

***Laurus nobilis* L. (AKDENİZ DEFNESİ)  
BİTKİSİNDE FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ  
İLE CİNSİYET TAYİNİ**

**Elçin PARLAR  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sheida DANESHVAR  
ROYANDAZAGH  
2017**

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

*Laurus nobilis* L. (AKDENİZ DEFNESİ) BİTKİSİNDE FLOW SİTOMETRİ  
YÖNTEMİ İLE CİNSİYET TAYİNİ

**ELÇİN PARLAR**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. SHEİDA DANESHVAR ROYANDAZAGH**

**TEKİRDAĞ – 2017**

**Her hakkı saklıdır**

Yrd. Doç. Dr. Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH danışmanlığıNDA Elçin PARLAR tarafından hazırlanan “*Laurus nobilis* L. (Akdeniz Defnesi) Bitkisinde Flow Sitometri Yöntemi ile Cinsiyet Tayini” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR

*İmza:*

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sheida DANESHVAR – R. (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

### *Laurus nobilis* L. (AKDENİZ DEFNESİ) BİTKİSİNDE FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE CİNSİYET TAYİNİ

**Elçin PARLAR**

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

İki evcikli (dioik) bitkilerde erkek ve dişi bitkiler birbirinden ayrıdır ve gelişmelerinin ilk aşamasında, fenotipik olarak cinsiyet tayini yapılması çok zordur. Fakat bunların erken dönemde birbirinden ayrılması ticari açıdan oldukça önemlidir. Defne gibi dioik olan ve ticari değeri yüksek olan bitkilerde gelişmelerinin başında cinsiyet belirlenmesi ve amaca uygun fidan yetiştirilebilmesi oldukça önemlidir. Örnek olarak defne yağının elde edilmesinde genellikle dişi bitkiler tercih edilirken, peyzaj çalışmalarında dekoratif olarak kolay şekil alabilmesi ve daha düzenli forma sahip olmasından dolayı erkek bitkiler tercih edilmektedir. Bu nedenle erken dönemde cinsiyet belirlenmesi bu bitkinin özellikle fidancılık çalışmalarında önemli bir husustur. Bu tez çalışmasında, ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren ve ticari açıdan büyük öneme sahip olan defne (*Laurus nobilis* L.) bitkisinin yapraklarından flow sitometri analiz yöntemiyle çekirdek DNA içeriğinin analizi yapılarak cinsiyet belirleme tekniği optimize edilmiştir. Flow sitometri analiz yöntemiyle yapılan çekirdek DNA analizlerinde dişi bitkilerin DNA içeriğinin erkek bitkilere oranla daha düşük çıktığı saptanmıştır. Dişi defne yapraklarının çekirdek DNA içeriği 7,84 pg değerinin altında, erkek defne yapraklarının ise 7,95 pg üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Yapılan alışmalar sonucunda *in vitro* mikroçoğaltım yöntemleriyle elde edilen defne fidanlarının cinsiyet belirleme çalışmalarına literatür oluşturması amaçlanmıştır. Bu amaçla İstanbul, Çanakkale, Tekirdağ ve Antalya illerinden alınan örnekler materyal olarak kullanılmıştır

**Anahtar kelimeler:** dioik bitki, erkek ve dişi bitki, ekirdek DNA içeriği, cinsiyet tayini

2017, 53 sayfa

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis

### **SEX DETERMINATION IN *Laurus nobilis* L. (LAUREL) USING FLOW CYTOMETRY METHODS**

**Elçin PARLAR**

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

The dioecious plants have two types of sex in separated plants and there are many difficulties in their sex determination at the early growth stages. Sex determination at early growth stage is very important commercially, for example, it's very important to determine the sex of plants before planning sale of seedlings in arboriculture. Female plants are selected for extracting Laurel essential oil in the industry. However, due to easier design whilst the growing process as well as the good order of the male plants, they are used for the landscape activities. Therefore, the sex determination in early growth period is very important in arboriculture. Since *Laurus nobilis* L. shows natural spread in Turkey and also is very important for trade and marketing sector, the aim of this thesis was to optimize nuclear DNA content of *Laurus nobilis* L. with the flow cytometry analysis method. According to the result of the flow cytometry, the nuclear DNA content of male plants was higher compared to the DNA content of female plants. The DNA content of female and male plants was determined as  $7,84\pm 0,10$  pg and  $7,95\pm 0,13$  pg respectively. The main ideas of this research and the results are, to prepare a literature on the sex determination of bay laurel saplings using in vitro propagation techniques.

**Keywords:** dioecious plants, male and female plants, nuclear DNA content, sex determination,

**2017, 53 pages**

## TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğumuz bu çalışmada, bana yol gösteren destek ve anlayışlarımı benden esirgemeyen danışman hocam olmasından çok bir abla gibi yanımda olan yol gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH'a,

Laboratuvar çalışmalarım süresince tüm imkanları sağlayan, flow sitometri analiz yöntemi hakkında değerli bilgilerini aktaran sayın hocam Prof. Dr. Metin TUNA ve çalışma boyunca yardımını esirgemeyen sevgili Buket ŞAHİN'e

Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında bana yardımcı olan değerli arkadaşlarıma, her türlü pes etmelerimde beni ayağa kaldıran sevgili hocam Araş. Gör. Elif Ceren PEHLİVAN'a, çalışmamın arazi kısmında yardımını esirgemeyen hocam Araş. Gör. Eyüp Erdem TEYKİN, Süleyman BAYTUR ve manevi kardeşlerim Ebru Tülay UYGUN, Mustafa Hakan HAMARAT ve Mustafa KORKMAZ'a

Bizi meslektaş olarak gören ve her türlü desteği sağlayan bölüm hocalarıma, yüksek lisans eğitimim boyunca beraber olduğum arkadaşlarıma,

Bu mesleği seçmemde öncülük eden beni hayatım boyunca koruyup kollayan ne zaman istersem yanımda olan abim Timuçin PARLAR ve yüksek lisans eğitimim boyunca yardım eden ve yol gösteren yengem Hayal Güner PARLAR'a,

Yaşamım ve eğitim – öğretim hayatım boyunca maddi - manevi gösterdikleri fedakârlıklardan dolayı annem Nurseven PARLAR ve babam Kenan PARLAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz, 2017

Elçin PARLAR  
Ziraat Mühendisi

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	ix
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Defne ( <i>Laurus nobilis</i> L.) Bitkisinin Mitolojisi.....	2
1.2. Odunsu Bitkiler Hakkında Genel Bilgi .....	4
1.3. Defne Bitkisinin Genel ve Botanik Özellikleri.....	5
1.3.1. Defne Bitkisinin Doğal Yayılış Alanları .....	6
1.3.2. Defne Bitkisinin Ekolojisi .....	7
1.3.3. Defne Bitkisinin Tıbbi ve Aromatik Özellikleri.....	8
1.3.4. Defne Bitkisinin Ticari Önemi .....	10
<b>2.KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	14
2.1. Defne Bitkisinde Yapılan Çalışmalar .....	14
2.2. Flow Sitometri Cihazının Çalışma Prensibi .....	18
2.2.1. Flow Sitometri Tekniğinin Kullanım Alanları .....	19
2.2.2. Çekirdek DNA İçeriği .....	19
2.2.3. Standart Seçimi.....	20
2.3. Flow Sitometri Analiz Yöntemi Kullanılarak Çalışma Yapılan Odunsu Bitkiler .....	20
2.4. Flow Sitometri Analiz Yöntemi Kullanılarak Çalışma Yapılan Diğer Bitkiler .....	22
2.5. Cinsiyet Belirleme Amacıyla Yapılan Çalışmalar .....	25
<b>3. MATERYAL ve METOD</b> .....	27
3.1. Bitkisel Materyal .....	27
3.2. Materyallerin Eldesi ve Saklama Koşulları .....	29
3.3. Flow Sitometri ile Çekirdek DNA Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması .....	30
3.3.1. Flow Sitometri ile DNA Analizi ve Çekirdek DNA İçeriğinin Ölçülmesi .....	32
3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	33
<b>4.ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	34
4.1. Defne Bitkisinin DNA İçeriği.....	34
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	36



5.1. Dioik Bitkilerde Flow Sitometri Yöntemi İle Cinsiyet Belirlenmesi .....	38
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>40</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>41</b>
<b>8. EKLER .....</b>	<b>51</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>53</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya ülkelerinin bitki tür sayısı .....	2
Çizelge 1.2. Defne bitkisinin Türkiye’de yayılış gösterdiği iller .....	7
Çizelge 1.3. Defne bitkisinin yaprak ve meyvesinin uçucu yağında belirlenebilen başlıca bileşenler .....	9
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan defne yapraklarının toplandıkları şehirler ve örnek genişliği .....	27
Çizelge 3.2. Flow sitometri analizinde kullanılan solüsyonlar.....	31
Çizelge 4.2 Erkek ve dişi defne bitkilerinin DNA içerik miktar düzeylerinin karşılaştırılması için yapılan bağımsız gruplar için t testi analiz sonuçları .....	35

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Defne mitolojisine ait görsel ve heykeli.....	3
Şekil 1.2. Defne bitkisinin genel görünümü .....	5
Şekil 1.3. Defne bitkisinin Türkiye’deki yayılış gösterdiği iller .....	7
Şekil 1.4. 2005- 2015 Yılları arasında bölge bazında defne yaprağı üretim miktarı (ton).....	11
Şekil 1.5. 2005- 2015 Yılları arasında bölge bazında defne gelir miktarı.....	11
Şekil 1.6. Yıllar itibari ile OGM defne yaprağı üretim miktarı (ton) .....	12
Şekil 1.7. Yıllar itibari ile OGM defne yaprağı gelir miktarı (tl) .....	12
Şekil 1.8. Yıllar itibari ile defne yaprağı ihracat miktarı (ton) .....	13
Şekil 1.9. Yıllar itibari ile defne yaprağı ithalat miktarı (ton) .....	13
Şekil 3.1. Materyallerin toplandığı şehirlerin harita üzerinde gösterimi .....	28
Şekil 3.2. Defne yapraklarının doğal koşullarda toplanması.....	29
Şekil 3.3. Örneklerin taşındığı köpük kutu ve buz aküleri .....	30
Şekil 3.4. Örneklerin flow sitometri analizine hazırlanması .....	31
Şekil 3.5. Defne ve arpa bitkisine ait G1 pik değerleri.....	33
Şekil 4.1. Çanakkale’den toplanan dişi defne ve standart olarak kullanılan arpa bitkilerinin G1 piklerine ait analiz değerleri.....	34
Şekil 4.2. Çanakkale’den toplanan erkek defne ve standart olarak kullanılan arpa bitkilerinin G1 piklerine ait analiz değerleri.....	35

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%:	: Yüzde
°C:	: Santigrad Derece
µl:	: Mikrolitre
µm:	: Mikrometre
µM:	: Mikromolar
AFLP:	: Amplified fragment length polymorphism (çoğaltılmış parça uzunluk poliformizi)
BA:	: Benzil Adenin
cm:	: Santimetre
CV:	: Varyasyon Katsayısı
DAPI:	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DKW:	: Driver Kuniyuki
DNA:	: Deoksiribo Nükleik Asit
GA <sub>3</sub> :	: Giberellik Asit
IAA:	: İndol Asetik Asit
IBA:	: İndol Bütirik asit
kg:	: Kilogram
l:	: Litre
m:	: Metre
mg:	: Miligram
ml:	: Mililitre
mM:	: Milimolar
mmhos:	: Sulama Sularının Toplam Tuz Miktarı
MS:	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı
NAA:	: Naftalin Asetik Asit
OGM:	: Orman Genel Müdürlüğü

PCR: : Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
Pg: : Piko Gram  
ppm: : Milyonda Bir Kısım  
RADP: : Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA  
SSR: : Basit Dizi Dekrarları  
WPM: : Woody Plant Medium

## 1.GİRİŞ

Türkiye coğrafi konumu açısından zengin bitki örtüsüne sahiptir. Doğal olarak flora ortamında kendiliğinden yetişen bitkiler arasında tıbbi ve aromatik özelliğe sahip birçok bitki türü bulunur. Tıbbi ve aromatik özelliğe sahip bu bitkilerin eski çağlardan beri baharat ve ilaç hammaddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkileri ilk kullanan ülkeler Çin, Hindistan, İran ve Mısır olmasına rağmen Avrupa bu ürünlerle daha geç tanışmıştır (Anonim 2016)

Tıbbi ve aromatik bitkiler birçok hastalığın önlenmesi ve iyileştirilmesi için ilaç olarak geleneksel ve modern tıpta kullanılmaktadır. Ayrıca bu bitkilerden günümüzde besin takviyeleri, bitkisel çay ve çeşni olarak, kozmetikte parfüm ve vücut bakım ürünleri olarak kullanılmasının yanı sıra, böcek ilacı olarak da geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Bu bitkilerin kurutulmuş özellikle kök, kök-sap, yumru, gövde veya odunsu yapı, kabuk, yaprak, çiçek, meyve, tohum gibi kısımlarından belirli ölçülerde hazırlanarak yararlanılmaktadır. Dünya nüfusunun %80'i tıbbi ve aromatik bitkileri sağlıklı alanında kullanmaktadır (Toksoy ve ark. 2010). Gelişmiş sentetik olarak üretilen ilaçların tedavi yöntemlerinin yan etkilerinden dolayı bitkisel kaynaklı tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Bitkisel kaynaklı ilaçların kullanım oranı gelişmiş ülkelerde %60 iken gelişmekte olan ülkelere %4 olarak görülmektedir (Anonim 2004).

Doğadan toplanan tıbbi ve aromatik bitkilerin hepsi aynı kalitede olmadığından etken maddeleri farklı oranlarda değişmektedir. 2007 yılında "Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Doğadan Sürdürülebilir Toplanması Uluslararası Standardı (ISSC-MAP) oluşturulmuştur. Bu bitkilerin kültüre alınması hem üreticilere gelir kapısı oluşturmakta hem de bu bitkilerin doğadan aşırı toplanmasıyla oluşan tehdidin önüne geçilmiştir. Türkiye'nin Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan coğrafik bölgelerinin birleşme noktalarında bulunması dünyanın zengin floralarından birine sahip olmasını sağlamıştır. Türkiye'deki biyolojik çeşitlilik dünya ortalamasıyla karşılaştırıldığında yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu Çizelge 1.1.'de de görülmektedir (Toroğlu ve Çenet 2006, Tümen 2010).

**Çizelge 1.1.** Dünya ülkelerinin bitki tür sayısı (Tümen 2010)

Ülke	Bitki türü Sayısı	Endemik Bitki Sayısı	Endemik Oranı (%)
İran	7500	1500	20
Irak	3000	200	7
Suriye-Lübnan	3000	330	11
Yunanistan	5500	1100	20
Bulgaristan	3650	53	2
Almanya	2700	54	2
Avrupa (kıta)	12000	2500	21
Türkiye	<b>11148</b>	<b>3616</b>	<b>33</b>

Yaklaşık 11 bin 700 biyolojik bitki çeşitliliğine sahip Türkiye’de, 500 civarında bitki tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin bitki florasının üçte birini oluşturduğu Türkiye’de 84 tıbbi ve aromatik bitkiden elde edilen 107 çeşit ilaç ham maddesi ile 419 ruhsatlı ilaç üretilmektedir (Anonim 2012). Bu bitkiler ülkemizde en çok Ege, Marmara, Akdeniz, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinden toplanmaktadır (Bayram ve ark. 2010). Türkiye’de yapılan bir çalışma sonucu iç ve dış ticareti yapılan tıbbi ve aromatik bitkiler hakkında bitki türü ve alt türü sayısı 347 adet olmakta ve bunlardan 139 türünün de ihracatı yapılmaktadır ve tıbbi aromatik bitkiler dünya da olduğu gibi Türkiye için de yeni bir sektör haline gelmiştir (Özgüven ve ark. 2005). Bu sektörden büyük pay alan bitkilerden biri Akdeniz defnesidir. Bu bitkinin yaprakları ve meyvesinden elde edilen uçucu yağ ve baharat ticari açıdan büyük önem taşımaktadır.

### **1.1. Defne (*Laurus nobilis* L.) Bitkisinin Mitolojisi**

Türkiye’nin genetik çeşitliliğinde önemli bir yere sahip tıbbi aromatik bitkilerden olan defne (*Laurus nobilis* L.) insanların yaşamları boyunca yani ilk çağlardan beri birçok özelliğinden faydalandığı bir bitki türüdür. Defne yaprağı tarih boyunca zafer, şöhret ve barışın simgesi olarak gösterilmiştir. Antik Yunan ve Roma’da gerçekleştirilen törenlerde insanlar saçlarına defne yapraklarından yapılan taçları takarlardı. Yunan mitolojisine göre ise, Apollon su perisi olan Daphne’ye aşık olur ve aşkına karşılık bulamaz. Apollon’dan kaçan Daphne, kurtulması için babasına yalvarır, vücudu birden ağırlaşmaya, ayakları toprağa doğru

kök salmaya başlar, kolları dallara, saçları yapraklara dönüşür ve daphne sonsuza kadar defne ağacı olarak kalır (Anonim 2013).



**Şekil 1.1.** Defne mitolojisine ait görsel ve heykeli (Anonim 2013)

M.Ö. 342 yılında Romalılar döneminde bastırılan altın paraların yüzeyinde defneden yapılmış çelenk bulunmaktaydı. Ayrıca, defne yaprağının koruyucu olduğuna inanmışlar ve bu sebepten dolayı yağmurlu havalarda yanlarında defne yaprağı bulundurmuşlardır (Duke 1987, Anonim 1992, Duke 2008).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin ülke ekonomisine daha etkili bir biçimde katılmasını ve bitki çeşidi bakımından zengin bir floraya sahip Türkiye'nin bu kaynaklarından daha verimli yararlanabilmesi için tıbbi ve aromatik bitki çeşitliliğinin korunması, sürdürülebilmesi ve değerlendirilmesi için gerekli her türlü metot ve yeni gelişen yöntemlerin bu bitkilerde optimize edilmesi gerekmektedir.

