güney hem kuzey populasyonlarının yer almasından dolayı coğrafik yakınlığın ön planda olmadığını bildirmişlerdir. Grassi ve ark. (2005) UPGMA dendrogramına göre, orta Akdeniz'de çalışılan tüm populasyonlar için yüksek genetik farklılık belirlemişlerdir, çalışılan populasyonların genetik benzerliklerinde coğrafik mesafenin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışılan bazı populasyonların genetik çeşitliliğinde azalmalar saptamışlar, *in situ* ve *ex situ* koruma çalışmalarının gerekliliğini vurgulamışlardır. Sanaa ve ark. (2010) çalıştıkları populasyonları UPGMA dendrogramına göre 3 kümeye ayırmışlardır. Anakara populasyonları ile ada populasyonlarının bazılarının aynı grupta yer aldığını bildirmişlerdir. Sanaa ve ark. (2010) çalıştıkları ada ve anakara populasyonlarının gruplanmasında deniz ve rüzgar yolu ile tohum yayılmasının etkili olabileceğini rapor etmişlerdir. El-Hadidy ve ark. (2012) ise RAPD verilerini kullanarak oluşturdukları UPGMA dendrogramına göre 4 *Panocratium* türünü 3 ana kümeye ayırmışlar; birinci gruba *P. tortuosum*'u, ikinci gruba *P. sickenbergeri*'yi dahil ederken, son gruba *P. maritimum* ile *P. arabicum*'u almışlardır.

Akdeniz ülkelerinde geniş alanlarda yayılış gösterdiği rapor edilmiş kum zambağının gereğinden fazla toplanması, kentleşme ve gelişen turizmle birlikte tehdit altında olduğu da görülmektedir ([www.minenv.gr/4/41/4107/e410705.html](http://www.minenv.gr/4/41/4107/e410705.html)). Örneğin; İspanya ve Tunus'da benzer nedenlerle doğal kum zambağı populasyonlarının azaldığı tespit edilmiştir ([www.ddgi.es/espais/illirima.htm](http://www.ddgi.es/espais/illirima.htm), Sanaa ve ark. 2010). Ayrıca Fransa sahilleri boyunca yayılış gösteren *P. maritimum* populasyonları kentleşme nedeniyle ciddi bir şekilde azalmış ve koruma altına alınmıştır ([www.perso.club-internet.fr/v\\_pascal/amaryllidaceae/321\\_panocratium.htm](http://www.perso.club-internet.fr/v_pascal/amaryllidaceae/321_panocratium.htm)). Kum zambağının tehlike altında olan türler kapsamına alındığı bir diğer bölge de Girit'tir. Girit'te 1996 yılından beri türün bulunduğu kumullarda koruma çalışması sürmektedir ([www.greenglobe.org/econett/practice/prac0043.htm](http://www.greenglobe.org/econett/practice/prac0043.htm)). Lübnan'daki doğal kum zambağı populasyonlarına ev sahipliği yapan kumul habitata verilen zararların çok ciddi boyutlara ulaştığı ve sahillerin düzenlenmesinde kum zambağı populasyonlarına zarar vermeden, peyzaj çalışmalarının içine dahil edilerek koruma çalışmalarının yapılmasının gerektiği bildirilmiş, bunun yanısıra bölgesel seviyede 'IUCN Red List' (IUCN kırmızı liste) kriterlerine göre (Gardenfors ve ark. 2001, IUCN 2001) *P. maritimum*'un populasyonları zarar görebilir [Vulnerable (VU)] olarak değerlendirilmiştir (Zahreddine ve ark. 2004). Türkiye'de ise kum zambağı populasyonlarındaki mevcut habitat tahribatlarından dolayı bu tür Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında nadir ve tehlike altında [rare and endangered (EN)] olarak değerlendirilmiş (Ekim ve ark. 2000) fakat IUCN (International Union for Conservation Nature) tarafından henüz bir değerlendirme yapılmamıştır.



