

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

***Usnea florida* (L.) WEBER EX F.H. WIGG TOTAL EKSTRAKTININ ALLELOPATİK
VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEVSER YILMAZ

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. EMEL SÖZEN

BİLECİK, 2022

10441065

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

***Usnea florida* (L.) WEBER EX F.H. WIGG TOTAL EKSTRAKTININ ALLELOPATİK
VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEVSER YILMAZ

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. EMEL SÖZEN

BİLECİK, 2022

10441065

BEYAN

'*Usnea florida* (L.) Weber Ex F.H. Wigg total ekstraktının allelopatik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi' adlı yüksek lisans tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	X
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;.....			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:		/.....	

Kevser Yılmaz

Tarih

İmza

ÖN SÖZ

Yüksek lisans çalışmam süresince maddi ve manevi her konuda bilgi, tecrübe ve desteklerini benden esirgemeyen, çalışmamı sahiplenerek takip eden çok değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Emel SÖZEN'e katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamda liken materyal temininde yardımcı olan Prof. Dr. Mehmet CANDAN'a, tohum çimlendirme işlemlerinde deneyimlerini paylaştan Dr. Öğr. Üyesi Gülçin IŞIK'a ve liken asidi ekstraksiyonu sırasında bana laboratuvarını açan Doç. Dr. İlker AVAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca her konuda beni destekleyen, her zaman yanımda olan çok değerli annem Zeliha YILMAZ'a, babam Halil YILMAZ'a ve ablam Elif Penbe YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tanıştığım günden itibaren her konuda bana destek olan değerli arkadaşım Sema ZENGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Kevser YILMAZ

2022

ÖZET

***Usnea florida* (L.) WEBER EX F.H. WIGG TOTAL EKSTRAKTININ ALLELOPATİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Tarımsal üretimde kendiliğinden yetişen ve verimi oldukça düşüren yabancı otlarla uzun yıllardır mücadele edilmektedir. Yabancı otlarla mücadelede kimyasal ürünlerin kullanımı nedeniyle birçok çevresel sorun açığa çıkmaktadır. Kimyasal ürünlere alternatif olarak çeşitli canlılardan elde edilen doğal ekstraktların biyoherbisit olarak kullanılması önem kazanmıştır. Mantar ve alglerin bir araya gelmesiyle simbiyotik ortaklık sonucu oluşan likenlerden elde edilen doğal ekstraktların antifungal, antimikrobiyal, antigenotoksik, sitotoksik ve allelopatik özellikler gibi biyolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada ülkemizde bulunan ve “sakal likeni” olarak bilinen *Usnea florida* (L.) likeninin total aseton ekstraktının bazı bitki türlerinde tohum çimlenmesi üzerindeki etkilerinin ve olası genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Usnea florida* liken türünden elde edilen aseton ekstraktının farklı konsantrasyonları yabancı ot türlerinden; *Amaranthus retroflexus* (horozibiği), *Portulaca oleracea* (semizotu), *Setaria verticillata* (yapışkan ot) ve kültür bitkisi türü olan *Triticum aestivum* (buğday) tohumlarına uygulanmıştır. Genotoksik etkilerin belirlenmesi için PCR tabanlı moleküler belirteç yöntemleri olan ISSR ve RAPD-PCR kullanılmıştır. Sonuç olarak, liken total aseton ekstraktı uygulanan yabancı otlar ve kültür bitkisi tohum çimlenmesi üzerinde konsantrasyona bağlı olarak allelopatik ve genotoksik etkilerin olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca *Usnea florida* total aseton ekstraktının biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli yabancı ot türüne göre değişim göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Usnea florida*, Tohum Çimlenmesi, Allelopati, Genotoksisite, ISSR ve RAPD-PCR, Biyoherbisit.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ALLELOPATHIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF *Usnea florida* (L.) WEBER EX F.H. WIGG TOTAL EXTRACT