İki evcikli (dioik) bitkilerde erkek ve dişi bitkiler birbirinden ayrıdır ve gelişimlerinin ilk aşamasında, fenotipik olarak cinsiyet tayini yapılması çok zordur. Fakat bunların erken dönemde birbirinden ayrılması ticari açıdan oldukça önemlidir. Defne gibi dioik olan ve ticari değeri yüksek olan bitkilerde gelişmelerinin başında cinsiyet belirlenmesi ve amaca uygun fidan yetiştirilebilmesi oldukça önemlidir. Örnek olarak defne yağının elde edilmesinde



genellikle dişi bitkiler tercih edilirken, peyzaj çalışmalarında dekoratif olarak seçilen erkek bitkiler ise kolay Şekil alabilme ve daha düzenli forma sahip olmasından dolayı tercih edilmektedir. Bu nedenle erken dönemde cinsiyet belirlenmesi fidancılık ve kitlesel yetiştiricilik açısından önemli bir husustur.

Türkiye’de kendiliğinden yetişen defne bitkisi ilaç sanayinde etkin madde, gıda sanayinde ise tat verici olarak kullanılmaktadır. Defne ağacının yaprağından, meyvesinden ve odunundan yararlanılmaktadır. Ayrıca makasla kesilerek istenilen Őeklin verilebileceği Akdeniz defnesi dekoratif özelliklerinden dolayı ss ve it bitkisi olarak kullanılmaktadır (Ercan 1983).

Defne yaprağının esas kullanımını gıda sanayisidir. Özellikle retim endüstrisinde baharatların önemi daha da belirginleşmiş, soslar, konserveler, yarı pişmiş gıdalar, hazır yemeklerde tat ve çeşni için büyük lde baharatlara ihtiyaç duyulur hale gelmiştir. Aynı zamanda içerdiği eterik yağlar ve yüksek laurik asit nedeniyle de sabun yapımında ve odunsu parfüm bitkileri grubunda değerlendirilerek önemine dikkat çekilmektedir (Baytop 1980; Güney 1989; Tanrıverdi 1989; Tanrıverdi ve ark. 1993).

Bu çalışmada flow sitometri analiz yöntemi kullanılarak dişi ve erkek bitkilerin birbirinden ayrılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla bilinçli defne fidanı yetiştiriciliğini yaygınlaştırması ve defne fidancılığında yeni bir yol izlemesini sağlamasına yardımcı olması ayrıca *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında elde edilen fidanların cinsiyet belirleme çalışmalarında literatür oluşturması amaçlanmıştır.

## **1.2. Odunsu Bitkiler Hakkında Genel Bilgi**

Bitkiler biyolojik özelliklerine göre ‘‘Otsu Bitkiler’’ ve ‘‘Odunsu Bitkiler’’ olarak 2 ana gruba ayrılırlar. Tohumlu bitkiler sınıfına giren odunsu bitkiler, odunlaşmış toprak üstü kısımlarıyla uzun yıllar yaşayan ve çoğunlukla toprak üstü kısımlarının büyüklüğü yıldan yıla artan bitkiler olarak tanımlanır. Odunsu bitkiler kendi aralarında; ağaçlar, çalılar, sarılıcılar ve yer rtcler olarak 4 gruba ayrılır. Yaprak dökme ve dkmemelerine göre ise herdem yeşil, yarı-herdem yeşil ve yaprağını dökenler olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Defne gibi kışın yapraklarını dökmeyen herdem yeşil bitkilerin çoğunluğunu koniferler olarak adlandırılan iğne ve pul yapraklı bitkiler oluşturur (olak ve Sorger, 2004; Yener 2012).

Bir evcikli yani monoik bitki aynı bireyler üzerinde hem erkek çiçeklerin hemde dişi çiçekleri bir arada taşıyan bitkidir. İki evcikli yani dioik bitki ise bir bitkide erkek ve dişi bireylerin ayrı ayrı bitkilerde bulunması durumuna denir. Dioik bitkilerde erkek çiçekler erkek bitki üzerinde, dişi çiçekler ise dişi çiçekler üzerinde bulunur (Anonim 2016a).

### 1.3. Defne Bitkisinin Genel ve Botanik Özellikleri

“*Lauraceae*” familyasının “*Laurus*” cinsine ait olan defnenin, bilimsel adı “*Laurus nobilis* L.”dir.  $2n=48$  kromozoma sahip olan defne bitkisinin 50 cins ve yaklaşık olarak da 2500 tür içeren familya üyeleri Tropikal Asya, Amerika, Afrika ve Akdeniz ülkelerinde yayılış göstermektedir. Ülkemizde ise sadece tek türü bulunmakta ve bu tür Akdeniz Defnesi adıyla bilinmektedir (Darlinton ve Wylie 1955; Seçmen ve ark. 1995).

Yöresel olarak değişik isimlerle adlandırılan defne bitkisi için teynel, harve, ehnel, gilik, taflan, tefrin, defnün, talimi, tehni gibi isimler kullanılmaktadır. İngilizce’de Bay Laurel, Laurel, Fransızca’da Laurier, İtalyanca’da Alloro, Lehçe’de Wacurnzyn Szlachetny, Arapça’da Habbül Gahr ve Almanca’da Lorbeer gibi isimlerle adlandırılmıştır (Baytop 1994, Pala 2010, Düzenli ve Karaömerlioğlu 2012).



Şekil 1.2. Defne (*Laurus nobilis* L.) bitkisinin genel görünümü (Anonim 2017a)

Uygun şartlarda 15-20 metreye kadar boylanabilme özelliğinde olan defnenin yaprakları dar ve 5-10 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde, üst yüzeyi parlak koyu yeşil renge, kenar kısımları dalgalı, kısa saplı ve uç kısmı doğru sivri şekildedir. Yeşil olan taze

sürgünleri olgunlaştıkça kırmızı siyah rengi alır. Tespih tanesi büyüklüğünde olan meyveleri ise ilk oluşumunda yeşil renktedir ve Eylül sonu Ekim ayı içerisinde olgunlaştıkça parlak koyu siyah rengi alır. Meyveleri etli yapıda olduğundan dolayı %17-25 oranında yağ içerir ve yapraklara oranla içerdiği yağ miktarı daha fazladır. Erkek çiçekler koyu sarı, küme halinde ve daha fazla olurken, dişi çiçekler ise açık yeşil veya sarıya benzer renkte, dallar üzerinde daha seyrek haldedir. Çiçek çevresi yeşil renkte ve dört parçalı halde bulunur. Erkek çiçeklerde genellikle 10-12 tane stamen dişi çiçeklerde ise körelmiş halde 4 stamen görülmektedir. Kök sistemi kuvvetlidir (Kayacık 1963, Lewis 1984, Baktır 1991).

Çiçeklenme zamanı değişiklik göstermesine rağmen genellikle, Mart- Mayıs aylarında gerçekleşir. Erkek ağaçlar dişi ağaçlara göre çiçeklenmeye daha erken başlayıp ve daha erken bitirirler (Can ve ark. 2006). Defnede çiçeklenme en erken Akdeniz bölgesinde gerçekleşirken bölgenin ve yetiştiği yerin iklimsel faktörlerine bağlı olarak sırayla Ege, Marmara ve Karadeniz bölgesinde çiçeklenme meydana gelmektedir. Defnenin çiçekte kalma dönemi 1-2 ay arasındadır. Çiçekte kalma döneminde dişi çiçekler tozlaşma yoluyla döllenme sağladığı zaman meyve oluşmaktadır. Çiçek döneminde dişi ve erkek ağaçların cinsiyetlerini ayırt edebilmek için çiçeklerin ağaç üzerindeki yoğunluklarına ve çiçek renklerinin açık ya da koyu olmasına göre yapılabilir (Gökmen 1973 Tanker ve ark. 2007, Boza 2011, Kavaklı 2012).

### **1.3.1. Defne Bitkisinin Doğal Yayılış Alanları**

Anavatanı Anadolu ve Balkanlar olan defne Türkiye’de Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgesinin tüm kıyı şeridi boyunca yayılış göstermektedir. Ülkemizde yaygın olarak görüldüğü iller; Bursa, Yalova, Balıkesir, İstanbul, Kastamonu, Zonguldak, Trabzon, Sinop, İzmir, Muğla, Rize, Kahramanmaraş, Mersin, Antalya’dır ve Akdeniz bitki örtüsüne özgü bitkilerdendir (Davis 1982, Şafak ve Okan 2004, Ayanoğlu ve ark. 2010). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, defne (*Laurus nobilis* L.) bitkisinin yayılış alanının 131,862 hektar, tahmin edilen potansiyel veriminin ise yıllık 12.201.326 kg olduğu (Çizelge 2.1) belirtilmektedir (Anonim 2004).

Türkiye başta olmak üzere dünya genelinde Ege Denizindeki Yunan adaları, Arnavutluk, Romanya, İspanya, Portekiz, Fas, Fransa, İtalya, Belçika, Meksika ve Cezayir’de, Suriye’nin batısında, Libya’nın doğu sahillerinde, Rusya’nın Karadeniz’e uzanan kıyılarında, Gürcistan ve İsrail gibi birçok ülkede kültüre alınarak yetiştirilmektedir. Türkiye’de yayılış gösterdiği iller Şekil 2.2 ve Çizelge 2.1’de gösterilmektedir (Anonim 2004; Anonim 2016).



Şekil 1.3. Defnenin Türkiye’deki Yayılış Alanları (Anonim 2016)

Çizelge 1.2. Defne bitkisinin Türkiye’de yayılış gösterdiği iller (Anonim 2004)

Defne Bitkisinin Yayılışı		
Orman bölge müd.	Yayılış sahası (Ha)	Tahmini potansiyeli (kg/yıl)
<b>Adana</b>	6.343	1.804.491
<b>Adapazarı</b>	4.215	2.197.167
<b>Amasya</b>	800	200.000
<b>Antalya</b>	7.823	1.098.000
<b>Balıkesir</b>	5.500	665.500
<b>Bolu</b>	645	1.360
<b>Bursa</b>	11.791	1.952.000
<b>İstanbul</b>	500	1.000
<b>İzmir</b>	7.9950	660.000
<b>Kahramanmaraş</b>	4.308	375.000
<b>Mersin</b>	40.927	1.407.036
<b>Muğla</b>	32.844	677.752
<b>Sinop</b>	1.544	59.000
<b>Zonguldak</b>	6.672	1.103.020
<b>TOPLAM</b>	<b>131.862</b>	<b>12.201.326</b>

### 1.3.2. Defne Bitkisinin Ekolojisi

Baydar 2009 yılında yapmış olduğu çalışmada defne bitkisinin yağış alan nemli ve güneşli iklimde daha iyi yetiştiğini, yazları sıcak ve nemli, kışları ise yağışlı ve ılıman iklim isteği duyduğunu aktarmıştır. Defne bitkisinin yetiştiği topraklarda; toprakların tamamının tuzsuz olduğu ve tuzluluk probleminin yaşanmadığı görülmüştür. Toprak pH’sının 6,70-7,96 değerleri arasında, tuzluluğun ise yaklaşık olarak 0,21 mmhos/cm olması gerekmektedir (Düzenli ve Karaömerlioğlu 2012).

### 1.3.3. Defne Bitkisinin Tıbbi ve Aromatik Özellikleri

Tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunan uçucu yağ oranı; bitkinin organlarına, gelişme dönemine, sıcaklık değişimlerine, iklim, çevre, bitkinin yaşı ve genetik yapısına göre değişim gösterir. Bunların içerisinde uçucu yağ miktarını etkileyen en önemli faktörler ise; sıcaklık ve bitkinin gelişme dönemidir. Bitkideki uçucu yağ oranı bitkiden bitkiye farklılık göstermekle beraber genellikle sıcaklıkla doğru orantılı olarak artış göstermektedir (Ceylan 1996).

Meyveleri sabit yağ içeriği açısından zengin (%25-30) olan defne yapraklarının bileşiminde uçucu yağ, tanen ve acı maddeler bulunur. Yetiştirildiği yöreye göre genellikle % 1-4 oranında uçucu yağ ihtiva eder ve uçucu yağın en önemli bileşeni olan sineol % 35-50 oranında bulunur. Defne bitkisinin diğer önemli bileşenleri ise  $\alpha$ - terpinenil acetate,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, linalool ve sabinene'dir. Defne yağını değerli kılan laurik asit en fazla endokarp kısmında bulunur. Aynı zamanda Trigliseritler de içeren defne bitkisinde trigliseritler sadece perikarp ve mezokarpta yer almaktadır. Defnenin meyvelerinde aynı zamanda antosiyanin bulunduğu tespit edilmiştir (Zeybek ve Zeybek 1994; Anonim 1997; Baytop 1999; Yağcıoğlu 1999, Yazıcı 2002; Longo ve Vasapollo, 2005).

**Çizelge 1.3.** Defne bitkisinin yaprak ve meyvesinin uçucu yağında belirlenebilen başlıca bileşenler (Karadeniz 2001).

Bileşen grupları	Bileşen grupları	
	Defne yaprağı uçucu yağı	Defne meyvesi uçucu yağı
Terpenler	$\alpha$ -Tujen	$\alpha$ -Tujen
	$\alpha$ -Pinene	$\alpha$ -Pinene
	Sabinene	Sabinene
	Mirsen	Mirsen
	$\alpha$ -Fellandren	$\alpha$ -Fellandren
	trans- $\beta$ -Osimen	trans- $\beta$ -Osimen
	Germakren-D	Germakren-D
	$\beta$ -Elemen	$\beta$ -Elemen
	$\beta$ -Karyofilen	$\beta$ -Karyofilen
	Kamfen	Kamfen
	$\gamma$ -Terpinen	$\beta$ -Pinen
	$\alpha$ -Terpinolen	para-Simen
	$\alpha$ -Humulen	Germakren-A
	Bisiklogermakren	$\alpha$ -Farnasen
Kalaren	cis- $\alpha$ -Bisabolen	
Terpenoidler		
Alkoller	Linalool	Linalool
	Terpinen-4-ol	
	$\alpha$ -Terpineol	
	Trans-Sabinene hidrat	
	$\beta$ -Eudesmol	
	$\alpha$ -Eudesmol	
Esterler	$\alpha$ -Terpinenil asetat	$\alpha$ -Terpinenil asetat
	Linalyl acetate	Bornil asetat
Fenoller ve fenol eterler	Eugenol	
Terpen oksitler	Methyl eugenol	
	1,8-cineole	1,8- cineole
	Karyofilen oksit	

#### **1.3.4. Defne Bitkisinin Ticari Önemi**

Türkiye’de ticareti yapılan bitki türlerinin bir bölümünü tıbbi ve aromatik bitkiler oluşturur. Ülkemizde bulunan bu bitkiler içerisinde ticari öneme sahip bitkilerden birisi de defne bitkisidir.

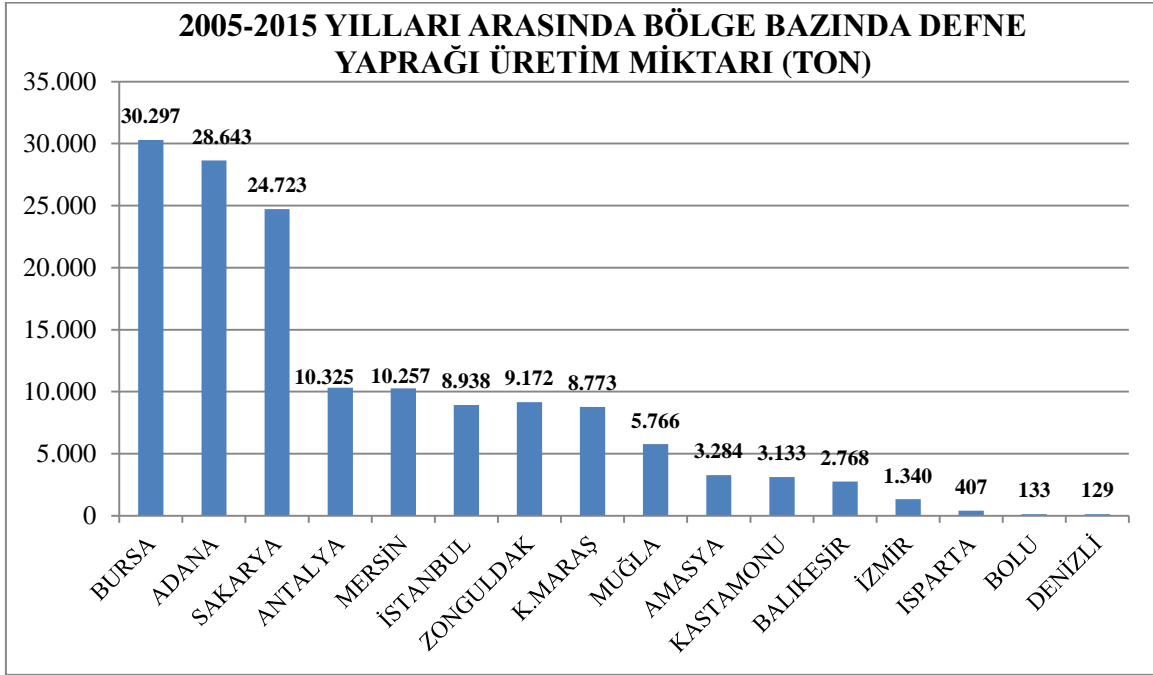
Defne bitkisinden ticari olarak; yapraklarından uçucu yağ, meyvelerinden sabit yağ, dallarından ise yakacak olarak faydalanılır. Defne ve defne bitkisinin mamulleri ilaç, gıda, kozmetik gibi birçok alanda kullanıldığı için iç ve dış ticareti her geçen gün artmaktadır. Artan bu talebin karşılanması için de en avantajlı ve ihtiyacın karşılanmasını sağlayabilecek potansiyele sahip olan ülke Türkiye’dir. Ülkemiz dünyada ki kuru defne yaprağının önemli üretici ve satıcısıdır. Defnenin her geçen gün artan pazarında üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve hasat edilen yaprakların kaliteli olması ülkemizin bu pazarda lider konumunu sürdürmesini sağlamaktadır (Şafak 2004, Erden 2005).

Defne yaprağı üretimi, 6831 sayılı yasanın 37. maddesinin 1. fıkrası gereğince, tarife bedeli ödemek kaydıyla, yasanın ilgili maddesinde yazılı yerlerde halka izin verilmek şartıyla yapılmaktadır (Anonim 1997). Defne yaprağı toplanacak orman alanları, Orman İşletme Müdürlükleri tarafından gruplandırılıp münavebeli olarak 3 yılda bir işletmeye açılmaktadır (Özhatay ve ark. 1997).