Türkiye’de özellikle Kırklareli, Tekirdağ, İstanbul, Bolu, Bartın, Sinop, Samsun, Giresun, Trabzon, Antalya, Mersin, İzmir ve Adana’nın kumul sahillerinde doğal olarak bulunan kum zambakları Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2015 yılı için doğadan toplanarak ihracatı yasak olan 20 çiçek soğanı arasında yer almaktadır. Özellikle bu tez çalışmasında örneklenen 4 doğal kum zambağı popülasyonu doğadan rastgele toplanılması, turizm, halkın yeterince tür hakkında bilgilendirilmemesi, insan eliyle meydana getirilen çevre kirliliği gibi nedenlerle ciddi tehlike altındadır ve gerekli gen koruma çalışmaları ciddi olarak planlanmalıdır. Bu çalışma ile türün sadece dört popülasyonu ele alınmış ve önemli bilgiler literatüre kazandırılmıştır. Türkiye’de bulunan diğer popülasyonların genetik açıdan değerlendirilmesi için yeni çalışmaların yapılması önemlidir, ülkemizde yer alan bütün popülasyonları içeren etkin moleküler belirteçler kullanılarak yapılacak yeni çalışmalar türün gen kaynaklarını koruma stratejilerinin belirlenmesinde önemli rol oynayacaktır.

*P. maritimum* gibi birçok canlı türüne ev sahipliği yapan kumul habitatların özellikle insan eliyle zarar görmesi gün geçtikçe ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Bunun sonucunda bu habitatlarda yaşayan canlıların nesilleri tehlike altına girmekte ve içinde buldukları tehlike kategorisinde bir üst seviyeye çıkmalarına neden olmaktadır. Bu nedenle acil bir şekilde koruma çalışmaları yapılmazsa ileride gen kaynakları açısından ciddi sonuçlarla karşılaşmak olasıdır. Türlerin genetik çeşitliliğinin analizi koruma çalışmalarında bir yol belirlemek açısından çok kritik bir noktadır. Bu nedenle özellikle tehlike altında olan türlerde gen koruma çalışmalarının planlanması için etkili belirteçler ile türün genetik yapısının ortaya konulması ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. İnsan aktivitelerinin türlerin bütünlüğü ve genetik çeşitliliğine olan katkısı aşikardır, bu nedenle ciddi tehlike altında olan bütün türler için her birine uygun *in situ* ve *ex situ* gen koruma çalışmaları planlanmalıdır. *Ex situ* gen koruma çalışmaları bulunduğu bölgedeki bütün popülasyonlardan yeterli sayıda tohum ve soğan toplanarak uygun habitatlarda yetiştirilmesi ile veya yeteri kadar tohum veya soğan elde edilemiyorsa doku kültürü çalışmaları ile kısa sürede fazla sayıda bitki elde edilip onların yetiştirilmesi ile sağlanabilir. Ayrıca etkili koruma programlarının oluşturulması için kantitatif karakterler kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin farklı popülasyonlar ve bireyler kullanılarak moleküler belirteçlerden elde edilen verilerle ilişkilendirilmesi de önemlidir. Sonuç olarak yapmış olduğumuz bu tez çalışması ve elde ettiğimiz veriler, kum zambağı koruma programları ve gen kaynakları açısından ileride yapılacak çalışmalara önemli katkılar sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdel-Mawgood AL (2012). DNA Based Techniques for Studying Genetic Diversity, Genetic Diversity in Microorganisms. Prof. Mahmut Çalışkan (Eds.). ISBN: 978-953-51-0064-5.
- Adany I, Yazlovitskaya EM, Haug JS, Voziyan PA, Melnykovich G (1994). Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and nonneoplastically-derived cells in culture. *Cancer Lett.* 79: 175-179.
- Akkaya MS, Bhagwat AA, Creagan PB (1992). Length Polymorphism of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. *Genetics*, 132: 1131-1139.