In agricultural production, weeds that grow spontaneously and reduce the yield considerably have been struggled for many years. Many environmental problems arise due to the use of chemical products in the fight against weeds. As an alternative to chemical products, the use of natural extracts obtained from various living things as bioherbicides has gained importance. It is known that natural extracts obtained from lichens, which are formed as a result of symbiotic partnership with the combination of fungi and algae, show biological activities such as antifungal, antimicrobial, antigenotoxic, cytotoxic and allelopathic properties. In this study, it was aimed to determine the effects of total acetone extract of *Usnea florida* (L.) lichen, known as “beard lichen”, on seed germination and potential genotoxic effects in some plant species. Different concentrations of acetone extract obtained from the *Usnea florida* lichen species were applied to the seeds of the weed species *Amaranthus retroflexus* (redroot pigweed), *Portulaca oleracea* (common purslane), *Setaria verticillata* (bristly foxtail) and the cultivar *Triticum aestivum* (wheat). ISSR and RAPD-PCR, which are PCR-based molecular marker methods, were used to determine the genotoxic effects. As a result, it was revealed that lichen total acetone extract had allelopathic and genotoxic effects on weeds and cultivated plant seed germination depending on the concentration. The potential for use of *Usnea florida* total acetone extract as a bioherbicide varied according to the weed species.

Keywords: *Usnea florida*, Seed Germination, Allelopathy, Genotoxicity, ISSR and RAPD-PCR, Bioherbicide.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Likenler.....	2
1.1.1. Liken Sekonder Bileşikleri.....	2
1.1.2. Liken Sekonder Bileşiklerinin Kullanım Alanları ve Biyolojik Aktiviteleri	4
1.2. Allelopati.....	5
1.2.1. Allelokimyasal Maddeler.....	5
1.2.1.1. Fenolik Bileşikler	6
1.2.1.2. Usnik Asit ve Liken Metabolitleri.....	6
1.2.1.3. Flavanoidler	6
1.2.1.4. Alkaloidler.....	6
1.2.1.5. Kumarinler	6
1.2.1.6. Tanenler	6
1.2.1.7. Terpenoidler ve Steroidler.....	7
1.2.2. Allelokimyasalların Salınma Yolları.....	7
1.2.3. Allelopati Oluşumunu Etkileyen Faktörler	7
1.2.4. Allelokimyasalların Etki Şekilleri	7
1.2.5. Biyolojik Mücadelede Allelopatinin Kullanımı.....	8
1.3. Genotoksisite	9

1.4. Moleküler Belirteçler	10
1.4.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler Belirteçler:	10
1.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Moleküler Belirteçler:	10
2. LİTERATÜR ÖRNEKLERİ.....	15
2.1. Çalışmanın Amacı.....	21
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Çalışmada Kullanılan Liken ve Bitki Örnekleri.....	22
3.2. Liken Ekstraktının Hazırlanması	23
3.3. Çimlendirme Uygulamaları	23
3.4. İstatistiksel Analiz.....	24
3.5. DNA İzolasyonu	24
3.6. DNA Miktar Ölçümü.....	25
3.7. PCR Analizleri	26
3.7.1. ISSR PCR Analizi	26
3.7.2. RAPD PCR Analizi	27
3.7.3 PCR Sonuçlarının Yorumlanması.....	29
4. BULGULAR	30
4.1. Liken Ekstraktının Bitkilerdeki Tohum Çimlenme Üzerine Etkisi.....	30
4.1.1. Liken Ekstraktının <i>Amaranthus retroflexus</i> (Horoziği) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi	30
4.1.2. Liken Ekstraktının <i>Portulaca oleracea</i> (Semizotu) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	32
4.1.3. Liken Ekstraktının <i>Setaria verticillata</i> (Yapışkan Ot) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi	34
4.1.4. Liken Ekstraktının <i>Triticum aestivum</i> (Buğday) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	36
4.2. DNA İzolasyonu Sonucu DNA Miktar ve Saflık Ölçümü	38
4.3. ISSR ve RAPD PCR Analizleri	39

4.3.1. <i>Amaranthus retroflexus</i> (Horoziibiği) ISSR ve RAPD PCR Analizleri	39
4.3.2. <i>Portulaca oleracea</i> (Semizotu) ISSR ve RAPD PCR Analizleri	50
4.3.3. <i>Setaria verticillata</i> (Yapışkan Ot) ISSR ve RAPD PCR Analizleri	62
4.3.4. <i>Triticum aestivum</i> (Buğday) ISSR ve RAPD PCR Analizleri	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	86
KAYNAKÇA	96



TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. 2X CTAB tamponu (50 ml) bileşenleri.....	24
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ISSR primerlere ait bilgiler	26
Tablo 3.3. ISSR PCR bileşenleri	26
Tablo 3.4. ISSR PCR döngü koşulları.....	26
Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan RAPD primer listesi	27
Tablo 3.6. RAPD PCR bileşenleri	27
Tablo 3.7. RAPD PCR Döngü Koşulları.....	27
Tablo 4.1. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>A. retroflexus</i> tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata).....	31
Tablo 4.2. Liken ekstraktının <i>A. retroflexus</i> tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları ($p<0,05$)..	31
Tablo 4.3. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>P. oleracea</i> tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata).....	32
Tablo 4.4. Liken ekstraktının <i>P. oleracea</i> tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları ($p<0,05$)..	33
Tablo 4.5. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>S. Verticillata</i> tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata).....	34
Tablo 4.6. Liken ekstraktının <i>S. verticillata</i> tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları ($p<0,05$)..	35
Tablo 4.7. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>T. aestivum</i> tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata).....	36
Tablo 4.8. Liken ekstraktının <i>T. aestivum</i> tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları ($p<0,05$)..	37
Tablo 4.9. Yabani otlardan ve kültür bitkisinden izole edilen DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları	38
Tablo 4.10. <i>A. retroflexus</i> bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri....	49
Tablo 4.11. <i>P. oleracea</i> bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri.....	61

Tablo 4.12. *S. verticillata* bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri.... **73**

Tablo 4.13. *T. aestivum* bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri..... **85**



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Liken sekonder bileşiklerinin biyosentez yolları	3
Şekil 1.2. PCR döngü aşamaları.....	11
Şekil 3.1. Liken <i>Usnea florida</i> genel görünümü	22
Şekil 3.2. Liken ekstraktının eppendorflara aktarılması	23
Şekil 3.3. Thermo GeneRuler 100 bç DNA Ladder Plus.....	28
Şekil 4.1. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>A. retroflexus</i> tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)	30
Şekil 4.2. <i>A. retroflexus</i> ortalama çimlenme yüzdesi grafiği	31
Şekil 4.3. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>P. oleracea</i> tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)	32
Şekil 4.4. <i>P. oleracea</i> ortalama çimlenme yüzdesi grafiği	33
Şekil 4.5. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>S. verticillata</i> tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)	34
Şekil 4.6. <i>S. verticillata</i> ortalama çimlenme yüzdesi grafiği	35
Şekil 4.7. <i>Usnea florida</i> aseton ekstraktının <i>T. aestivum</i> tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)	36
Şekil 4.8. <i>T. aestivum</i> ortalama çimlenme yüzdesi grafiği	37
Şekil 4.9. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının ISSR 810 ve 813 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	39
Şekil 4.10. ISSR-PCR 810 primerinden oluşan dendogram	40
Şekil 4.11. ISSR-PCR 813 primerinden oluşan dendogram	41
Şekil 4.12. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının ISSR 812 ve 815 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	42
Şekil 4.13. ISSR-PCR 812 primerinden oluşan dendogram	43

Şekil 4.14. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendogram	44
Şekil 4.15. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının RAPD OPA2 ve D11 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	44
Şekil 4.16. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendogram	45
Şekil 4.17. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendogram	46
Şekil 4.18. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının RAPD PM3 ve PM10 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	47
Şekil 4.19. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendogram	48
Şekil 4.20. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendogram	49
Şekil 4.21. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının ISSR 812 ve 813 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	50
Şekil 4.22. ISSR-PCR 812 primerinden oluşan dendogram	51
Şekil 4.23. ISSR-PCR 813 primerinden oluşan dendogram	52
Şekil 4.24. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının ISSR 814 ve 815 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	53
Şekil 4.25. ISSR-PCR 814 primerinden oluşan dendogram	54
Şekil 4.26. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendogram	55
Şekil 4.27. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının RAPD OPA2 ve D11 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	55
Şekil 4.28. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendogram.....	56
Şekil 4.29. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendogram	57
Şekil 4.30. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının RAPD PM3 ve PM10 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	58