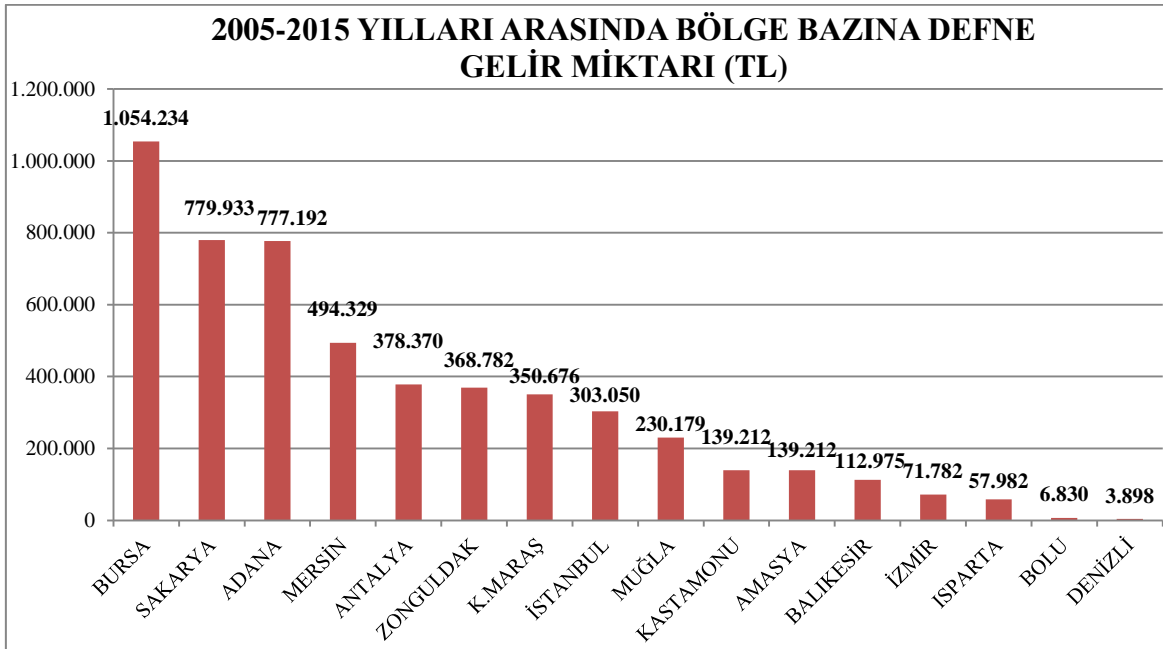
Defne yaprağı ihracatı yapan ülkelerin başında Hong Kong, ABD, Almanya ve Brezilya gelmektedir. Türkiye’de 2015 yılında 12.741 ton defne yaprağı ihraç edilmiş ve bu ihracatın gelir miktarı 1.398.683 TL olmuştur. Ayrıca Arap ülkelerinde defnenin meyvelerinden elde edilen sabun yapımında kullanılan sabit yağ ihraç edilirken, ülkemiz yılda ortalama 1 milyon \$ değerinde uçucu yağ ihraç etmektedir (Anonim 2016).

Türkiye’den defne yaprağı ithal eden ülkelerin başında Vietnam gelirken diğer ülkeler; ABD, Brezilya, Polonya, Hollanda, Japonya ve Almanya’dır (Pala 2010).

Defne bitkisi için Türkiye’de 2005-2015 yılları arasında yapılan üretim ve dış ticaret istatistik verileri (Anonim 2016);

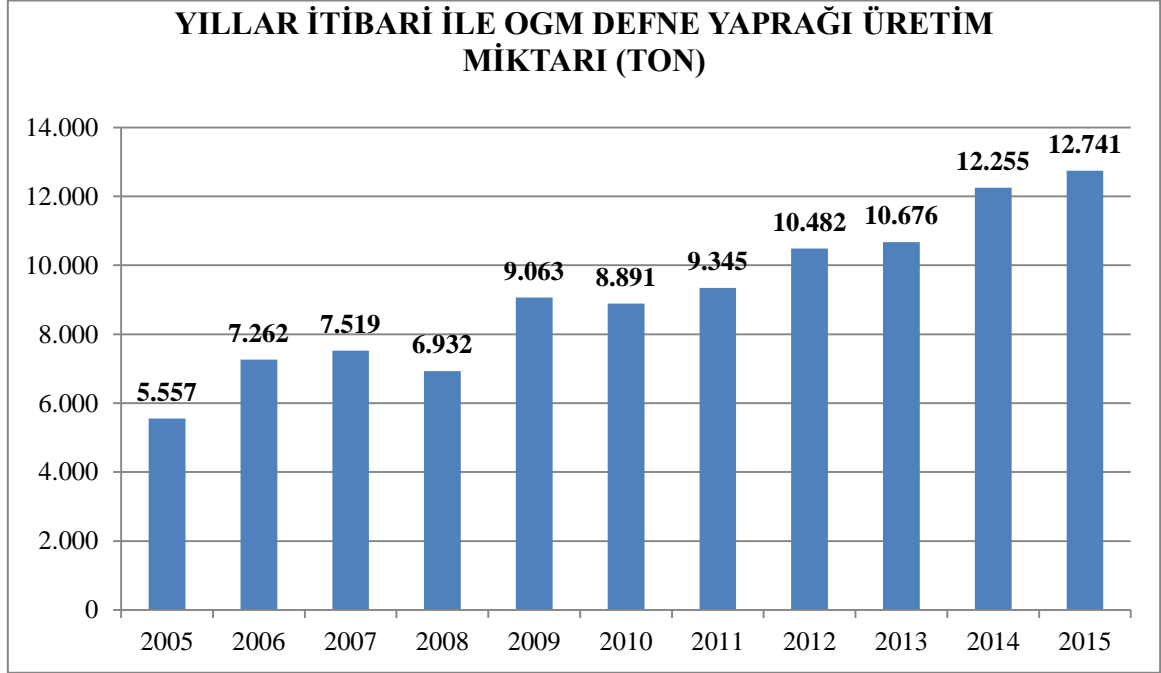


**Şekil 1.4.** 2005- 2015 Yılları arasında bölge bazında defne yaprağı üretim miktarı (ton)

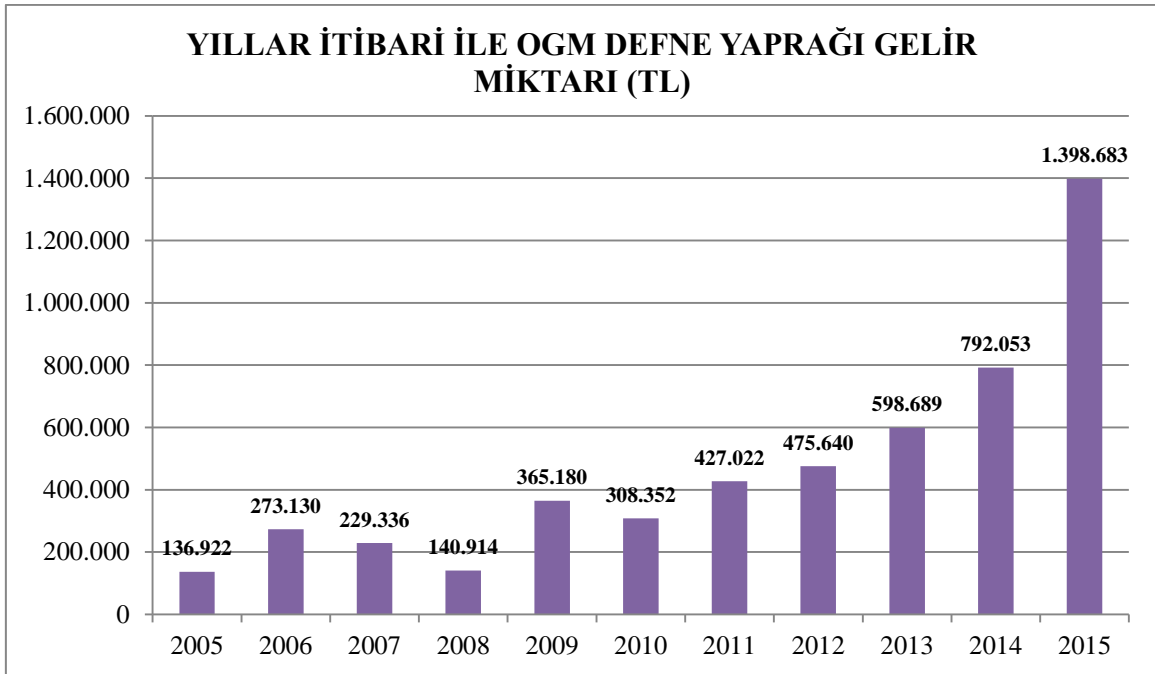


**Şekil 1.5.** 2005- 2015 Yılları arasında bölge bazında defne gelir miktarı

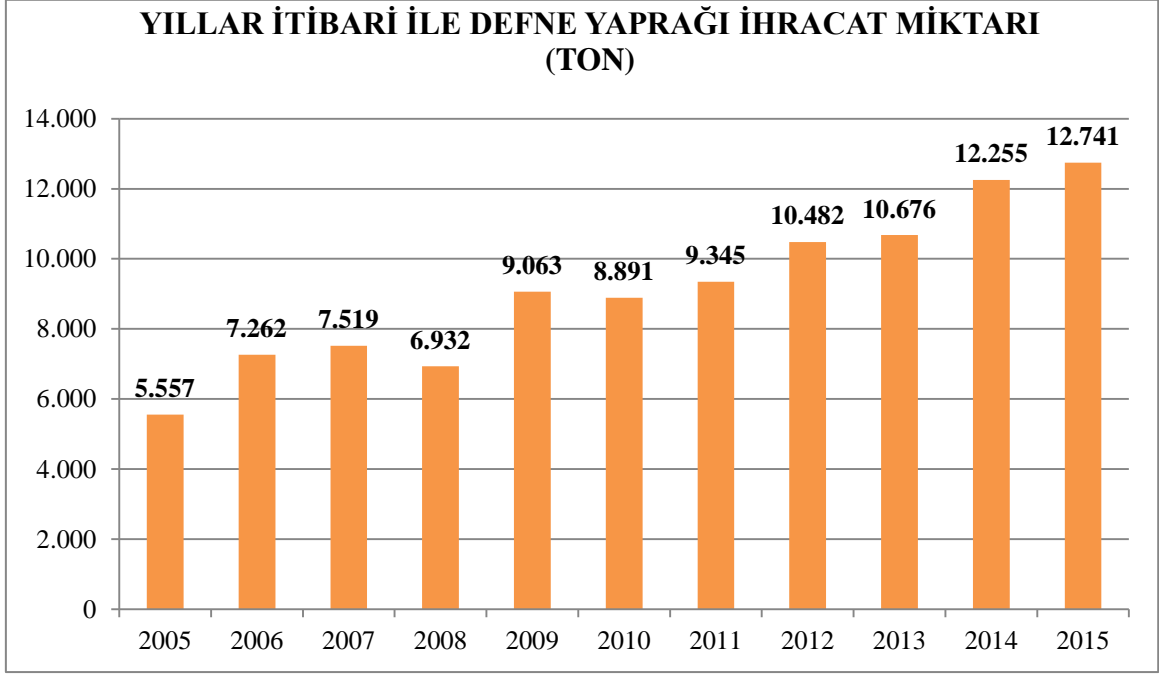




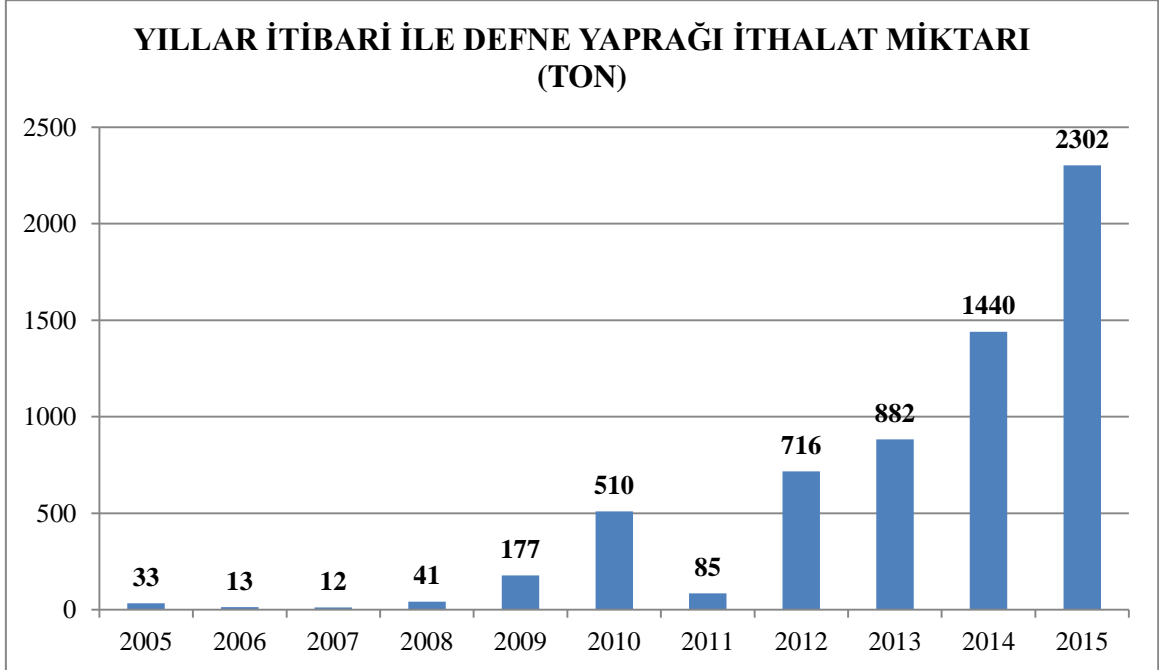
Şekil 1.6. Yıllar itibari ile OGM defne yaprağı üretim miktarı (ton)



Şekil 1.7. Yıllar itibari ile OGM defne yaprağı gelir miktarı



Şekil 1.8. Yıllar itibari ile defne yaprağı ihracat miktarı (ton)



Şekil 1.9. Yıllar itibari ile defne yaprağı ithalat miktarı (ton)

## **2.KAYNAK ÖZETLERİ**

### **2.1. Defne Bitkisinde Yapılan Çalışmalar**

Göker ve Acar (1983) defne yaprağının kalite özelliklerini etkileyen faktörler üzerinde bir araştırma yapmışlardır. Yaptıkları araştırmalar sonucunda bitkinin çeşidi, yetiştiği yerin özellikleri, yapılan uygulamalar (ilaçlama, gübreleme), depolanma şekli gibi faktörlerin defne yaprağında kaliteyi etkilediğini saptamışlardır.

Ceylan ve ark (1990) yaptıkları çalışmada, defne ağaçlarında uçucu yağın; ontogenetik ve morfogenetik değişikliklerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışma süresince bitkideki uçucu yağların Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında arttığını gözlemlemişlerdir. Defnedeki uçucu yağların en yüksek olduğu aylar Haziran (%1,13) ve Temmuz (% 1,00) olurken, en düşük aylar ise Eylül (%0,55), Ekim (%0,59) ve Kasım (% 0,45) ayları olarak kaydetmişlerdir.

Ölmez (2004) farklı kaynatma sürelerinde defne bitkisinden elde edilen renkler ve bazı haslık değerlerini incelemek için yaptığı çalışmada defne yapraklarının bitkisel boyacılık alanında kullanımını incelemek ve farklı kaynatma sürelerinin elde edilen renklere etkisinin nasıl olduğunu belirlemeye çalışmıştır. Bu amaçla defne yaprakları sırasıyla 30, 60 ve 90 dakika süreyle kaynatma işlemine tabi tutulmuş, yün halı ipliklerinin defne yaprakları ile boyanmasından genel olarak alüminyum şapı, çinko klorür, sodyum sülfat ile yeşil, demir sülfat ile kahverengi, bakır sülfat, tanen sabitleştiricileri ve sabitleştirici olmadan yapılan boyama ile kızıl renk tonlarının elde edildiğini gözlemlemiştir. Yapraklara uygulanan kaynama süreleri yükseldikçe elde edilen renklere koyulaşma olduğu, elde edilen renklerin ışık haslık derecelerinin genel olarak iyi ve orta düzeyde olduğu, sabitleştirici kullanılmadan yapılan boyamalardan elde edilen renklerin ışık haslık derecelerinin ise düşük 4 düzeyinde olduğunu saptamıştır.

Kılıç ve ark (2004) yaptıkları çalışmada, defne yaprağı, tomurcukları, çiçekleri ve meyvelerindeki bileşenlerin tespitini yapmış ve bunların hangi kokuların kaynağı olduğunu bulmayı amaçlamışlardır. Karadeniz kıyısında bulunan defnelerin gövdelerinin üst kısmından

Mart ayından itibaren her ayın onbeşinde Ekim ayına yaprak örnekleri toplamışlar ve uçucu yağların Temmuz ayında en yüksek oranda olduğunu uçucu yağın ana bileşeninin cineole (%32,1-24,2) olduğunu ayrıca eugenol (%1,6-0,1),  $\beta$ -pinene (%3,8-3,0),  $\alpha$ -pinene (%5,0-3,9), sabinene (%7,6- 7,1),  $\beta$ -elemene (%1,4-1,8),  $\alpha$ -terpineol (%1,3-1,8), linalool (%1,5-0,7) ve  $\alpha$ -terpinyl acetate (%6,5-4,8) gibi bileşenlerin uçucu yağda bulunan diğer önemli bileşenler olduğunu saptamışlardır.

Bazı büyüme düzenleyicilerin Akdeniz defnesi fidanlarının gelişimi üzerine etkilerini inceleyen Ertekin ve ark. (2009), polystimulin (PS A6-K), giberellin ( $GA_3$ ) ve farklı katlama sürelerinin defne fidanlarının gelişimleri üzerine olan etkilerini incelemiş bu amaçla; tohumlar katlamaya alınmadan önce PS-A6 + PS-K ve  $GA_3$ 'ün iki farklı konsantrasyonu ile muamele edilmiştir. Çalışmada kullanılan 315 adet defne fidanında kök boğaz çapı, fidan boyu, kök uzunluğu ve yaprak sayıları saptanmıştır. 50 mg/100 ml  $GA_3$ 'ün uygulandığı denemelerde en yüksek fidan boyu ve kök uzunluğu elde edilirken, en yüksek fidan boyu 21,2 cm, en düşük fidan boyu da 13,9 cm ile 70 gün katlamaya bırakılan tohumlarda görüldüğünü, en yüksek kök boğaz çapının ise 5,8 mm ile 30 gün soğuk katlamaya maruz kalmış tohumlarda olduğunu ve en düşük kök boğaz çapı da  $GA_3$  uygulanan tohumlarda saptanmıştır. Hormon uygulamasının defne fidanlarının gelişimi üzerine olumlu etkisi görülmüş ve fidanlık koşullarında defne üretiminde  $GA_3$  hormonunun kullanılabileceği önerilmiştir.