- Alp Ş (2006). Soğanlı bitkilerin kent peyzajında kullanımı. <http://www.plantdergisi.com/yazi-doc-dr-sevket-alp-186.html>
- Anonim (2014). Süs Bitkileri ve Çiçek Bakımı, Kum zambağı, deniz nergisi '*P. maritimum*' <http://www.bitkivecicek.com/kum-zambagi-deniz-nergisi-pancratium-maritimum> (Erişim tarihi: 29 Aralık 2014)
- Anonim (2015). Doğal Çiçek Soğanlarının Üretimi, Doğadan Toplanması Ve İhracatına İlişkin Yönetmelik, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (tebliğ no: 2014/56).
- Anonim (2016). *Panocratium*. [http://eol.org/pages/29183/names/related\\_names](http://eol.org/pages/29183/names/related_names). (Erişim tarihi: 29 Ekim 2016)
- Anzidei M, Madaghiale A, Sperisen B, Ziegenhagen B and Vendramin GG (1999). Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. URL:<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>.
- Arslan N, Gürbüz B, Gümüştü A, Sarıhan EO, İpek A, Özcan S, Mirici S, Parmaksız İ (2002). *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. Türünün kültüre alınması üzerinde araştırmalar. II. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 22-24 Ekim 2002, Antalya.
- Atik AD, Öztekin M, Erkoç F (2010). Biyoçeşitlilik ve Türkiye'deki Endemik Bitkilere Örnekler. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 30(1): 219-240.
- Azmat MA, Khan IA, Cheema HMN (2012). Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 13: 239. doi:10.1631/jzus.B1100194.
- Balestri E, Luvvarini G, Cinelli F (2001). Isolation of leaf protoplasts from *Panocratium maritimum* L. and two other dune plants: possible applications. *Journal of Coastal Research*, 17(1), 188-194. West Palm Beach (Florida), ISSN 0749-0208.

- Balestri E, Cinelli F (2004). Germination and early-seedling establishment capacity of *Panocratium maritimum* L. (*Amaryllidaceae*) on coastal dunes in the North-Western Mediterranean. *Journal of Coastal Research*, 20 (3): 761-770.
- Bandelj D, Jakse J, Javornik B (2004). Amplification of fluorescent-labelled microsatellite markers in olives by a novel, economic method. *Acta Agriculturae Slovenica*, 83(2): 323-329.
- Baytop T (1984). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniversitesi Yayınları: 3255, Eczacılık Fakültesi Yayınları: 40, 520 s., İstanbul.
- Berkov S, Evstatieva L, Popov S (2004). Alkaloides in Bulgarian *Panocratium maritimum* L. *Z. Naturforsch*, 59: 65-69.
- Berkov S, Pavlov A, Georgiev V, Weber J, Bley T, Viladomat F, Bastida J, Codina C (2010). Changes in apolar metabolites during *in vitro* organogenesis of *Panocratium maritimum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 827e835.
- Bogdanova Y, Stanilova M, Gushev C, Bosseva Y, Stoeva T (2008). *In vitro* propagation of *Panocratium maritimum* L. (*Amaryllidaceae*) by liquid cultures. *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (1): 45-46.
- Bogdanova Y, Pandova B, Yanev S, Stanilova M (2009). Biosynthesis of Lycorine by *in Vitro* Cultures of *Panocratium maritimum* L. (*Amaryllidaceae*), *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23: 919-922, DOI: 10.1080/13102818.2009.10818572.
- Botstein D, White RL, Skolnick K, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet*. 4(11): 900-910.
- Catherine MH, Ghosh S, Todd JA (1992). Microsatellites for Linkage Analysis of Genetic Traits. *Tig August 1992 vol.8 No.8 England*.
- Davis PH (1984). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh. 8: 1-632.
- De Castro O, Brullo S, Colombo P, Jury S, De Luca P, Di Maio A (2012). Phylogenetic and biogeographical inferences for *Panocratium* (*Amaryllidaceae*), with an emphasis on the Mediterranean species based on plastid sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170: 12-28.