Atalay (2009) yaptığı çalışmada, defne yaprağının yonca silajı yapımında silaj katkı maddesi olarak kullanılıp kullanılmayacağına ve kalitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Tanen bakımından zengin defne yaprağı ile şeker sanayi artığı olan ve suda çözünebilir karbonhidrat bakımından zengin melas karışımını silaj katkı maddesi olarak kullanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar melas ve defnenin silaj katkı maddesi olarak yonca silajı yapımında kullanılabilceği konusunda olumlu sonuçlar verdiğini belirtmiştir.

Defne bitkisine ait çeliklerde adventif kök oluşumunun anatomik ve histolojik olarak incelenmesi için Şirin ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada köklenmeyi kolaylaştırmak için çeliklerin dikimi öncesinde 6 farklı uygulama yapmışlardır. Yapılan uygulamalar; çelik tabanına 1 cm yarma, 5000 ppm IBA, 3000 ppm IBA, kontrol grubu, çelik tabanının 1 cm üzerinden bilezik alma ve 10 ppm etilen+14 gün bekletilip ardından 3000 ppm IBA uygulaması şeklinde olmuştur. Dikim öncesi alınan çeliklerde bitkide hazır kök taslağı gözlemlenmemiştir. 1 cm üzerinden bilezik alma uygulaması yapılan, 5000 ppm IBA, bilezi

alma ve 10 ppm etilen+3000 ppm IBA uygulaması yapılan çeliklerde köklenmeyle alakalı hücre farklılıkları gözlemlenmiştir.

Sarı ve ark. (2010) 2003 yılında Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde defne bitkisinin uygun yetiştirme tekniklerinin belirlenmesi amacı ile yaptığı çalışmada, tohum dormansisinin kırılması, biçim sıklığı ve yüksekliği, uygun dikim sıklığı, erkek ve dişi bitki uçucu yağ oranları arasındaki varyasyonu belirlemeye yönelik çalışmalar yapmışlardır. Defnelerin farklı yüksekliklerden biçilmesinin verim değerleri üzerine etkisinin çok fazla olmadığını tespit etmişlerdir. Uçucu yağ analizlerinde, uçucu yağ oranının %2,80-3,40 arasında değiştiğini, uçucu yağın ana bileşenin eucaliptol (%29,55-43,19) olduğunu belirlemişlerdir.

Pala (2010), Türkiye için önemli bir bitki olan defne bitkisinin kültüre alınması için yaptığı bazı agroteknik çalışmalarda bitkinin sıra üzeri mesafelerin belirlenmesini, uygun biçim yüksekliği ve biçim sıklığının bulunmasını amaçlamıştır. Yaptığı çalışmalarda defnede en uygun dikim sıklığının en yüksek verimin alındığı 1x2 m sıra arası ve sıra üzeri mesafe olduğunu belirlemiştir. En uygun biçim zamanının 2 yılda bir olduğunu ve biçim yüksekliğinin ise 60 cm olduğunu saptamıştır.

Sarb (2012) Defne bitkisinde çelikle çoğaltma yöntemini belirlemek amacıyla cam serada bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmalar mevsimsel olarak 11 farklı zamanda alınan çeliklere farklı dozlarda IBA ekleyerek yapılmıştır. 1 birim torf+1 birim tuf karışımlarına Kontrol, 1000, 2000, 4000, 6000 ppm IBA eklenerek köklendirme gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda IBA dozlarının köklenme üzerinde olumsuz etkisi görülürken, çelik alma zamanının köklenme üzerinde olumlu etkisi olduğu saptanmıştır.

Kavaklı (2012) yaptığı bu çalışmada defnenin genetik farklılıkları RAPD moleküler yöntemiyle belirlemek amacıyla Dilek Yarımadası, Urla ve Karaburun bölgelerinden ilkbahar başlangıcında yaprak örnekleri toplamış ve DNA izolasyonu, PCR-RAPD uygulamaları ile agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Jellerdeki meydana gelen DNA bantları görüntülenmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek defne tiplerinin polimorfizmi 27 RAPD primeri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. En başarılı primer OPC-02 olurken bu primer tüm defne tiplerinde 1-10 arasında polimorfik bant vermiştir. Ayrıca, OPA-04, OPA-12, OPB-02, OPC-100 ve OPE-02 primerleri de başarılı olmuştur. OPA-01, OPA-07, OPB-06, OPB-08, OPB-11 primerleri polimorfizmi belirleyememiş ve bu nedenle de bu primerler değerlendirmeye alınmamıştır. Yapılan bu çalışmayla RAPD markörlerinin defne tiplerindeki

farklılıkların belirlenmesinde kullanılabileceği anlaşılmış ve gelecekte defne bitkisinde yapılacak moleküler çalışmalarda RAPD markörleri ile elde edilen sonuçlar AFLP, SSR gibi diğer moleküler markör çalışmalarıyla desteklenebileceği ortaya koyulmuştur.

Defne bitkisinin doku kültürü yöntemiyle üretilme olanaklarının incelenmesi üzerine yapılan çalışmada Karaburun, Urla ve Kuşadası'nda bulunan defne ağaçlarından eksplantlar alınmıştır. Bu eksplantlar MS (Murashige&Skoog), DKW (Driver Kuniyuki), Heller ve WPM (Woody Plant Medium) olmak üzere 4 farklı besin ortamına dikilmiştir. 2008-2012 yılları arasında 4 yıl boyunca yapılan çalışmalarda eksplant olarak sürgün ucu ve mikro çelikler kullanılmıştır. Besin ortamlarına NAA, BA, IBA ve kinetin farklı konsantrasyonları ilave edilmiş ve bu bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitro* kök oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Kullanılan 4 besin ortamında da köklenme sağlanamamış fakat MS besin ortamının DKW ortamına göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. 0.5-5 mg/l NAA ile kallus oluşumu, 0.3-4 mg/l BA ile de sürgün oluşumunun arttığı belirlenmiştir. Heller besin ortamında kararmaların az olduğu görülmüştür (Boza ve ark 2013).

Baytöre (2014) Yalova bölgesinde ki defne popülasyonlarında 4 farklı gelişme döneminde morfolojik ve kalite özellikleri ile ontogenetik değişimleri belirlemeyi amaçlamıştır. Yapılan araştırmalarda defne bitkilerinin boy uzunluğu, yaprak boyu, yaprak eni, uçucu yağ oranı, uçucu yağ bileşenleri belirlenmiştir. Yalova ili için uygun hasat zamanının uçucu yağın en yüksek olduğu meyve olum döneminin olduğu gözlemlenmiştir.

Karık ve ark. (2015) Türkiye'de ki defne popülasyonlarının uçucu yağ bileşenlerini belirlemişlerdir. Çalışmada, Türkiye'de doğal yayılış gösteren defne bitkilerini kullanmışlardır. Marmara, Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgelerinde toplam 100 ayrı lokasyondan yaprak örnekleme yapmışlardır. Uçucu yağ oranlarını belirlemek için yaprak örnekleri kurutulmuş, uçucu yağları su distilasyonu ile çıkarılmıştır. Kuru yapraklardaki uçucu yağ oranı %0,4-4,5 arasında değişim göstermiş, elde edilen uçucu yağlar GC/MS ile analiz edilmiş ve kimyasal içerikleri çıkarılmıştır. Örneklere göre uçucu yağlarda 22-25 adet bileşen tanımlanmış ve ana bileşenlerin 1,8- cineole ve oranının %36,93-66,90 arasında olduğu, diğer bileşimin ise  $\alpha$ -Terpinyl acetate olduğu ve oranının %4,09-22,22 arasında değişim gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Aktaş ve ark. 2014 yaptıkları çalışmada prolin uygulamasının defne fidelerinin kuraklık toleransını arttırmadaki etkisini belirlemişlerdir. Su stresi altında bulunan fidelede prolin uygulaması ile yaprak fotokimyasal etkinliğinin arttığı, taze ağırlığının arttığı ve fidelerin daha çok hayatta kaldığını saptamıştır. Su stresinde yapılan prolin uygulamalarının

IAA'de artışa neden olduğu, Zeatin ve GA<sub>3</sub> içeriğinde kuraklıkla oluşan azalmayı değiştirmedigini belirlemiştir. Yapılan çalışma sonucunda, defnenin fide döneminde prolin uygulaması ile kuraklığa toleransını uyarabildiğini ortaya koymuştur.

## 2.2. Flow Sitometri Cihazının Çalışma Prensibi

İlk defa Wallace H.Coulter tarafından 1956 yılında "Otomatik Kan Hücresi Sayım ve Analiz" başlığıyla yayınlanmış bir makale ile tıp camiasına duyurulan (Coulter 1956) flow sitometri, katı-sıvı heterojen karışımında (süspansiyon) olan hücre veya partiküllerin sıvı bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada da hücre büyüklüğüne göre sınıflandırılması tekniğine dayanan bir cihazdır. Birçok bilim dalında yaygın olarak kullanılan flow sitometri analiz yöntemi günümüzde akım sitometri terimi olarak da bilinmektedir. Eskiden kullanılan ışık mikroskopu ile flow sitometri analiz yöntemini kıyaslanacak olursa; flow sitometri analiz yöntemiyle çok daha fazla hücrenin daha kısa sürede inceleme avantajını sağladığı görülmüştür. Bu yöntemle 1 saniyede ortalama 500 tane hücrenin sayımı gerçekleştirilmektedir (Taneli 2007).

Flow sitometri cihazında lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak; büyüklük, granülarite, hücrenin yüzey ve iç proteinleri, organelleri ve diğer bileşenlerinin analiz ve ayrımı gerçekleştirilmektedir (Kanev 2015).

Flow sitometri cihazı örnekleri cihaza taşıyan akış sistemi, optik kısım, elektronik kısım ve sonuçların depolandığı bilgisayar ve yazılım olmak üzere 4 kısımdan oluşur.

1. Akış Sistemi: Konik yapıda olan bir merkezi kanal (akış çemberi) ve içerisindeki "sheath fluid" adı verilen özel bir sıvıdan oluşur. Örneği cihaza taşıyan sistemdir.
2. Optik Sistem: Optik sistem, ışık kaynağı ve optik filtrelerden oluşmaktadır. Başlangıçta flow sitometrilerde ışık kaynağı olarak mercury lambaları kullanılırken günümüzde modern flow sitometrilerin çoğunluğu tek bir dalga boyunda ışık veren lazer ışık kaynaklarına sahiptirler.
3. Elektronik Sistem: Elektronik bileşen ise elde edilen optik sinyalin PMT (photo multiplier tubes) ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur.
4. Bilgisayar ve Yazılım: Sinyallerin toplanıp, filtrelerden geçirilip dijital değerlere çevrildikten sonra bilgilerin flow sitometri cihazına bağlı olan bilgisayara

aktarıldığı ve FCS (Flow Cytometer Standard) adı verilen özel bir formatta depolandığı sistemdir (Taneli 2007, Tuna 2014).

### **2.2.1. Flow Sitometri Tekniğinin Kullanım Alanları**

İlk zamanlarda flow sitometri tekniğinden sadece kan hücrelerinin analiz edilmesinde yararlanılırken bu yöntem zamanla tıp ve yaşam bilimlerinde kullanılan bir araştırma yöntemi haline gelmiştir.

Klinik ve araştırma laboratuvarlarında; immünoloji, hematoloji onkoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, parazitoloji, enfeksiyon, yardımcı üreme teknikleri, patoloji, radyasyon onkolojisi, enfeksiyon hastalıklarında, HIV tüberküloz alanlarında,

Tıp alanında; hücre ölümü ve hücresel özelliklerin belirlenmesi, mikroorganizma sayısı ve tür analizi yapılması, virüs, bakteri ve hücre sayımında, parazit ve mantar belirlenmesinde,

Bitkilerde ise; hücre döngüsü analizi, AT:GC oranının belirlenmesi, kromozom izolasyonu, flow karyotipleme de kullanılmaktadır. Teknolojik ilerlemeler ve yeni floresan boya ların geliştirilmesi, flow sitometriyi biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir analiz yöntemi konumuna getirmiştir. Bu yöntemin bitki hücre ve organellerinin analizinde kullanımı yaklaşık olarak 25 yıl önce başlamış olup en çok çekirdek DNA analizinde kullanılmaktadır (Dolezel ve Bartos 2005).

### **2.2.2. Çekirdek DNA İçeriği**

“C” değeri olarak bilinen çekirdek DNA içeriği ilk kez Swift (1950) tarafından kromozom sayısı ile meydana gelebilecek karışıklıkları önlemek amacıyla ortaya sürülmüştür ve çekirdek DNA içeriği türlere özgüdür (Bennett ve Leitch 1995). ”C” değeri genotipin sahip olduğu replike olmamış haploid kromozom takımının içerdiği DNA miktarını ifade etmektedir. Mitozun profaz safhasına girmiş olan diploid ( $2n= 2x$ ) bir çekirdek ile DNA replikasyonu halen başlamamış yani interfaz safhasının başında olan bir tetraploid ( $2n= 4x$ ) çekirdeğin ikisi de aynı miktarlarda DNA içerirler. 1C değeri; herhangi bir genotipin replike olmamış haploid ( $n$ ) çekirdeğin veya DNA’sı replike olmamış diploid ( $2n$ ) çekirdeğin DNA içeriğidir. Çekirdek DNA içeriği pikogram ( $1 \text{ pg}= 10^{-12}$ ) olarak ifade edilir Tuna 2014).

Türler arasındaki çekirdek DNA içeriklerinde farklılıklar saptanmıştır. Türler arasında çekirdek DNA içeriklerinin farklı olmasından dolayı çekirdek DNA içeriğinin bilinmesi taksonomik çalışmalar ve evrim çalışmaları için önemlidir (Price ve Bachman 1975, Özkan ve



ark. 2003). Fakat yapılan bazı araştırmalar sonucunda çekirdek DNA içeriğinin tür düzeyinde sabit olmadığını, bazı türlere ait farklı çeşit ve populasyonların çekirdek DNA içerikleri arasında farklılıkların olduğunu göstermektedir (Cavallini ve ark. 1993; Graham ve ark. 1994; Singh ve ark. 1996).

Çekirdek DNA içeriği belirlenirken ilk başlarda kimyasal analiz ve mikro densitometri yöntemleri kullanılırken gelişen teknolojiyle daha hızlı ve daha hassas sonuç veren flow sitometri analiz yöntemi tercih edilmeye başlanmıştır. Bennett ve Smith (1976, 1991) yaptıkları çalışmalarda DNA içeriği belirlenmiş angiospermiler arasında yer alan türlerin çekirdek 1C DNA içeriklerinin 0,2 pg (*Arabidopsis thaliana*) ile 127,4 pg (*Fritillaria assyriaca*) arasında değiştiğini ifade etmişlerdir.

### 2.2.3. Standart Seçimi

Bitkinin çekirdek DNA içeriği mutlaka belirlemek istenirse, bu bitki çekirdek DNA içeriği bilinen bir standart bitki ile kıyaslanır. Standart bitki belirleneceği zaman analiz yapılacak bitki ile standart bitkinin piklerinin çakışmamasına dikkat edilmelidir. Piklerin çakışmasını önlemek için kullanılan standardın çekirdek DNA içeriği analizde kullanılan bitkinin DNA içeriğinden büyük ya da küçük olmalıdır. Ayrıca standart ile analizi yapılacak örnek arasındaki çekirdek DNA içeriğinin arasındaki fark büyüdükçe hata oranının artması hassasiyeti azaltacağından aralarındaki farkın en az düzeyde olması tercih edilir. Eğer analizde standart kullanılacaksa, standart ile analizin yapılacağı bitkinin dokuları çekirdek izolasyonun başında karıştırılarak boyamanın eşit olması sağlanmalıdır (Tuna 2014).

### 2.3. Flow Sitometri Analiz Yöntemi Kullanılarak Çalışma Yapılan Odunsu Bitkiler

Tamura ve ark. (1995) tarafından Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) ile yapılan araştırmada somatik melezleme sonucu ortaya çıkan sürgünlerin flow sitometri analiz yöntemiyle çekirdek DNA içeriklerine bakılmasını amaçlamış ve ebeveynlerden alınan örneklerin %20'sinin ebeveyn hatlarıyla aynı çıktığının sonucuna varmışlardır.

Capparelli ve ark. (2004) Limon (*Citrus limon*) bitkisinin yerel çeşitlerinin korunması ve daha iyi hale getirilmesi için bir çalışma yapmışlardır. Flow sitometri analiz yöntemiyle limon bitkisinin DNA içeriklerini belirlemiş ve kaydetmişlerdir.

Yabani zeytin (*Olea europaea* L.) ve yabani zeytinin Portekiz çeşitlerinde genom boyutu çekirdek DNA içerikleri flow sitometri analiz yöntemiyle belirlenmesinin amaçlandığı

bir çalışmada (Loureiro ve ark. 2006), elde edilen flow sitometri analiz sonuçlarına göre incelenen çeşitler arasında çok düşük bir varyasyon olduğu tespit etmişlerdir.

Falisticco (2009) İncir (*Ficus carica* L.) bitkisinin sitogenetiği hakkında bilgi edinmek ve gen kaynaklarını tanımlamak amacıyla yaptığı çalışmada incirin triploid ( $3n = 39$ ) sitotiplerini bulmuş, incir genetik araştırmalarının önemi gözlemlenmiş ve sitogenetiğinin ekim yapıldığı alanlarda da değişkenlik gösterdiğini kaydetmiştir.

Marum ve ark. (2009) tarafından Sahil Çamı (*Pinus pinaster*) bitkisinde somatik embriyogenesis sonucu meydana gelen morfolojik değişimlerin flow sitometri analiz yoluyla incelenmesi için yapılan çalışmada somatik embriyo ve somatik embriyogenesis ile üretilen fideler arasındaki çekirdek DNA içeriklerinde önemli bir farklılık tespit edilmediğinin sonucuna varmışlardır.