- De Castro O, De Luca A, Menale B (2016a). Chloroplast inheritance in the sea daffodil (*Panocratium maritimum*, *Amaryllidaceae*) through controlled crosses, seed germination and molecular analyses, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, DOI: 10.1080/11263504.2016.1244123.
- De Castro O, Di Maio A, Di Febbraro M, Imparato G, Innangi M, VeÀla E (2016b). A Multi-Faceted Approach to Analyse the Effects of Environmental Variables on Geographic Range and Genetic Structure of a Perennial Psammophilous Geophyte: The Case of the

Sea Daffodil *Pancratium maritimum* L. in the Mediterranean Basin. PLoS ONE 11(10): e0164816. doi:10.1371/journal.pone.0164816.

- De Felice B, Manfellotto F, D'Alessandro R, De Castro O, Di Maio A, Trifuoggi M (2013). Comparative transcriptional analysis reveals differential gene expression between *Sand Daffodil* tissues. *Genetica*, 141: 443.
- Demir A (2013). Sürdürülebilir gelişmede yükselen değer; biyolojik çeşitlilik açısından Türkiye değerlendirmesi. *İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 24: 67-74.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A Plant DNA Minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21.
- Di Maio A, De Castro O (2013). SSR-patchwork: an optimized protocol to obtain a rapid and inexpensive SSR library using first generation sequencing technology. *Appl Plant Sci* 1(1):1200158.
- Dothan NF (1986). *Flora Palaestina Vol. 4*. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel.
- Doyle JJ, Doyle JI (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Dragassaki M, Economou AS, Vlahos JC (2003). Bulblet formation *in vitro* and plantlet survival extra vitrum in *Pancratium*. I. International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants, 25 November, Sani-Halkidiki, Macedonia, Greece, pp: 347-352.
- Eisikowitch D, Galil J (1971). Effect of wind on the pollination of *Pancratium maritimum* L. (*Amaryllidaceae*) by Hawkmoths (*Lepidoptera: Sphingidae*). *Journal of Animal Ecology*, 40 (3): 673-678.
- Ekim T, Koyuncu M, Erik S, İlarıslan R (1989). Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitki Türleri. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayın No: 18, Ankara.
- Ekim T, Arslan N, Koyuncu M (1992). Exported flower bulbs from Turkey and measurements taken, *Acta Hort.*, 325:861-866.
- Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N (2000). Red Data Book of Turkish Plants (Pteridophyta and Spermatophyta). Turkish Association for Conservation of Nature, Ankara and Van Yüzüncü Yıl University (in Turkish).
- Ellegren H (1993). Genome Analysis with Microsatellite Markers. Dissertation. Department of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala.
- Ellegren H, Moore S, Robinson N, Byrne K, Ward W, Sheldon BC (1997). Microsatellite evolution-a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Mol Biol Evol.* 14(8): 854-860.
- El-Hadidy A, El-Ghani MA, Amer W, Hassan R (2012). Morphological and molecular differentiation between Egyptian species of *Pancratium* L. (*Amaryllidaceae*), *Acta biologica cracoviensia series botanica*, 54/1: 53-64.

- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Journal List Evol Bioinform Online* v.1; 2005 PMC 2658868.
- Fernandez MP, Narbona FE, Ortiz M, De los A, Talavera S, Salgueiro FJ (2000). Chromosome numbers in western plants, 892-906. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 58 (2) Madrid: Instituto Botánico, Real Jardín de Botánico CSIC, 344-345.
- Frese L, Palme A, Kik C (2014). On the sustainable use and conservation of plant genetic resources in Europe. Report from Work Package 5 “Engaging the user Community” of the PGR Secure project “Novel characterization of crop wild relative and landrace resources as a basis for improved crop breeding”.