6 farklı İspanyol asma (*Vitis vinifera* L.) çeşidinde somatik embriyogenesis çalışması sonucunda (Prado ve ark 2010) tetraploid asma çeşidi elde etmek istenmiş ve flow sitometri analizleri sonucunda tetraploid asma çeşidi üretimi pek elde edilemezken en çok mixoploid asma çeşidi üretilmiştir.

Ceren (2012) tarafından altın çilek (*Physalis peruviana*) bitkilerinin "Goldenberry" çeşidi kullanılarak yapılan çalışmada tohumlara ve fide dönemindeki bitkilerin büyüme ucuna farklı dozlarda kolhisin uygulaması yapılmış ve farklı bekleme sürelerinde yaptığı etkilerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Ploidi seviyesinin belirlenmesi için flow sitometri analizleri yapılmıştır. Yapılan flow sitometri analizleri sonucuna göre kolhisin uygulamasının altın çilek bitkisinde kromozom sayısında değişimlere neden olmadığını tespit etmiş ve kolhisin uygulamasının sadece morfolojik varyasyona neden olduğu saptanmıştır.

Pınar ve ark. (2015) çekirdek DNA içerikleri ve SRAP belirteçleri dayalı Türkiye'de yetiştirilen muz (*Musa sp.*) klonları arasındaki genetik ilişkileri araştırmak için yapılmıştır. Türkiye'de yetiştirilen "Erdemli" ve diğer muz klonları arasında yüksek düzeyde bir genetik değişim gözlemlenmiş ve Türkiye'deki "Erdemli" çeşidinin en belirgin yerel klon olduğu görülmüştür. Bu çalışma, moleküler belirteçlerle birlikte çekirdek DNA içeriğinin analizinin, muz klonları arasındaki ilişkileri değerlendirmek için yararlı olabileceğini göstermiştir.

Çimen ve ark. (2016) çekirdeksiz yeni turuncu çeşitlerini geliştirmek amacıyla Klemantin 22D mandarini, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı genotipleri kullanılarak yaptıkları çalışmada, aşı kalemlerine kolhisin uygulamasıyla tetraploid bitki elde etmeye çalışmışlardır. Aşı kalemlerine farklı dozlarda ve sürelerde kolhisin uygulaması

gerçekleştirmişlerdir. Bitkilerden alınan yaprak örneklerinde flow sitometri analiz yöntemiyle ploidi analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda Klemantin 22D mandarinine uygulanan aşu kalemine yapılan uygulama sonucu bir adet tetraploid bitki elde edilirken, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı çeşitlerinden mixoploid bitkiler elde edilmiştir.

#### 2.4. Flow Sitometri Analiz Yöntemi Kullanılarak Çalışma Yapılan Diğer Bitkiler

Kubalakova ve ark. (2005), makarnalık buğday (*Triticum turgidum*) bitkisinin kromozom sıralanmasına yönelik çalışmalar yapmış, buğday genomiklerinde kullanımına yönelik potansiyelini oldukça genişlettiği ve bu önemli ürünün genomunu bir seferde tek bir kromozom kolu şeklinde sıralama imkanının önünü açtığı belirtmişler.

Ekbiç (2005) yaptığı çalışmada, sakız enginar (*Cynara scolymus* L.) çeşidinin ara tip ve yerli tip bitkiler arasındaki farklılıklar morfolojik, sitolojik ve moleküler olarak araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu bitkilerin ploidi düzeyi aynı çıkmış fakat kök ucu kromozom sayımlarına göre her üç tipe de kromozom sayısı bakımından farklılık olmadığı ve bunların diploid olduğu flow sitometri analizleri sonucu belirlenmiştir.

Çekirdeksiz karpuz (*Citrullus lanatus*) üretim materyali olan tetraploid karpuz bitkisi elde etmek için yapılan çalışmada (İnan 2007) Crimson Sweet çeşidi kullanılarak ikişer farklı *in vivo* ve *in vitro* yöntemin tetraploid bitki üretimine etkisi araştırılmıştır. Yapılan ilk *in vivo* yöntemde 7 farklı dozda kolhisin çözeltisi bitkinin büyüme ucuna uygulanmış, diğer yöntemde ise serada büyüyen diploid karpuzların büyüme ucu daldırılmıştır. *İn vitro* denemelerde ise 4 farklı BA dozu içeren MS ortamlarında kotiledonlardan rejenerasyon sağlanmış diğer yöntemde de diploid çeliklere 3 farklı dozda kolhisin uygulaması yapılmıştır. Yapılan uygulamalar sonucu en başarılı uygulama 4mg/l BA içeren MS ortamında gerçekleştiği ve katlama oranının %60,4 olduğu tespit edilmiştir. *İn vivo* uygulamalarda ise katlama oranı %5'de kalmış ve başarı yeterli bulunmamıştır. Elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri flow sitometri analiz yöntemi ile belirlenmiş ayrıca morfoloji ve sitolojik gözlemlerden de faydalanılmıştır.

Kaya (2010) yapmış olduğu çalışmada yonca (*Medicago sativa* subsp. *Varia*) bitkisinin ploidi seviyesi ve DNA miktarlarının belirlenmesini amaçlamıştır. Yoncanın 25 adet varyetesi temin edilmiş ve ploidi seviyelerini belirlemek amacıyla her popülasyondan 3 adet çalışılmıştır. Ploidi düzeyi bilinen diploid ve tetraploid iki yonca bitkisi standart olarak kullanılmış ve diploid bitkinin floresan yoğunluğuna bakıldığında 186 nm'de pik yaptığı,

tetraploid bitkinin ise 361 nm’de pik yaptığı gözlemlenmiştir. Yapılan analizler sonucu tüm türlerin tetraploid olduğu tespit edilmiş ve popülasyon içi ploidi düzeyi varyasyonlarına rastlamamıştır. DNA miktarlarını belirlemek için de DNA miktarı daha önceden bilinen domates (*Solanum lycopersicum* L.) bitkisi standart olarak kullanılmış ve yoncanın diploid türlerinde DNA miktarının domatese hemen hemen eşit olduğu görülürken tetraploidlerde ise diploidlerin 1,7 katı olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada aynı ploidi düzeyine sahip alttürler arasında DNA miktarı bakımından farklar olduğu belirlenmiştir.

Teykin (2011) yapmış olduğu çalışmada Parlak Brom (*Bromus catharticus* Vahl) bitkisinin çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri analizleri ile belirlemek ve elde edilen çekirdek DNA bilgisinden yararlanarak ploidi düzeyleri ile varsa tür ve varyete karışıklıkların saptanmasını amaçlamıştır. Çekirdek DNA analizi sonuçlarına göre çalışmada kullanılan 83 aksesyondan 2 tanesinin *B. catharticus* türüne ait olmadığı, başka bir *Bromus* türüne ait olduğu anlaşılmıştır. Çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık gösteren bitkilerin kromozom sayıları  $2n=42$  olduğu yani hexaploid olduğu belirlenmiştir.

Berber ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışma iki amaca yönelik yapılmıştır. Birincisi kabuksuz çekirdek kabaklarında (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) ışınlanmış polen uyartımı yöntemiyle haploid bitki elde etmek, ikincisi ise yapılan ışın tekniğinde en uygun ışın dozunun bulmaktır. Çalışmada on beş tane genotip kullanılmış ve 50, 100, 150 Gray ışın dozlarını denemişlerdir. Çalışmadaki tüm genotiplerden haploid bitki elde edilmiş ve kullanılan ışınlardan hepsi iyi sonuç vermesine rağmen en iyi sonucu 150 Gray ışın dozundan almışlardır. 75 bitkiyi dış koşullara alıstırmışlar ve bunların %42,6’sının haploid, %57,3’ünün de diploid olduğunu belirlemişler. Bu çalışmada indirekt yöntemler kullanılmış flow sitometri analiz yöntemi kullanılmamıştır.

Oruç (2012) kan portakallarına (*Citrus sinensis* Osbeck) ait 11 adet genotipin çiçek tozlarının miktarlarını, canlılıklarını, *in vitro* ortamda çimlenme oranlarının incelenmesi, ayrıca ‘Clementine’ ana ebeveyni ile kan portakalı baba ebeveynine ait değişik genotiplerin melezlenmesinden elde edilen meyve ve tohum tutumunu tespit edilmesini amaçlamıştır. Ploidi analizleri flow sitometri analiz yoluyla 102 bitkiden 12’sinin tetraploid olduğunu, geri kalanlarının morfolojik olarak mezofil ebeveyne benzeyen diploidler olduğunu göstermiştir.

Özalp ve ark. (2012) asma ıslahı çalışmalarında yeni çeşitlerin geliştirilmesinde çekirdeksizlik, tane büyüklüğü ve yüksek kaliteyi amaçlamışlardır. Kromozom katlaması yöntemiyle büyük taneli çekirdekli ve çekirdeksiz sofralık üzüm elde edilmiştir.

Yaralı ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada *Allium* türlerinde haploid embriyo elde etmeyi amaçlamışlardır. *Allium* türlerinde yapılan araştırmalarda ön plana çıkan gynogenezis teknikleri ile yumurta, yumurtalık veya çiçek tomurcuğunun *in vitro* koşullarda kültüre alınması ile haploid bitkiler başarılı bir şekilde elde edilerek, ıslah çalışmaları için gerekli saf hatlara daha kısa sürede ulaşıldığını bildirmişlerdir.

Kaska (2013), yapmış olduğu çalışmada *Allium* türlerinden olan *A. cepa*, *A. ampeloprasum* ve *A. tuncelianum* (Kollmann) türlerinde çiçek tomurcuğu yöntemi uygulayarak ginogenik ve somatik bitki elde edilmesini amaçlamıştır. İki yıl boyunca temel besin ortamları olarak BDS, MS ve B5 ile yapılan doku kültürü çalışmalarında kullanılan besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ve sukroz eklenmiş sonuç olarak ginogenik ve somatik sürgün oluşturma performanslarını incelemiştir. Flow sitometri analiz yöntemiyle yapılan analizlerde *A. cepa* bitkilerinin genellikle haploid, elde edilen sürgünlerin ise %81,63'ünün diploid olduğu, *A. Ampeloprasum* bitkisinin çoğunluğunun diploid olduğu elde edilen somatik sürgünlerinin ise hiçbirinde ploidi değişikliği olmamıştır. *A. tuncelianum* türünün ise eşit miktarda haploid ve diploid ploidi seviyesine sahip olduğu ve bu nedenle mixoploid ( $n+2n$ ) olduğunu belirlemiştir. Elde edilen sürgünlerinde ise diploid, kallusların ise tetraploid olduğu gözlemlenmiştir.

Bahadırılı (2014) Hatay ili çevresinde bulunan zengin Adaçayı (*Salvia sp.*) popülasyonunun genetik yapısını ortaya koymak, ekotipler arasındaki varyasyonları moleküler düzeyde belirleyerek yaptığı çalışmada ileride yapılacak ıslah çalışmalarına temel oluşturmayı hedeflemiştir. Flow sitometri analiz yöntemiyle tür ve alttürlerin genom büyüklüklerini belirlemiş, farklı lokasyonlardan temin edilen aynı türün bitki örnekleri arasında genetik farklılığın olduğunu gözlemlemiş ve bu durumun seçilen genotiplerin bulunduğu alanlarda tohumdan çoğaldıklarının bir göstergesi olarak kabul edildiğini belirtmiştir.

Gülcü (2016) yaptığı çalışmada bazı kılçıksız brom (*Bromus inermis* L.) türlerinin, flow sitometri analiz yöntemiyle çekirdek DNA içerikleri, ploidi seviyesi ve kromozom sayılarını belirlemeyi amaçlamıştır. Yapılan analizler sonucunda bitki türleri arasında çekirdek DNA içerikleri açısından önemli farklar olduğunu belirlemiştir. 48 kılçıksız brom türünden 33 türün tetraploid, 10 türün oktaploid, 5 türün ise dekaploid olduğu görülmüştür.

## 2.5. Cinsiyet Belirleme Amacıyla Yapılan Çalışmalar

Costich ve ark (1991), *Latifolia Poiret (Caryophyllaceae)* bitkisinde flow sitometri analiz yöntemi ile yapılan cinsiyet belirleme çalışmalarında erkek bitkilerin genomlarının dişi bitkilere göre daha büyük olduğunu ve bunun yanı sıra erkek ve dişi bitkilerin genomlarında AT/GC yapılarında da farklılık gözlemlendiğini belirtmiştir.

Vagera ve ark. (1994) yaptıkları çalışmada *in vitro* koşullarda *Melandrium album* bitkisinin olgunlaşmamış mikro sporları kullanılarak androgenesis yapılmıştır. *In vitro* koşullarda da süper erkek (supermales) x normal dişi bitkilerle çaprazlandırılmış ve bu melezleme sonucu sadece dişi bitkiler elde edilmiştir. Bu çalışmada ploidi seviyesi ve cinsiyet tayinin yapılması için flow sitometri analiz yöntemi kullanılmıştır.

Dolezel ve Göhde (1995) dioik bitki olan *Melandrium album* ve *M.rubrum* bitkilerinin çekirdek DNA içeriklerini analiz etmek için flow sitometri analiz yöntemini kullanmışlardır. Yaprak dokularının kesilip hücrelerine zarar verilmeden parçalanması sonucu izole edilen çekirdeğin  $G_{0/1}$  piklerinin değişim katsayıları (%0,53-0,70) olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre aynı histogramda dişi ve erkek bireylere ait pikler ayrı ayrı ayırt edilmiş ve dişilerin çekirdek DNA içerikleri erkeklere göre daha düşük çıkmıştır. Sonuç olarak heterogametik dioik bitkilerde erken safhalarda cinsiyet analizinin yapılabileceğinin kanısına varmışlardır.

Aytürk (2010) dioik bir bitki olan defne bitkisinde eşey belirlenmesi, çiçek tomurcuğunun farklılaşmasının belirlenmesi ve gelişiminin saptanmasını amaçlamıştır. Dişi ve erkek çiçeklerin gelişim evrelerini belirlemiş ve bunlar arasında ki görülebilir farklılıkları saptamak için çiçek taslaklarını ince eşit analizleri kullanılarak kıyaslamıştır.

Cornejo ve ark. (2012) dioik bir bitki olan *Chamaedorea* palmye türünde yaptıkları çalışmada dört tane *Chamaedorea* türünün DNA içeriğini flow sitometri analiz yöntemi ile analiz etmişlerdir. Çekirdek DNA içeriğinin %90'ının  $G_0/G_1$  evresindeki yaprak çekirdeklerinde olduğunu belirtmişler ve 4C'den yüksek DNA içeriğine sahip çekirdeklerin tespit edilmediğini belirtmişlerdir. Bu da *Chamaedorea* palmye türünde endopoliploidi olmadığını ve dört türün de diploid olduğunu göstermiştir. *Chamaedorea* palmye türünde ilk defa yapılan bu çalışmada türler arasındaki DNA içeriği analizleri göz önüne alındığında erkek ve dişi bitkiler arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

Rath ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada *in vivo* koşullarda olgunlaşmış domuz oositlerini *in vitro* koşullarda X ve Y kromozumlu spermlemlerle döllemişler ve flow sitometri analiz yöntemiyle çekirdek DNA içeriklerine bakmışlardır. *In vitro* şartlarda yapılan embriyo transferinde embriyonun yeterliliği gerçekleşen gebeliklerle tespit edilmiştir. Spermatozoolar işaretlenmiş ve flow sitometri cihazıyla ayrılmıştır. Yapılan analizler sonucunda X spermatozoosu için saflık oranı %92 olarak belirlenirken, Y için saflık yüzdesi %83 olarak belirlenmiştir.

Cavallo ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada, monomorfik bir kuş olan Mısır Akbabası (*Neophron percnopterus*)'nın kan örneklerinden genom boyutunu ve cinsiyetini flow sitometri analiz yöntemini kullanarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada homogametik erkeklerle heterogametik dişinin çekirdek DNA içerikleri karşılaştırılmış ve erkeklerin çekirdek DNA içeriğinin dişilere oranla ortalama %5,6 daha yüksek olduğu görülmüştür. Flow sitometri analiz sonuçlarını doğrulamak için karyotipik analizi yapmışlar ve hem flow sitometri hem de sitogenetik analizlerle çıkan sonuçlar aynı eşdeğerde çıkmıştır.

Birçok kuş türünde cinsiyet analizi yapmak için müdahale olmadan analizleri gerçekleştirmek gereklidir. Bu doğrultuda Gucco ve ark. (1997) yapmış oldukları çalışmada, Kuzey İtalya'daki Moorhen (*Gallinula chloropus*) cinslerine flow sitometri ile cinsiyet analizi yapmışlardır. Alınan kan örneklerinden DNA içeriklerinin net ve tekrarlanabilir olması sağlanmıştır. Erkek ve dişi Moorhen cinsleri arasında çekirdek DNA içeriği bakımından farklar bulunmuştur. Yavru morheen cinsleri analizlerden hariç tutulduğunda yapılan flow sitometri analizlerinde kuşların %90'ında cinsel ayrımı başarı ile gerçekleştirmişlerdir.

Kuluçka gelişim dönemindeki cinsiyet oranı varyasyonlarının haplodiploid böceklerde cinsiyet dağılımı araştırması için önemli etkilere sahip olduğunu belirten Aron ve ark. (2003) yılında yavru karıncalarda yavru cinsiyetini belirleme amacıyla karıncalarda cinsiyet analizi çalışması yapmışlardır. *Linepithema humile* türünde haploid erkekleri diploid dişilerden ayırmak için flow sitometri analiz yöntemini kullanmışlardır. Yapılan analiz sonuçlarına göre karıncalarda larva aşamasından itibaren flow sitometri yöntemi cinsiyet ayırımında olumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca Aron ve ark. (2003) yaptıkları bu çalışmayla zar kanatlılar (*Hymenoptera*) türlerinde de cinsiyet analizi yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Eşek arıları, karıncalar ve arılar da cinsiyet tayininde kullanılan komplementer sistem ortaktır. Bu bilgiden yola çıkarak Barcenar ve ark. (2008) yılında yaptıkları çalışmada Eşek

arısının (*Cactolaccus grandis*) erkek ve dişilerinin genom boyutunun belirlenmesini amaçlamışlar ve flow sitometri analiz yöntemini kullanmışlardır. Haploid ve diploid erkeklerle dişi eşek arıları işaretlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 314 erkek eşek arısının hiçbiri diploid çıkmamıştır.

Tavuk kırmızı kan hücreleri çekirdek DNA içeriklerinin analizi için standart olarak kullanılmaktadır. Bu bilgiyle Andreia ve ark. (2010)'larının yapmış oldukları bu çalışmada ki amaçları *Gallus gallus domesticus* türlerinin çekirdeğinde erkek (ZZ) ve dişi (ZW) kromozomları arasında ki DNA içerik farklarının flow sitometri analiz yöntemiyle ayırt edilip edilmeyeceğini saptamaktır. Kromozomlar feulgen boya ile boyanıp işaretlenmiş ve analiz edilmiştir. Yapılan flow sitometri analiz sonuçlarına göre Z cinsiyet kromozomunun W cinsiyet kromozomuna oranla çekirdek DNA içeriğinin yaklaşık iki kat (0,99 pg) daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçla *Gallus gallus domesticus* arasında ZZ/ZW çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık olduğu flow sitometri analiz yöntemiyle ayırt edilmiştir.

Demirci (2014), yapmış olduğu derlemede boğa spermlerinde cinsiyet belirlenmesinde yapılan çalışmaları güncelleştirmeyi amaçlamıştır. Boğa spermlerinde cinsiyetin belirlenmesi flow sitometri analiz yöntemiyle yeterince başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Flow sitometri cihazı yüksek derecede saflıkla spermler arasında ki çekirdek DNA içeriklerinin %3-4'lük farkını ortaya çıkarttığı gibi %90 daha saf şekilde ayrılmasını sağlar. Bu sistemle %85-95 doğruluk oranı saptanmış ve bu sonuçlara göre yapılan yaklaşık 7000 buzağılama ile elde edilen dişi buzağuların cinsiyet oranında %89 başarı gerçekleştirilmiştir.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Bitkisel Materyal

Bu tez çalışmasında bitki materyali olarak Çanakkale, İstanbul, Tekirdağ ve Antalya illerinde doğal yayılış gösteren defne ağaçlarından toplanan yapraklar kullanılmıştır. 4 farklı ilden toplanan defne yapraklarının toplandıkları coğrafi bölgeler özellikleri ve toplanma biçimleriyle beraber çizelge 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan defne yapraklarının toplandıkları şehirler ve örnek genişliği

Örnek Alınan Şehirler	Enlem	Boylam	Alınan Örnek Genişliği	
			DIŞI	ERKEK



Çanakkale/ Halk Bahçesi	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	22	27
Tekirdağ/ Değirmenaltı	40°59'07.2"N	37°35'06.3"E	10	15
İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	8	2
Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	10	6
<b>TOPLAM</b>			<b>50</b>	<b>50</b>



Şekil 3.1. Materyallerin toplandığı şehirlerin harita üzerinde gösterimi (Anonim 2017b)



Şekil 3.2. Defne (*Laurus nobilis* L.) yapraklarının doğal koşullarda toplanması

### 3.2. Materyallerin Eldesi ve Saklama Koşulları

Materyallerin koyulacağı petri kabına sığacak büyüklükte iki tabaka filtre kağıdı kesilmiştir. Kağıtlardan bir tanesi petri kabı içerisine yerleştirilmiş ve su ile ıslatılmış, ıslatılmış olan filtre kağıdı üzerine alınan yaprak dokusu düzgün ve katlanmayacak bir şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra yaprağın üzerine ikinci filtre kağıdı yerleştirilmiş ve ıslatılmıştır. Suyun fazlası dokularda çürümeye sebep olabileceğinden su miktarının çok olmamasına dikkat edilerek fazlası dökülmüştür. En son etiketleme yapmak için petri kabının içerisine kurşun kalem ile yazılmış bir etiket bırakılmış ve taşıma sırasında dökülmeleri engellemek için petri kapları bantlanmıştır.

Daha sonra ısı geçirmez kutunun içerisine buz kalıbı koyularak kutunun ağzı bantlanmış ve taşınma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Yaprakların analiz edileceği yere transferinden sonra analiz gerçekleşene kadar buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmiş ve analiz sonuçları alınana kadar yapraklarda doku çürümesini engellemek amacıyla filtre kağıtlarındaki su miktarı her gün kontrol edilmiştir.



**Şekil 3.3.** Örneklerin taşındığı köpük kutu ve buz aküleri

### **3.3. Flow Sitometri ile Çekirdek DNA Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması**

Bu çalışma, defne bitkisinde cinsiyetin erken dönemde belirlenebilmesi için *in vivo* koşullarda sağlıklı ve genç bitkilerden elde edilen taze yaprak dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaprak örneklerinin çekirdek DNA içerikleri Arumuganathan ve Earle (1991) tarafından tanımlanan metot kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarı'nda bulunan PARTEC marka flow sitometri cihazı ile yapılmıştır ve yapılan çekirdek DNA içeriği analizlerinde PARTEC firmasının hazır kitleri kullanılmıştır.

Çalışmada bitkilerin yaprak dokularından çekirdek izolasyonu yapılarak Arumuganathan ve Earle (1991) tarafından bitki örneklerinde çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesinde kullanılacak protokol uygulanmıştır.

Analizlerde defne yaprak dokuları için 10,65 pg DNA'ya sahip arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisi standart olarak kullanılmıştır.

#### **Çekirdek İzolasyonu için Protokol**

- *In vivo* koşullarda alınan defne yaprak dokuları ve standart olarak kullanılan arpa bitkisinin yaprak dokuları 1:1,5 oranında alınmış ve bitki dokuları petri kabına yerleştirilmiştir.

- Petri kabına 1 ml A stok solüsyonundan (Çizelge 3.2)\* ilave edilmiş ve bitki dokuları solüsyon içerisinde jilet yardımıyla çok küçük parçalara ayrılan kadar parçalanmıştır.
- Elde edilen solüsyon, üzerinde 30-33 µm filtre bulunan mikro santrifüj tüplerine transfer edilerek filtre edilmiştir.
- Mikro santrifüj tüpü dibinde oluşan tortu 400 µl B solüsyonu (Çizelge 3.2)\* içerisinde çözdürülmüş ve örnekler 37°C de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Örnekler flow sitometri cihazı ile analiz edilmiş ve sonuçlar hesaplanmıştır.



**Şekil 3.4.** Örneklerin flow sitometri analizine hazırlanması

**Çizelge 3.2.** Flow sitometri analizinde kullanılan solüsyonlar

*A solüsyon içeriği	*B solüsyon içeriği
20 ml MgSO <sub>4</sub> buffer,	5 ml solusyon A
20 mg Dithiothreitol,	10 µl RNase
500 µl DAPI stok,	DNase free
550 µl TritonX-100	

### 3.3.1. Flow Sitometri ile DNA Analizi ve Çekirdek DNA İçeriğinin Ölçülmesi

Çekirdek DNA içeriği “C” değeri olarak bilinir. “C” terimi ilk kez Swift (1950) tarafından kromozom sayısı ile meydana gelebilecek karışıklıkları önlemek amacıyla ortaya sürülmüştür. Çekirdek DNA içeriği türlere özgüdür (Bennett ve Leitch 1995). Herhangi bir “C” değeri genotipin sahip olduğu replike olmamış haploid kromozom takımının içerdiği DNA miktarını ifade etmektedir.

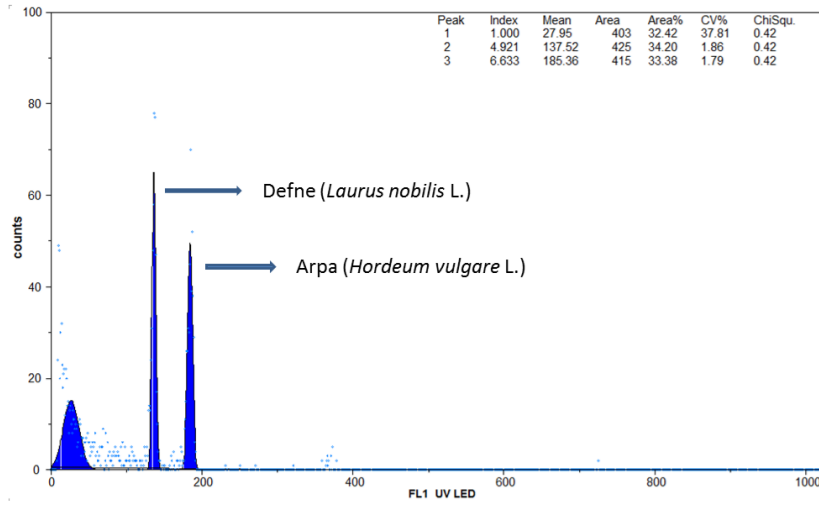
Örnek hazırlanırken uygulanan prosedür sonucunda bitkinin yaprak dokusunda ki hücrelerde mekanik olarak parçalanma meydana gelir ve hücre çekirdekleri serbest hale geçer. Çekirdeklerin serbest kalmasını sağlayan ve deterjan olarak kullanılan extraction buffer çekirdeklerin zarları üzerinde açıklıklar oluşturur. Bu açıklıklardan boyama solüsyonu olarak içeri giren floresan boya (DAPI) nükleik asitlere bağlanır. Çekirdek DNA içeriği ne kadar ise açıklıklardan geçen ve nükleik asitlere bağlanan DAPI miktarı doğru orantılıdır (Tuna 2012).

Flow sitometri cihazı ile çekirdek DNA analizi yapılırken analizin hassas olması için histogram üzerinde oluşan pikler olabildiğince ince ve uzun olmalı, sonucun çıkması için piklerin üst üste gelmemesi gerekmektedir. Aynı zamanda CV olarak adlandırılan varyasyon katsayısına bakılarak sonuçların daha güvenli olması sağlanır. CV değerinin %3’ün altında olması veya bazı türlerde %5’e kadar çıkması örneğin kabul edilebilirlik düzeyini gösterir (Doležel ve Bartoš 2005).

Örneğin mutlak DNA içeriği; örnek ile standart olarak kullanılan örneğin G1 piklerinin floresan yoğunluklarına ait değerler kullanılarak pikogram (1pg = 10<sup>-12</sup> g) olarak hesaplanır (Savaş Tuna 2014).

Çekirdek DNA içeriğinin hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda belirtilmiştir (4.1);

$$\text{Çekirdek DNA miktarı} = \frac{\text{DNA miktarı bilinmeyen türe ait} \\ \text{florasan yoğunluğu} \\ \text{(G1 pikinin değeri)}}{\text{Standarda ait} \\ \text{örneğin florasan yoğunluğu} \\ \text{(G1 pikinin değeri)}} \times \text{standartın DNA içeriği}$$



Şekil 3.5. Defne ve arpa bitkisine ait G1 pik değerleri

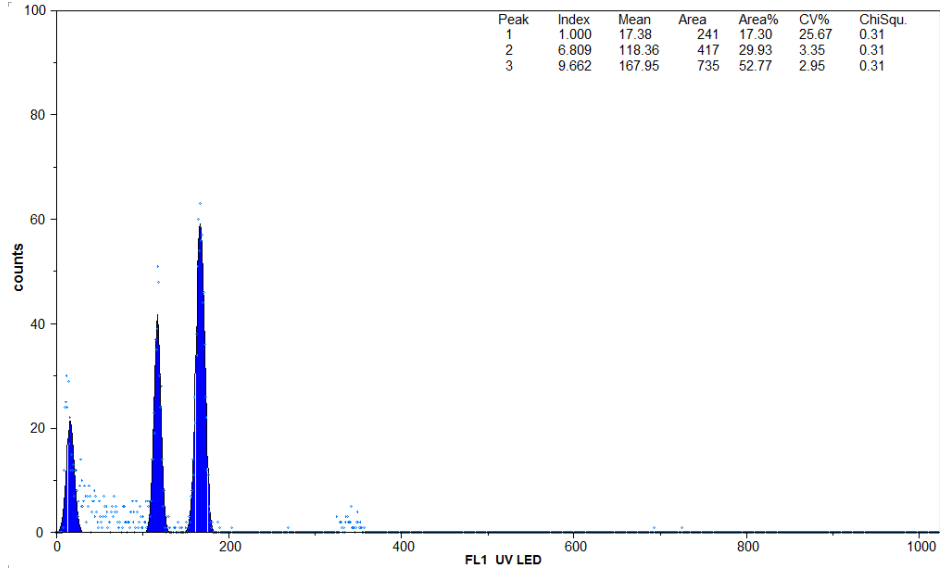
### 3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Defne bitkisine ait çekirdek DNA içerik miktarlarının istatistiksel analizi 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmada elde edilen veriler bilgisayarda IBM SPSS Statistics 22 programında bağımsız gruplar için t testi uygulanmıştır. Yapılan analizler sonucu elde edilen veriler kullanılarak dioik bitki olan defnenin erkek ve dişi bitkisi birbirinden ayrılmıştır.

## 4.ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Defne Bitkisinin DNA İçeriği

Bu tez çalışmasında Türkiye'deki dört coğrafik bölgeden farklı 100 adet defne bitkisinden yaprak örneği toplanmıştır. Toplanan 100 adet defne yaprak örneğinin 83'ünde çekirdek DNA içerik miktarı analizi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. 17 adet bitkinin yaprakları analize uygun dönemde olmadığı için çekirdek DNA içerik analizi yapılamamıştır. Elde edilen sonuçlara göre erkek defne bitkilerinin DNA içerik miktarları 7,74–8,34 pg ve dişi defne bitkilerinin DNA içerik miktarları ise 7,61–8,13 pg arasında değişim göstermiştir. Analizler sonucu elde edilen erkek ve dişi defne bitkilerinin flow sitometri histogramları Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmektedir.

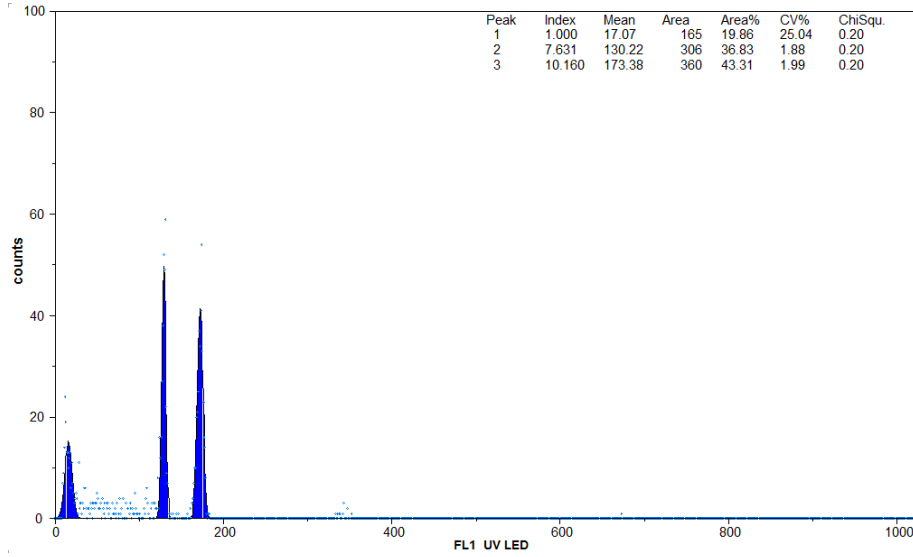


Şekil 4.1. Çanakkale'den toplanan dişi defne (*Laurus nobilis* L.) ve standart olarak kullanılan arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkilerinin G1 piklerine ait analiz değerleri

Yapılan hesaplamalar sonucunda dişi defne (*Laurus nobilis* L.)'ye ait bitkilerin çekirdek DNA içeriği aşağıdaki formüle göre (4.2);

$$\text{Çekirdek DNA miktarı} = \frac{\text{DNA miktarı bilinmeyen türe ait florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}}{\text{Standarta ait örneğin florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}} \times \text{standartın DNA içeriği}$$

Dişi bitki çekirdek DNA içeriği=  $(118,36 / 167,95) \times 10,65 = 7,51$  pg'dır.



**Şekil 4.2.** Çanakkale'den toplanan erkek defne (*Laurus nobilis* L.) ve standart olarak kullanılan arpa (*Hordeum vulgare*) bitkilerinin G1 piklerine ait analiz değerleri

Erkek defne (*Laurus nobilis* L.)'ye ait bitkilerin çekirdek DNA içeriği ise yukarıda verilen formüle göre;

Erkek bitki çekirdek DNA içeriği=  $(130,22 / 173,39) \times 10,65 = 7,99$  pg'dır.

**Çizelge 4.2.** Erkek ve Dişi defne bitkilerinin DNA içerik miktar düzeylerinin karşılaştırılması için yapılan bağımsız gruplar için t testi analiz sonuçları;

Cinsiyet	N (Örnek Genişliği)	X (Ortalama)	SS (Standart Sapma)	Sd (Serbestlik Derecesi)	t	P
Dişi	40	7,8498	0,10560	81	-3,833	,000*
Erkek	43	7,9544	0,13948			

\*p<0,05

Dişi ve erkek bitkilerinin çekirdek DNA içeriklerinin karşılaştırması için yapılan bağımsız gruplar t testi sonucuna göre dişi bitkilerin çekirdek DNA içeriği  $7,84 \pm 0,10$  pg ve erkek bitkilerin çekirdek DNA içeriği  $7,95 \pm 0,13$  pg olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre dişi ve erkek bitkilerin ortalama DNA içerikleri arasında 0.05 düzeyde farklılık görülmüştür. Erkek ve dişi bitki çekirdek DNA içeriklerinde 0,11 pg fark belirlenerek erkek bitkilerin çekirdek DNA içeriklerinin dişi bitkilere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir



## 5. TARTIŞMA

Çekirdek DNA içerik belirleme çalışmaları bitkilerde genel olarak farklı türlerin genomik karakterizasyonu ve evrimlerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. *Vicia* (Chooi, 1971), *Brassicaceae* (Verma ve Rees, 1974), *Solanaceae* (Narayan, 1987) *Papaver* (Srivastava ve Lavania, 1991), *Festuca* (Ceccarelli ve ark. 1992), *Hydrangea* (Cerbah ve ark. 2001) ve *Bromus* (Tuna ve ark. 2001) gibi cinslerde de başarıyla kullanılmıştır. Ohri ve ark. (1998) çalışmalarında bir cins içerisinde aynı kromozom sayısına sahip çok sayıda türün bulunduğu durumlarda; türler arasındaki çekirdek DNA içeriği farklılıklarının türlerin teşhisi ve sınıflandırılmalarında kullanmışlardır.