- Gardenfors U, Hilton-Taylor C, Mace GM, Rodriguez JP (2001). The Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels. *Conservation Biology* 15(5): 1206-1212.
- Georgiev V, Ivanov I, Berkov S, Pavlov A (2011). Alkaloids biosynthesis by *Pancratium maritimum* L. shoots in liquid culture. *Acta Physiol Plant* 33: 927-933.
- Gillet EM (1999). DNA markers-concepts and characteristics. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. URL <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>.
- Giovino A, Domina G, Bazan G, Campisi P, Scibetta S (2015). Taxonomy and conservation of *Pancratium maritimum* (*Amaryllidaceae*) and relatives in the Central Mediterranean, *Acta Botanica Gallica*, 162:4, 289-299, DOI: 10.1080/12538078.2015.1089416.
- Godt MW, Hamrick JL, Bratton S (1995). Genetic diversity in a threatened wetland species, *Helonias bullata* (*Liliaceae*). *Conservation Biology*. 9: 596-604.
- Gökdoğan E, Kaya E (2015). Bitki Germplazmalarının Korunmasında Biyoteknolojik Yöntemlerin ve Biyoçeşitliliğin Belirlenmesinde Moleküler Markör Sistemlerinin Kullanımı. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi* 6 (Özel Sayı 2): 98-107.
- Grassi F, Cazzaniga E, Minuto L, Peccenini S, Barberis G, Basso BG (2005). Evaluation of biodiversity and conservation strategies in *Pancratium maritimum* L. for the Northern Tyrrhenian Sea. *Biodivers. Conserv.* 14: 2159-2169.
- Gümüş C (2015). Kum zambağı (*Pancratium maritimum* L.) bitkisinde yapılan araştırmalar üzerinde bir inceleme. *Derim*, 32 (1): 89-105.
- Gümüş C, Ellialtıoğlu Ş (2006). Kum zambağı (*Pancratium maritimum*)’nın doku kültürü ile çoğaltılma olanağı üzerinde bir çalışma. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 8-10 Kasım, İzmir, Bildiri Kitabı: 435-441.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC (2000). *Flora of Turkey Vol.11 (supplement 2)*, Edinburgh.

- Hamrick JL, Godt MJW (1990). Allozyme diversity in plant species. In: Brown, AHD., Clegg, MT, Kahler, AL, Weir, BS (Eds.), Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Sinauer, Sunderland, MA, USA, pp. 43-63.
- Hancock JM (1998). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: D.B. Goldstein and C. Schlötterer (Eds.). Microsatellites: Evolution and Applications. pp. 1-9. Oxford University Press.
- Hartl DL, Clark AG (1989). Principles of population genetics. 2nd edn. Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Healey A, Furtado A, Cooper T, Henry R (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. Plant Methods 10:21 DOI: 10.1186/1746-4811-10-21.
- Hetta MH, Shafei AA (2013). Comparative cytotoxic and antimicrobial activities of the alkaloid content of Egyptian *Pancratium maritimum* L. fruits and flowers. The Journal of American Science, 9 (7): 104-109.
- Hocagil MM, Pınar H, Ulun A (2010). Mersin ilinde iki farklı bölgede belirlenen kum zambağı genotiplerinin genetik farklılıklarının SRAP ve RAPD markırları yardımıyla belirlenmesi. IV. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 20-22 Ekim, Erdemli, Mersin, Bildiri Kitabı: 245-250.
- Ibrahim SRM, Mohamed GA, Shaala LA, Youssef DTA, El-Sayed KA (2013). New alkaloids from *Pancratium maritimum*. Planta Medica, 79 (15): 1480-1484.
- Ildır S (1993). VI. 5 yıllık kalkınma planı: Bitkisel ürünler (doğal çiçek soğanları süs bitkileri grubu) özel ihtisas komisyonu, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- Ioset JR, Marston A, Mahabir PG, Hostettmann K (2001). A methylflavan with free radical scavenging properties from *Pancratium littorale*. Fitoterapia, 72: 35-39.