Geçmiş yıllarda bitkilerde çekirdek DNA miktarlarının belirlenmesinde mikro spektrofotometri yöntemi kullanılırken (Bennett ve Smith 1976), son yıllarda kolaylığı, hızı ve güvenilirliğinden dolayı flow sitometri analiz yöntemi, çekirdek DNA içeriğini belirlemede tercih edilen bir metot olmuştur (Rayburn ve ark. 1989; Heslop ve Harrison, 1995)

Bu tez çalışmasında, Türkiye'nin 4 farklı coğrafi bölgesinden toplanan erkek ve dişi defne bitkisinin taze yaprak örnekleri kullanılarak çekirdek izolasyonu Arumunagathan ve Earle (1991) tarafından kullanılan yöntem kullanılarak yapılmıştır. Benzer şekilde Tuna ve ark. (2001), araştırmalarında *Bromegrass* bitkisinde aynı yöntemi kullanarak başarılı bir şekilde çekirdek izolasyonu yapmışlardır ve Savaş Tuna doktora tez çalışmasında *Brachypodium distachyon*'un çekirdek DNA içeriklerini belirlemek için çekirdek izolasyonunu Arumunagathan ve Earle (1991) tarafından kullanılan yöntem kullanarak yapmıştır.

Tez çalışması kapsamında defne yapraklarından izole edilen DNA çekirdeklerin içeriklerini belirlemek için flow sitometri analiz yöntemi kullanılmıştır. Aynı şekilde Smarda ve ark. (2008), 101 *Festuca* taksonu ve 14 yakın akrabasının çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri analiz yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. Flow sitometri analiz yöntemi ile yapılan benzer çalışmalarda Tamura ve ark (1995) Trabzon hurmasının (*Diospyros kaki* L.) flow sitometri yöntemiyle çekirdek DNA içeriklerine bakmışlar ve ebeveynlerle aynı hatlara sahip olup olmadıklarını incelemişlerdir. Buna benzer olarak Loureiro ve ark (2006), yabani zeytinin (*Olea europaea* L.) genom boyutunu çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri analiz

yöntemiyle belirlemişlerdir. Aynı şekilde Capparelli ve ark (2004), limon (*Citrus limon*)'un yerel çeşitlerini korumak ve daha iyi hale getirmek için limon bitkisinin çekirdek DNA içeriklerini belirlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında flow sitometri analiz yöntemi başarılı bir şekilde cinsiyet belirlemek için kullanılırken bazı çalışmalarda farklı amaçlarla kullanılmıştır örnek olarak tür belirleme, genetik varyasyonun olup olmadığı veya bitkilerde ki ploidi düzeyini belirlemek için kullanılmıştır. Bu çalışmalara istinaden Kaya (2010), yonca (*Medicago sativa* subsp. *Varia*) bitkisinde ploidi seviyesi ve çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi için yoncanın 25 varyetesini kullanmış, ploidi düzeyi bilinen diploid ve tetraploid 2 yonca bitkisini standart olarak seçmiştir. Standart bitkilerin floresan yoğunluklarına bakıldığında diploid bitki 186 nm'de pik yaparken, tetraploid bitkinin 361 nm'de pik yaptığı görülmüştür. Yaptığı flow sitometri analiz sonuçlarına göre tüm türlerin tetraploid olduğunu belirlemiştir. Benzer bir çalışmada ise Ceren (2012) altın çilek (*Physalis peruviana* L.) bitkilerinde tohumlara ve fide dönemindeki bitkilere farklı dozlarda kolhisin uygulaması yaparak ploidi seviyesinin belirlenmesi için flow sitometri analizleri yapmıştır. Teykin (2011) çalışmasında *Bromus catharticus* Vahl aksesyonlarının çekirdek DNA içeriklerini belirlemiştir ve 83 aksesyondan 2 tanesinin *B. catharticus* kompleksi içerisinde yer alan taksonlardan (alt tür veya varyete) olmayıp, başka bir *Bromus* türüne ait olduğunu açıklamıştır. Çekirdek DNA analizi sonuçlarına göre *B. catharticus* kompleksinin büyük bir taksonomik çeşitliliğe sahip olduğunu açıklamıştır.

Defne bitkisinde yapılan çalışmalar genellikle; yapraklarda uçucu yağ oranının belirlenmesi, bitkinin içerdiği kimyasal bileşenlerinin saptanması, kalite özelliklerinin incelenmesi ve uygun yetiştirme tekniklerinin bulunması şeklinde olduğu gözlemlenmiştir

Tez çalışmasında defne bitkisinde yapılan analizler 3 tekerrür halinde toplanan genç ve taze defne yapraklarında yapılmıştır. Buna paralel olarak, Göker ve ark. (1983), farklı bölgelerden topladıkları defne yaprakları üzerinde kaliteyi etkileyen faktörleri araştırmış, yaptığı araştırmalar sonucunda bitki çeşidi, yetiştiği yer, bitkiye yapılan uygulamalar, depolanma şekli gibi faktörlerin yapraklarda kaliteyi etkilediğini belirtmişlerdir. Benzer olarak defne yaprak kalitesinin bitkisel boyacılık alanında kullanımını incelemek ve farklı kaynatma sürelerinde elde edilen renk değişimlerini incelemek amacıyla Ölmez (2004) yaptığı çalışmada farklı kimyasallarla yeşil, kahverengi ve kıvıll gibi renkler elde etmiş ve

yapraklara kaynatma yöntemi uygulandıkça renklerde koyulaşmanın olduğunu saptamıştır. Yapraklarla yapılan başka bir çalışmaya bakıldığında ise, Atalay (2009) defne yapraklarının yonca silaj yapımında kullanılıp kullanılmadığını incelemiş, defne yaprağı ve melas karışımının karbonhidrat bakımından zengin yonca silajı yapımına uygun olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde yapraklar üzerinden yapılan araştırmalarda Sarı ve ark. (2010) defne bitkisinde uçucu yağ oranları arasında ki varyasyonu belirlemeye yönelik yaptığı çalışmada uçucu yağ oranının %2,80-3,40 arasında değiştiğini, uçucu yağın ana bileşeninin eucliptol olduğunu belirlemiştir. Fakat yapılan başka bir uçucu yağ çalışmasında Karık ve ark (2015) Türkiye'deki defne bitkilerinde uçucu yağ bileşenlerini belirlemek amacıyla farklı lokasyonlardan defne yaprağı toplamış ve kurutmuşlar, yağlar su distilasyonu ile çıkarılmıştır. Kuru yapraklarda uçucu yağ oranının %0,4- 4,5 arasında değiştiğini ve ana bileşenin 1,8-cineole olduğunu tespit etmişlerdir. Defnenin genetik farklılıklarını RAPD moleküler yöntem ile belirlemek isteyen Kavaklı (2012), ilkbahar başlangıcında farklı bölgelerden yaprak örneği toplamıştır. DNA izolasyonu, PCR- RAPD uygulamaları ile agaroz jel elektroforezi yapmıştır.

### **5.1. Dioik Bitkilerde Flow Sitometri Yöntemi İle Cinsiyet Belirlenmesi**

Defne bitkisinde yapılan literatür taramaları incelendiği zaman farklı araştırmacılar tarafından bitkinin yapraklarından, çeliklerinden, çiçek ve meyvelerinden farklı araştırmaların yapıldığı görülmüştür ancak bu bitkide cinsiyet belirleme çalışmalarına rastlanmamıştır.

Çiçek açan bitkilerin büyük bir kısmı hermafrodit olmasının yanı sıra eğer erkek ve dişi çiçekler farklı bitkilerde bulunuyorsa bu bitkilere dioik (iki evcikli) bitkiler denilmektedir. Dioik bitkilerin genelinde gelişimin ilk aşamasında, fenotipik olarak cinsiyet tayini yapılamaz ve erken cinsiyet ayırımı için genelde genotipik olarak teşhisler yapılabilmektedir. Defne gibi dioik olan bitkilerde gelişmelerinin başında cinsiyet belirlenmesi ve amaca uygun fidan yetiştirebilmek oldukça önemlidir. Yapılan tez çalışmasında erkek ve dişi bitkilerin DNA içeriği belirlenerek standart oluşturulmuştur buna benzer şekilde Türkiye'de defne bitkisinde eşey tayininde yapılmış bir çalışma mevcuttur. 2010 yılında yüksek lisans tezi olarak yapılmış bu çalışmayı; Aytürk (2010) dioik bir bitki olan defne bitkisinde eşey belirlenmesi, çiçek tomurcuğunun farklılaşmasının belirlenmesi ve gelişimin saptanması amacıyla, bitkinin gelişim evrelerini belirlemiş ve bunlar arasındaki farklılıkları saptamak için çiçek taslaklarını ince eşit analizleri kullanılarak kıyaslamıştır.

Flow sitometri analiz yöntemi kullanılarak dioik bitki olan defne bitkisinin yaprak örneklerinde cinsiyet belirleme çalışmaları başarılı bir şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre erkek bitkilerin çekirdek DNA içerikleri ortalama 7,74–8,34pg ve dişi bitkilerin çekirdek DNA içeriklerinin ise ortalama 7,61-8,13 pg arasında değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Buna benzer bir şekilde Dolezel ve Göhde (1995), iki farklı çeşit çöven otu (*M. album* ve *M. rubrum*) bitkisinin genç yapraklarını kullanarak yüksek çözünürlüklü flow sitometri analiz yöntemi ile cinsiyet tayini yapmışlardır. Bu çalışmada dişi bitkilerin hücrelerinin çekirdek DNA içeriği erkek bitki hücresininkinden daha düşük düzeyde bulunmuştur. Erkek ve dişi bitkilerin çekirdek DNA içeriklerinde % 3,7 oranında bir farklılık görülmüştür. Başka bir çalışmada ise *Agropyron* türleri arasında 2C çekirdek DNA içeriğinin 13,19-26,39 pg aralığında değiştiği saptanmıştır (Vogel ve ark. 1999). Benzer bir çalışmada ise, Costich ve ark. (1991), *Latifolia* Poiret (*Caryophyllaceae*) bitkisinde flow sitometri analiz yöntemi ile yapılan cinsiyet belirleme çalışmalarında erkek bitkilerin genomlarının dişi bitkilere nazaran daha büyük olduğunu ve bunun yanı sıra erkek ve dişi bitkilerin genomlarında AT/GC değerinde de farklılıklar gözlemlendiği bildirmişlerdir. Diğer taraftan Vagera ve ark. (1994)'larının çalışmasında *in vitro* koşullarda *M. album* bitkisinin olgunlaşmamış mikro sporları kullanılarak androgenesis yapılmıştır. *In vitro* koşullarında süper erkek (supermales) x normal dişi bitkilerle çaprazlandırılmış ve bu melezleme sonucu sadece dişi bitkiler elde edilmiştir. Bu çalışmada ploidi seviyesi ve cinsiyet tayinin yapılması için flow sitometri analiz yöntemi kullanılmıştır. Dioik bitkilerde yapılan başka bir cinsiyet analizi çalışması ise Cornejo ve ark (2012), tarafından dört *Chamaedorea* palmye türünde erkek ve dişi bitkiler arasında çekirdek DNA içeriği bakımından önemli bir fark olup olmadığı yönünde bir çalışma yapılmıştır. *Chamaedorea* palmye türlerinde endopoliploidi olmadığı ve dört türünde diploid olduğunu saptamışlardır. *Chamaedorea* palmye türünde ilk defa yapılan cinsiyet analizleri sonucunda erkek ve dişi bireyler arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak odun dışı orman ürünleri, her ülkede olduğu gibi Türkiye için de milli bir servettir. Türkiye günümüzde, defne yaprağı üretici ve tedarikçisi olmasına rağmen; ihraç edilen defne tohumu ve/veya yapraklarının %90'ı doğadan toplanmaktadır. Bu tedarik yönteminin önüne geçmek için bu tür bitkilerde farklı amaca uygun bir şekilde kitlesel üretim teknolojilerinin geliştirilmesi önemlidir. Örneğin; defne yaprağı veya defne yağı elde etmek için genelde dişi bitki tercih edilmekte veya süs bitkisi olarak peyzaj çalışmalarında bitkilere şekil vermenin daha kolay olması açısından erkek bitkilerin yetiştirilmesi, daha avantajlı olmaktadır.

Bu tez çalışmasında flow sitometri analiz yöntemi kullanılarak dioik bitki olan defnede DNA içerik miktarı başarılı bir şekilde belirlenmiş ve bitkinin yaprak örneklerinde cinsiyet belirleme çalışmaları başarılı bir şekilde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara dişi bitkilerin çekirdek DNA içeriği  $7,84\pm 0,10$  pg ve erkek bitkilerin çekirdek DNA içeriği  $7,95\pm 0,13$  pg olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre dişi ve erkek bitkilerin ortalama DNA içerikleri arasında 0.05 düzeyde farklılık görülmüştür. Bu sonuca göre diğer dioik bitkilerde farklı amaçlar için cinsiyet belirleme çalışmalarının kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- A.K. Azkur, M.E. Aslan (2012), “Akış Sitometri ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları”, Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi. 7(1), 59- 66, 2012.
- Aktaş Y. L., Akça H. (2014), Prolin Uygulamasının Defne Fidelerinin Kuraklık Toleransının Uyarılması Üzerine Etkileri, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 35100 Bornova - İzmir, Türkiye
- Andréia, M., Mendonça, C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2010). DNA Content Differences Between Male and Female Chicken ( *Gallus gallus domesticus* ) Nuclei and Z and W Chromosomes Resolved by Image Cytometry The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 58(3), 229–235.
- Anonim (1992). Temel Britanica. Ana Yayıncılık, Cilt: 5, 100s
- Anonim (1997) Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma. Doğal Hayatı Koruma Derneği, İstanbul.
- Anonim (2004). T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, Türkiye Ormanlarında Odun Dışı Ürünler, Ankara.
- Anonim (2013). Defne Ağacına Dönüşebilen Daphne. [www.birgunbiryerde.blogspot.com.tr](http://www.birgunbiryerde.blogspot.com.tr).
- Anonim (2016a) [aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=3&USER=1651](http://aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=3&USER=1651)
- Anonim (2016b). T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, Defne Eylem Planı, 2016
- Anonim (2017a). <http://www.sakli-sifa.com>
- Anonim (2017b). <https://pixabay.com/tr/hindi-harita-iller-co%C4%9Frafya-avrupa-157515/>
- Atalay, A. İ. (2009), Melas ve Defne Yaprığı Karışımının Yonca Silajı Yapımında Kullanımı ve Silaj Kalitesi Üzerine Etkilerin Araştırılması, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş
- Aron, S. (2003). Brood Sex Ratio Determination by Flow Cytometry in Ants, 471–475.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Estimation Of Nuclear DNA Content of Plants by Flow Cytometry. Plant Molecular Biology Reporter, 9: 229-241.

- Ayanoglu, F., Mert A., Kaya A. ve Köse E. (2010). Hatay Yöresinde Doğal Olarak Yetişen Defne (*Laurus nobilis* L.) Bitkisinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi ve Seleksiyonu, Tübitak Proje No: 108O878, 268s, Hatay.
- Aytürk Ö. (2010). Dioik *Laurus nobilis* L. (Defne)'de Eşey Belirlenmesinin Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Bahadırılı, N. P. (2014). Hatay İlinde Doğal Olarak Yetişen Adaçayı (*salvia spp.*) Popülasyonlarının SSR Markörleri İle Karakterizasyonu ve Sitogenetik Analizleri.
- Baktır., İ. (1991). Ağaçlar ve Çalılar, Akdeniz Üniversitesi Yayın No: 39, Akdeniz Üniversitesi Basımevi, Antalya.
- Barcenas, N., Morales-ramos, J. A., & Johnston, J. S. (2008). Sex Determination and Genome Size in *Catolaccus Grandis* ( Burks , 1954 ) ( Hymenoptera : Pteromalidae ), (October).
- Baydar H (2009). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No. 51, 234-235s, Isparta.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, D., (2010). "Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimine Arttırılması Olanakları". Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I, 437-456, 11- 15 Ocak, Ankara.
- Baytop T (1994). Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları, No: 578, Ankara.
- Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün), İstanbul Üniversitesi Yayınları no:3255, 480s.
- Baytöre (2014). Yalova İlinde Farklı Yüksekliklerde Doğal Olarak Yetişen Defne (*Laurus nobilis* L.) Popülasyonlarında Bazı Morfolojik ve Kalite Özellikleri ile Ontogenetik Varyabilitenin Belirlenmesi, Doktora Tezi, NKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ
- Bennett MD, Smith JB (1976). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 274: 227-276.
- Bennett MD, Smith JB (1991). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 334: 309-345.
- Berber, M. (2012). Kabuksuz Çekirdek Kabaklarında (*Cucubita Pepo* L. var *syriaca*)

Işınlanmış Polenle Tozlama Yöntemi Kullanılarak Haploid Üretimi, 102–111.