- IUCN 2001. IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.
- Işık K, Semiz G, Kurt Y (2005). Farklı Doğal Alanların, İçerdikleri Türler Açısından UPGMA Kümelendirme Yöntemine Göre Karşılaştırılması. Korunan Doğal Alanlar Sempozyumu, SDÜ, Isparta.
- Kahraman Ö, Özzambak ME (2015). Farklı Yetiştirme Ortamlarının Toros Kardeleni (*Galanthus elwesii* Hook.)'nin Soğan Performansı Üzerine Etkileri. ÇOMÜ Zir. Fak. Derg. (COMU J. Agric. Fac.), 3 (1): 109-114.
- Kahraman B (2016). İzmir ili *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae) (kum zambağı) populasyonlarının belirlenmesi ve tozlaşma biyolojisi. Y. Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment, Mol. Ecol., 16: 1099-1106.

- Karaoğlu C (2010). Soğanlı Bitkiler ve İn Vitro Hızlı oğaltım, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 19: 24-29.
- Kaya Y, Aksakal  (2005). Endemik bitkilerin dŸnya ve TŸrkiye’deki dağılımı, Erzincan Eğitim FakŸltesi Dergisi, 7 (1): 85-99.
- Keren A, Evenari M (1974). Some ecological aspects of distribution and germinationecology of *Panocratium maritimum* L. Isr. J. Bot. 23. 202-215.
- Koyuncu M, Şener B, Temizer H, Bingl F (1993). *Leucojum aestivum* bitkisinin alkaloidleri Ÿzerinde araştırmalar. VIII. Bitkisel İla Hammaddeleri Toplantısı, İstanbŸl, Bildiri Kitabı: 227-232.
- Laurentis N, De Rosato A, Vitali C, Leone L, Milillo MA (2004). Activity of lycorine extracted from *Panocratium maritimum* on growth of some yeast strains. Rivista Italiana, EPPOS (38) Mozzo: Istituto Tetrahedron, pp: 19-23.
- Li JT, Yang J, Chen DC, Zhang XL, Tang ZS (2007). An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. School of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong, Sichuan, P.R. China. Institute of Rare Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong, Sichuan, P.R. China. Genet. Mol. Res. 6 (4): 1064-1071.
- Liu BH (1998). Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press LLC, Boca Raton New York.
- Medrano M, Guitian P, Guitian J (2000). Patterns of fruit and seed set within inflorescences of *Panocratium maritimum* (*Amaryllidaceae*): nonuniform pollination, resource limitation, or architectural effects. American Journal of Botany 87(4): 493-501.
- Meerow AW, Guy CL, Li QB, Clayton JR (2002). Phylogeny of the Tribe *Hymenocallideae* (*Amaryllidaceae*) Based on Morphology and Molecular Characters. Annals of the Missouri Botanical Garden 89(3): 400-413.
- Mitton JB (1992). The dynamic mating systems of conifers. New Forest 6: 197. doi:10.1007/BF00120645.
- Muhtar F, Şener B (1997). TŸrkiyeden ihra edilen bazı Amaryllidaceae Familyası bitkilerinin likrin ynŸnden değerlendirilmesi. XI. Bitkisel İla Hammaddeleri Toplantısı, 22-24 Mayıs 1996, Ankara, Bildiri Kitabı: 384-388.
- Navascues M, Emerson BC (2005). Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. Molecular Ecology, 14: 1333-1341.
- Nei M (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Nesi B, Trinchello D, Lazzereschi S, Ruffoni B, Grassotti A (2009). Micropropagation of *Panocratium maritimum* from twin- and tri-scales. Società Ortoflorofrutticoltura Italiana, pp: 136-138.

- Nikopoulos D, Alexopoulos AA (2008). In vitro propagation of an endangered medicinal plant: *Pancreatium maritimum* L. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 6(2): 393-398.
- Nikopoulos D, Nikopoulou D, Alexopoulos AA (2008). Methods for the preservation of genetic material of *Pancreatium maritimum* (Amaryllidaceae). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 6(3-4): 538-546.
- Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Carneiro-Vieria ML (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2): 294-307.
- Orti G, Pearse DE, Avise JC (1997). Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(20): 10745–10749.
- Özel A, Erden K (2010). İhraç edilen bazı geofitlerin pazarlanabilir soğan üretme kapasiteleri ve bazı bitkisel özelliklerinin belirlenmesi, Hr.Ü.Z.F. Dergisi, 14 (2): 90-99.
- Özhatay N, Byfield A, Atay S (2003). Türkiye'nin Önemli Bitki Alanı, Doğal Hayatı Koruma Vakfı yayını, Mas Matbaacılık, İstanbul.
- Özhatay N, Byfield A (2005). Türkiye'nin Önemli Bitki Alanı, Doğal Hayatı Koruma Vakfı, s.1-24, 476 sf, İstanbul.
- Özhatay N, Kültür S, Aslan S. (2009). Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey IV. *Turk J Bot.* 33: 191-226.
- Özhatay FN, Kültür Ş, Gürdal MB (2011). Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey V, *Turkish Journal of Botany*, 35: 589-624.
- Özşensoy Y, Kurar E (2012). Markör Sistemleri ve Genetik Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology*, Haliç University, Printed in Turkey. 10(2):11-19.
- Park Y-J, Lee JK, Kim N-S (2009). Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops. *Molecules*.14: 4546-4569.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Petit G, Groszek G, Backhaus R, Doubek D, Barr R, Meerow A (1995). Antineoplastic Agents. An Investigation Of The *Amaryllidaceae* Genus *Himenocallis*, *J. Natural Products-Lloydia*, 58: 756-759.
- Sanaa A, Fadhel N.B (2010). Genetic Diversity İn Mainland And Island Populations Of The Endangered *Pancreatium Maritimum* L. (*Amaryllidaceae*) In Tunisia, *Scientia Horticulturae*, 125: 740-747.
- Porebsky S, Grant-Bailey L, Baum B (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8-15.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996). Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats. *Trends in Plant Science*. 1 (7): 215-221.



- Robinson JP, Harris SA (1999). Amplified fragment length polymorphisms and microsatellites: A phylogenetic perspective. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.  
URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Rokbeni N, M'rabet Y, Cluzet S, Richard T, Krisa S, Boussaid M, Boulila A (2016). Determination of phenolic composition and antioxidant activities of *Pancratium maritimum* L. from Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 94: 505-513.
- Rossetto M, Weaver PK, Dixon KW (1995). Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae), *Molecular Ecology*, 4: 321-329.
- Sanaa A, Fadhel NB (2010). Genetic Diversity In Mainland And Island Populations Of The Endangered *Pancratium maritimum* L. (Amaryllidaceae) In Tunisia, *Scientia Horticulturae*, 125: 740-747.
- Sanaa A, Boulila A, Bejaoui A, Bousaid M, Fadhel NB (2012). Variation of the chemical composition of floral volatiles in the endangered Tunisian *Pancratium maritimum* L. populations (Amaryllidaceae). *Ind. Crop Prod.*, 40: 312-317.
- Sanaa A, Boulila A, Boussaid M, Fadhel NB (2014). *Pancratium maritimum* L. in Tunisia: Genetic and chemical studies among the threatened populations. *Industrial Crops and Products* 60: 75-78.
- Sanaa A, Abid SB, Boulila A, Messaoud C, Boussaid M, Fadhel NB (2015). Modeling hydrochory effects on the Tunisian island populations of *Pancratium maritimum* L. using colored Petri nets. *BioSystems* 129: 19-24.
- Sandal G, Söğüt Z (2010). Türkiye Orkideleri (Salepler). Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi 23(2): 109-116.