- Boza A, Altun Z.G. (2013). Defnenin (*Laurus nobilis* L.) Doku Kültürü Yöntemiyle Üretilme Olanakları, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir
- Can P, Balay S N, Özçankaya İ M, Bucak C, Göre E, (2006). Batı Anadolu Bölgesi'nde Defne (*Laurus nobilis* L.)'nin Fungal Hastalık Etmenleri ve Zararlı Böceklerinin Belirlenmesi, Teknik Bülten No:34, 1-2 s, İzmir.
- Capparelli, R., Viscardi, M., Amoroso, M. G., Blaiotta, G., & Bianco, M. (2004). Inter-simple Sequence Repeat Markers and Flow Cytometry for the Characterization of Closely Related *Citrus limon* Germplasms. *Biotechnology Letters*, 26(16), 1295–1299.
- Cavallini A, Natali L, Cionini G, Gennai D (1993). Nuclear DNA Variability Within *Pisum sativum*: Nucleotypic Effects on Plant Growth. *Heredity*, 70: 561-565.
- Cavallo, D., Vitae, R. D. E., Eleuteri, P., & Belterman, R. H. R. (1997). Short Communications, (April), 829–832.
- Ceccarelli, M., Falistocco, E., Cionini, P.G. (1992). Variation of Genome Size and Organization Within Hexaploid *Festuca arundinacea*", *Theor. Appl. Genet.*, 83, 273-278.
- Ceren, Ç. (2012). Altın Çilekte (*Physalis Peruviana*) Kolhisin Uygulamalarının Etkileri
- Cerbah, M., Mortreau, E., Brown, S., Sijak-yakovlev, S., Bertrand, H. and Lambert, C. (2001). "Genome Size Variation and Species Relationships in the Genus *Hydrangea*", *Theor Appl Genet*, 103, 45-51.
- Ceylan A, Özay N (1990). Defne Yaprakların (Folia lauri)'da Ontogenetiksel Kalite Araştırması, E.Ü.Z.F. Dergisi , Cilt: 27, Sayı:3, 71-77s. İzmir
- Ceylan, A. (1996). Tıbbi Bitkiler II. E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayını, Yayın No:481, 306s
- Chooi, W.Y. (1971). "Variation in Nuclear DNA Content in the Genus *Vicia*", *Genetics*, 68,195-211.
- Cucco, M., Lingua, G., Bocchio, D., & Acquarone, C. (2009). Sex identification in the Moorhen (*Gallinula chloropus*) by Flow Cytometry and Morphometric Analysis (*Gallinula chloropus*) by Flow Cytometry,
- Cornejo V. C., Palomino G., Méndez I. and Dirzo R. (2012). Intersexual Comparison of DNA



- Content by Flow Cytometry and Chromosomenumber in Four Dioecious *Chamaedorea* Palms From Mexico, *Caryologia*, 65:4, 263-270
- Costich, D.E., Thomas, R., Meagher, E.J. and Yurkow, A. (1991). "Rapid Means of Sex Identification in *Silene latifolia* by Use of Flow Cytometry" *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 4, 359-370.
- Çimen, B., Yeşiloğlu, T., İncesu, M., Yılmaz, B., & Aka Kaçar, Y. (2016). Bazı Turunçgil Genotiplerinden Tetraploid Bitki Elde Edilmesi. *Derim*, 33(2), 175–188.
- Çolak, A. H., Sorger, F., (2004), *Türkiye Çiçekleri*, Ankara.
- Darlington, C. D. & A. P. Wylie., (1955), *Chromosome Atlas of Flowering Plants*.
- Davis, P. H. (1982). *Flora of Turkey*, Vol. 7, Edinburg Universty Pres, 947p., Edinburg.
- Dolezel J, Göhde W. (1995). Sex Determination in Dioecious Plants *Melandrium album* and *M. rubrum* Using High-Resolution Flow Cytometry
- Duke J A (1987). *CRC Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Pres inc., 677s Florida, U.S.A
- Duke J A, Duke P A K, Judith L, DuCellie J L (2008). *Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible* CRC Press 237-240 s, USA.
- Düzenli A, Karaömerlioğlu D (2012). *Türkiye'de Defne ve Defnecilik*, Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü ISBN:978-605-4610-10-5, 5-8 s, Ankara.
- Ekbiç, İ. E. (2005). Sakız Enginar Çeşidinde Meydana Gelen Dönüşüm Üzerinde Araştırmalar.
- Erden Ü (2005). Akdeniz Defnesi (*Laurus nobilis* L.)'nde Mevsimsel Varyabilite ve Optimal Kurutma Yöntemlerinin Araştırılması, Çukurova Ü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Ertekin ve ark. (2009). Bazı Büyüme Düzenleyicilerin Akdeniz Defnesi (*Laurus nobilis* L.) Fıdanlarının Gelişimi Üzerine Etkileri, Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi, 2009, 9 (2): 171-176
- Falisticco, E. (2009). Presence of triploid cytotypes in the common fig (*Ficus carica* L.). *Genome*, 52(11), 919–25.
- Göker Y, Acar İ (1983). Orman Yan Ürünlerinden (*Laurus nobilis* L.) Akdeniz Defnesi, İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, Cilt: 33, Seri: B, Sayı:1, s: 124-140, İstanbul.
- Gökmen H (1973). *Kapalı Tohumlular (Angiospermae)*, Şark Matbaası, sayfa. 303 Ankara.

- Gülcü Ö. (2016). Bazı Kılçuksuz Brom (*Bromus Inermis* L.) Aksesyonlarının Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Graham MJ, Nickell CD, Rayburn AL (1994). Relationship Between Genome Size and Maturity Group in Soybean. *Theor. Appl.Genet.*, 88: 429-432.
- Heslop-Harrison, J.S. (1995). Flow Cytometry and Genome Analysis, *Probe* 5,14-17.
- Inan, S. (2007). Karpuz (*Citrullus Lanatus* (Thunb.) Matsum Ve Nakai)'da *in vivo* ve *in vitro* Yöntemlerle Tetraploid Bitki elde Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Ü., Adana 2007
- Journal, I., Cepeda-Cornejo, V., Palomino, G., & Méndez, I. (2013). Intersexual Comparison of DNA Content by Flow Cytometry and Chromosome Number in Four Dioecious *Chamaedorea* Palms From Mexico, *7114*(March 2017).
- K. Dalva, Z. Gülbaş, “Akım Sitometri Uygulamaları”, Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji, 44-52, 2005.
- Kanev, M. O., & Muranlı F. D.G.. (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları SAÜ Fen Bilimleri Dergisi 20. Cilt, 1. Sayı, s. 33-38, 2016
- Karaboz, İ., Kayar, E., & Akar, S. (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(2), 1–18.
- Karadeniz, H., (2001). Hatay Bölgesi Defne Yaprığı ve Meyvesi Uçucu Yağının Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri, Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Antakya, 98s.
- Karık ve ark. (2015). Türkiye Defne (*Laurus nobilis* L.) Popülasyonlarının Uçucu Yağ Bileşenleri, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, *Anadolu, J. of Ağrı* 25 (1) 2015, 1 - 16 İzmir
- Kavaklı Ş. (2012). Ege Bölgesi Doğal Defne Populasyonunda Genetik Farklılıkların Belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kaya, M. M. (2010). *Medicago Sativa Subsp. Varia* Popülasyonlarının Ploidi Seviyesinin Flow Sitometri Yöntemiyle Belirlenmesi.

- Kayacık., H. (1963). Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematiği, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, İ.Ü Yayın No: 986, O.F. Yayın No: 93, 152s, İstanbul.
- Kılıç A, Harzemşah H, Kollmannsberger H,Nitz S (2004). Volatile Constituents and Key Odorants in Leaves, Buds, Flowers and Fruits of *Laurus nobilis* L., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:1601-1606.
- Kilis, F. Y. (2013). Allium Türlerinin Islahında Haploidi Tekniğinden Yararlanma Utilization of Haploidy Techniques in Breeding of Allium Species, (November 2016).
- Lewis., Y.S. (1984). Spices and Herbs for The Food Industry , Food Trade Press, Orpington, ISBN: 900379, England
- Longo, L. and Vasapollo, G., (2005), Anthocyanins From Bay (*Laurus nobilis* L.) Berries, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 53(20):8063-8067.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A., & Santos, C. (2007). Nuclear DNA Content Estimations in Wild Olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese Cultivars of *O. europaea* Using Flow Cytometry. Genetic Resources and Crop Evolution, 54(1), 21–25.
- M. Macey (1994). Flow Cytometry Clinical Applications. Blackwell Scientific Publications, Chapter 2.
- Marie Kubalaova, Pavlina Kovaraova, Pavla Suchankova, Jarmila Cihalikova, Jan Bartos, Sergio Lucretti, Nobuyoshi Watanabe, S. F. K. and J. D. (2005). Chromosome Sorting in Tetraploid Wheat and its Potential for Genome Analysis. *Genetics*, 170(2), 823–829.
- Marum, L., Loureiro, J., Rodriguez, E., Santos, C., Oliveira, M. M., & Miguel, C. (2009). Flow Cytometric and Morphological Analyses of *Pinus pinaster* Somatic Embryogenesis. *Journal of Biotechnology*, 143(4), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.08.001>
- Narayan, R.K.J. (1987). “Nuclear DNA Changes, Genome Differentiation and Evolution in *Nicotiana* (*Solanaceae*)”, *Pl Syst Evol*, 157,161-180.
- Ocak (2005). Milli Kütüphane Konferans Salonu, Bildiri Kitabı ANKARA (1)481-501.

- Ohri D (1998). Genome Size Variation and Plant Systematics. *Ann. Bot.*, 82 (Suppl. A.): 750-812.
- Orman ve Su İşleri Bakanlığı (2012).
- Oruç, G. (2012). Kan Portakallarının Bazı Çiçek Tozu Özelliklerinin İncelenmesi ve Clementine × Kan Portakalı Melezlerinin Srap Belirteçleri ile Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Aydın
- Ölmez, F.N. (2004). Farklı Kaynatma Sürelerinde Defneden (*Laurus nobilis* L.) Elde Edilen Renkler ve Bazı Haslık Değerleri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.), 2004, 14(1): 35-40
- Özalp, Z. O., & Ergönül, O. (2015). Asma Islahında Poliploidi Çalışmaları, *14*(2), 103–107.
- Özgüven ve ark. (2005). Tütün Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimi ve Ticareti. TMMOB
- Özhatay, N. M. Koyuncu, S. Atay ve A. Byfield. (1997). Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma, Doğal Hayatı Koruma Derneği, ISBN:975-96081-97, 121 s, İstanbul.
- Özkan H, Tuna M, Arumuganathan K (2003). Non-Additive Changes in Genome Size During Allopolyploidization in the Wheat (*Aegilops-Triticum*) Group. *Journal of Heredity*, 94(3): 260-264.
- P. Pozarowski, J. Grabarek, Z. Darzynkiewicz. (2004). Flow Cytometry of Apoptosis. *Curr Protoc Cell Biol.* 18 (18).
- Pala B (2010). Defne (*Laurus nobilis* L.) Üzerinde Bazı Agroteknik Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Pinar, H., Unlu, M., Bircan, M., Baysal, F., Tuna, G. S., Tuna, M., & Ercisli, S. (2015). Genetic Characterization of Banana Clones Grown in Turkey Based on Nuclear DNA Content and SRAP Markers, 227, 222–227
- Prado, M. J., Rodriguez, E., Rey, L., González, M. V., Santos, C., & Rey, M. (2010). Detection of Somaclonal Variants in Somatic Embryogenesis-Regenerated Plants of *Vitis vinifera* by Flow Cytometry and Microsatellite Markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(1), 49–59.
- Price HJ, Bachmann K (1975). DNA Content and Evolution in the *Microseridinae*. *Am. J.*

- Bot., 62: 262-267.
- Rath, D. (1997). July 8, 1996 October 21, 1996, (97), 795–800.
- Rayburn, A.L., Auger, J.A., Benzinger, E.A. and Hepburn, A.G. (1989). “Detection of Intraspecific DNA Content Variation in *Zea mays* L. by Flow Cytometry”, Journal, Exp, Bot, 40,1179-1183.
- S. Langsrud, G. Sundheim (2000). “Flow Cytometry for Rapid Assessment of Bacterial Viability”, International Biodeterioration & Biodegradation. 36(3), 467-467
- Sarb Y. (2012), Defne (*Laurus nobilis* L.) Bitkisinin Çelikle Çoğaltılması Üzerine Araştırmalar, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Hatay
- Sarı A O, Tutar M, Oğuz B, Bilgiç A, Aksu Y (2010). Defne (*Laurus nobilis* L.)'nin Kültüre Alınma Olanaklarının Araştırılması. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Proje no: TAGEM
- Seçmen, Ö. Y. Gemici, E. Leblebici, G. Görk ve L. Bekat (1995). Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No. 116, 241 s, İzmir.
- Singh KP, Raina SN, Singh AK (1996). Variation in Chromosomal DNA Associated With the Evolution of *Arachis* species. Genome, 39: 890-897.
- Smarda, P., Bures, P., Horova, L., Foggi, B. And Graziano, R. (2008). “Genome Size and GC Content Evolution of *Festuca*, Ancestral Expansion and Subsequent Reduction”, Annals of Botany, 101,421–433.
- Srivastava, S. and Lavania, U.C. (1991). Evolutionary DNA Variation in *Papaver* Genome, Stewart A.V.A, 34,763-768.
- Swift H (1950). The Constancy of Desoxyribose Nucleic Acid in Plant Nuclei. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 36: 643-654.
- Şafak, İ. ve T. Okan. (2004). Kekik, defne ve çam fıstığının üretimi ve pazarlaması, Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü DOA Dergisi, 10: 101-129.
- Şirin U, Tekintaş F.E. (2010), Defne (*Laurus nobilis* L.) Çeliklerinde Adventif Kök Oluşumunun Anatomik ve Histolojik Olarak İncelenmesi, ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 2010; 7(1): 35-41
- Tamura, M., Tao, R., & Sugiura, A. (1995). Regeneration of somatic hybrids from

- electrofused protoplasts of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Plant Science*, 108(1), 101–107.
- Taneli, F. (2007). “ Flow ” Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı  
Methodology of Flow Cytometry and Its Role in Clinical Laboratory, 5(2), 75–82.
- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M (2007). Farmasötik Botanik Ankara Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesi Yayınları No:93 207-208s Ankara
- Teykin, E. E. (2011). Flow Sitometri İle *Bromus catharticus Vahl* Aksesyonlarının Çekirdek  
DNA İçeriklerinin Belirlenmesi.
- Toroğlu S, Çenet M (2006). Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve  
Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. KSÜ Fen ve  
Mühendislik Dergisi, 9(2), 18s
- Tuna, M., Vogel, K.P., Arumuganathan, K. and Gill, K.S. 2001. “DNA content and ploidy  
determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry”, *Crop Sci.*,  
41,1629-1634.
- Tuna, M. (2014). Flow Sitometri Ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Prof . Dr . Metin  
Tuna, 1–24.
- Tuna, S. G. (2014). *Brachypodium distachyon* ( L.) P. Beauv.’Da Morfolojik ve Moleküler  
Karakterizasyon, Fen Bilimleri Enstitüsü, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Tümen İ (2010). Tıbbi bitkilerin Ekonomik Değeri. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, İstanbul,  
123s.
- Vagera, J., Paulíková, D. and Doležel, J. 1994. “The Development of Male and Female  
Regenerants by In Vitro Androgenesis in Dioecious Plant *Melandrium album*”,  
*Annals of Botany*, 73(4): 455-459.
- Verma, S.C. and Rees, H. 1974. “Nuclear DNA and the evolution of allotetraploid Brassica”,  
*Heredity*, 33,61-68.
- Vogel, P.K., Arumuganathan, K. and Jensen, K.B. 1999. “Nuclear DNA content of perennial  
grasses of the Triticeae”, *Crop Sci*, 39,661-667.

- Yağcıoğlu, A., 1999, Defne Yapradıının (*Laurus nobilis* L.) Farklı Kurutma Havası Koşullarındaki Kuruma Özellikleri. E.Ü. Araştırma Fonu, 97-ZRF.- 27 No'lu Araştırma Projesi Kesin Sonuç Raporu, İzmir, 59s.
- Yaltırık, F. 1981. Dendroloji-1: Orman ve Parklarımızdaki Bazı Yapraklı Ağaç ve Çalıların Kışın Tanınması, İ.Ü Yay. No. 2842, O.F. Yay. No. 299, İstanbul.
- Yazıcı, H., 2002, Batı Karadeniz Bölgesinde Yetişen Defne (*Laurus nobilis* L.) Yaprak ve Meyvelerinden Faydalanma İmkanlarının Araştırılması. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bartın, 309s.
- Yener, Ş., 2012 İstanbul'da Peyzaj Düzenlemelerinde Kullanılan Odunsu Bitkiler Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı, İstanbul
- Zeybek, U. ve Zeybek, N., 2002, Farmasötik Botanik, Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Bornova, İzmir, 436s.

## 8. EKLER

### 8.1.EK 1

Defnenin dişi ve erkek bitkilerinden alınan yaprak örneklerinin çekirdek DNA içerikleri

NO	LOKASYON	Enlem	Boylam	Dişi <i>Laurus nobilis</i> L.'in Çekirdek DNA İçerikleri (Pikogram)	Erkek <i>Laurus nobilis</i> L.'in Çekirdek DNA İçerikleri (Pikogram)
1	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,70	7,92
2	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,78	7,95
3	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,79	7,87
4	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,67	7,77
5	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,89	7,81
6	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,87	8,01
7	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,79	7,81
8	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,74	7,77
9	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,87	7,81
10	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,85	7,84
11	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,78	8,01
12	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,87	7,86
13	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,93	7,84
14	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,8	7,88
15	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,88	7,99
16	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,86	7,90
17	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,86	7,82
18	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,91	8,08
19	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,71	7,81
20	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,61	8,07
21	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,78	8,02
22	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	7,86	7,82
23	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	-	7,86
24	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	-	7,97



25	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	-	7,82
26	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	-	7,96
27	Çanakkale /Merkez	40°09'04.0"N	26°24'20.9"E	-	7,98
28	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	7,94	7,97
29	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	7,98	8,10
30	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	8,00	-
31	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	8,13	-
32	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	7,78	-
33	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	7,89	-
34	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	7,78	-
35	İstanbul/ Güngören	41°00'59.5"N	28°52'02.5"E	7,94	-
36	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,97	7,74
37	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,81	8,02
38	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,65	7,93
39	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,93	8,13
40	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,92	8,10
41	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,99	8,17
42	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,95	8,18
43	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,85	-
44	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,73	8,13
45	Antalya/ Muratpaşa	36°52'06.2"N	30°43'08.4"E	7,86	8,25
46	Tekirdağ/ Değirmenaltı	40°59'07.2"N	37°35'06.3"E	-	7,82
47	Tekirdağ/ Değirmenaltı	40°59'07.2"N	37°35'06.3"E	-	7,95
48	Tekirdağ/ Değirmenaltı	40°59'07.2"N	37°35'06.3"E	-	8,34
49	Tekirdağ/ Değirmenaltı	40°59'07.2"N	37°35'06.3"E	-	8,00
50	Tekirdağ/ Değirmenaltı	40°59'07.2"N	37°35'06.3"E	-	7,96
<b>TOPLAM</b>				<b>40</b>	<b>43</b>

## ÖZGEÇMİŞ

Aslen İğdırlı olup Azeri kökenli olan Elçin PARLAR 1989 yılında İstanbul'da doğdu. İlkokul ve lise eğitimini İstanbul Bahçelievler'de aldı. 2008 yılında Atatürk Üniversitesi Oltu Meslek Yüksek Okulu Gıda Teknolojisi Bölümünü kazandı. 2010 yılında Gıda Teknolojisi Bölümünü bitirip aynı yıl içerisinde Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünü kazandı. 2010–2011 yıllarında arasında üniversitede bir yıl boyunca İngilizce hazırlık dersleri aldı ve 2015 yılında Tarımsal Biyoteknoloji bölümünden mezun oldu. Mezun olduğu yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Anabilim dalında başladığı Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.