- Schlotterer C, Tautz D (1993). Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA. *Nucleic Acid Research* 20: 211-215.
- Scotti I, Paglia G, Magni F, Morgante M (1999). Microsatellite markers as a tool for the detection of intra- and interpopulational genetic structure. In: E.M. Gillet (Ed.). Which DNA Marker for Which Purpose? Final compendium of the research project development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.  
URL: <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Semagn K, Bjornstad A, Ndjiondjop MN (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25): 2540-2568.
- Shannon CE, Weaver W (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.

- Sneath PHA, Sokal RR (1973). Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 573 pp.
- Sokal RR, Rohlf JF (1995). *Biometry*. San Francisco, CA: W.H. Freeman.
- Swofford DL, Selander RB (1981). Biosys-1: A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. University of Illinois, Urbana, USA.
- Şekercioğlu ÇH, Anderson S, Akçay E, Bilgin R, Can ÖE, Semiz G, Tavşanoğlu Ç, Yokeş M B, Soyumert A, İpekdal K, Sağlam İK, Yücel M, Dalfes HN (2011). Turkey's globally important biodiversity in crisis, *Biological Conservation*, 144: 2752-2769.
- Şener B, Orhan İ, Satayavivad J (2003). Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from *Amaryllidaceae*, *Phytotherapy Research*, 17 (10): 1220-1223.
- Şener B, Koyuncu M, Bingöl F, Muhtar F (1999). Production of bioactive alkaloids from Turkish geophytes, IUPAC.
- Şenel G, Özkan M, Kandemir N (2002). A karyological investigation on some rare and endangered species of *Amaryllidaceae* in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 34 (3): 229-235.
- Tautz D (1989). Hypervariability of Simple Sequences as General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic acid research* 17: 463-6471.
- Titiz S, Çakıroğlu N, Birişçi YT, Çakmak S (2000). Süs Bitkileri Üretim ve Ticaretindeki Gelişmeler, Tarımsal Kongre I. Cilt. S: 709-740.
- Toivonen PMA, Sweney M (1998). Differences in chlorophyll loss at 13°C for two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities. *J. Agric. Food. Chem.* 46: 20-24.
- Ulun A, Kara H, Hocagil MM, Kaya E (2010). Alata I. derece doğal sit alanı kumullarında bulunan doğal bitkilerin süs bitkisi olarak kullanım olanaklarının araştırılması. IV. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 20-22 Ekim, Erdemli, Mersin, Bildiri Kitabı: 457-462.
- Ün C, Wimmers K, Ponsuksili S, Schmoll F, Schellander K (2000). Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları. Institute of Animal Science, University of Bonn, Germany *Hayvansal Üretim* 41: 9-14.
- Varshney RK, Graner A, Sorrels ME (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23: 48-55.
- Weber JL, May PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 44: 388-396.
- Werker E, Fahn A (1975). Seed anatomy of *Panocratium* species from three different habitats. *Bot Gaz.* 136: 396-403.
- Williams JK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

- Wright S (1978). Evolution and the Genetics of Populations: Variability Within and Among Natural Populations. Chicago University Press, Chicago, Illinois.
- Yaltırık F, Efe A (1996). Otsu Bitkiler Sistematığı, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları:10, Ders Kitabı, 518 s., İstanbul.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999). POPGENE Version 1.32. Windows-based software for population genetics analysis.
- Zahreddine H, Clubbe C, Baalbaki R, Ghalayini A, Talhouk SN (2004). Status of native species in threatened Mediterranean habitats: the case of *Pancreatum maritimum* L. (sea daffodil) in Lebanon. Biol. Conserv. 120: 11-18.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Ceren Elibol 1991 yılında Bergama'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir'in Selçuk ilçesinde tamamladı. Lisans öğrenimi için 2009 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne girdi. Bu bölümden 2014 yılında mezun oldu. Eylül 2014'te Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, Bitki Moleküler Genetiği üzerine yüksek lisans eğitimine başladı.