Şekil 4.31. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendogram	59
Şekil 4.32. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendogram	60
Şekil 4.33. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının ISSR 810 ve 813 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	62
Şekil 4.34. ISSR-PCR 810 primerinden oluşan dendogram	63
Şekil 4.35. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının ISSR 815 ve 814 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	64
Şekil 4.36. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendogram	65
Şekil 4.37. ISSR-PCR 814 primerinden oluşan dendogram	66
Şekil 4.38. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının RAPD D11 ve OPA2 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	67
Şekil 4.39. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendogram	68
Şekil 4.40. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendogram.....	69
Şekil 4.41. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının RAPD PM3 ve PM10 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri.....	70
Şekil 4.42. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendogram	71
Şekil 4.43. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendogram	72
Şekil 4.44. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen buğday bitki DNA'larının ISSR 812 ve 815 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri	74
Şekil 4.45. ISSR-PCR 812 primerinden oluşan dendogram	75
Şekil 4.46. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendogram	76
Şekil 4.47. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen buğday bitki DNA'larının ISSR 813 ve 814 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri	77
Şekil 4.48. ISSR-PCR 813 primerinden oluşan dendogram	78

Şekil 4.49. ISSR-PCR 814 primerinden oluşan dendogram	79
Şekil 4.50. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen buğday bitki DNA'larının RAPD PM3 ve OPA2 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri	80
Şekil 4.51. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendogram	81
Şekil 4.52. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendogram	81
Şekil 4.53. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen buğday bitki DNA'larının RAPD PM10 ve D11 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri	82
Şekil 4.54. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendogram	83
Şekil 4.55. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendogram	84



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- AFLP:** Amplifiye parça uzunluk polimorfizmi
- CTAB:** Cetyltrimethylammonium bromide
- DNA:** Deoksiribonükleik asit
- EDTA:** Etilendiamin tetraasetik asit
- GKS:** Genomik kalıp stabilitesi
- ISSR:** Basit dizi tekrarları arası polimorfizm
- MgCl₂:** Magnezyum klorür
- NaCl:** Sodyum klorür
- PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu
- PVP:** Polyvinil pyrodine
- RAPD:** Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
- RFLP:** Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
- SSR:** Basit dizi tekrarları
- TBE:** Tris borik asit EDTA
- mbar:** Milibar
- mg:** Miligram
- ml:** Mililitre
- ng:** Nanogram
- nm:** Nanometre
- rpm:** Dakikadaki devir sayısı
- µg:** Mikrogram
- µl:** Mikrolitre
- µM:** Mikromolar

1.GİRİŞ

Dünya genelinde nüfusun artması nedeniyle günümüz sorunlarından biri de tarım alanlarından olabildiğince yüksek oranda ve kalitede ürün almak için bitki üretiminde kullanılan kimyasal maddelerdir. Tarım alanlarının giderek azalması ve bu sebeple mevcut alanlardan en verimli şekilde yararlanabilmek amacıyla her türlü zarar verici etmene karşı kullanılan pek çok kimyasal madde bulunmaktadır. Zarar verici etmenlerin başında yabancı otlar gelmektedir. Yabancı otlar istenmeyen yerlerde kendiliğinden yetişirler ve kültür bitkileri ile rekabete girerek, bu bitkilerin büyümelerini önemli miktarda azaltırlar. Yabancı otların sınırlandırılması amacıyla herbisitlerin kullanımı oldukça yaygındır. Herbisit miktarının arttırılması ve kullanımından kaynaklanan hatalar nedeniyle insan sağlığında ve ekosistemde kalıcı hasarlar bırakan sentetik herbisitlerin yabancı otlarla mücadelesi giderek tehlikeli hale gelmektedir. Bu mücadelede, sentetik ürünler yerine doğada kalıcı etki bırakmayan doğal ürünlerin kullanımının araştırılması hem insan sağlığı hem de ekosistem için oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenlerden dolayı ‘allelapati’ çalışmaları dikkat çekmektedir. Rice 1984 yılında allelopatiyi “bir bitkinin diğerini (veya bir mikroorganizmanın diğerini) çevreye saldıgı kimyasal bileşiklerle dolaylı olarak veya doğrudan zararlı ya da yararlı olarak etkilemesi” şeklinde tanımlamıştır (Chou, 2006: 1). Salgılanan kimyasal maddeler allelokimyasal maddeler olarak isimlendirilmektedir.

Allelokimyasalların üretiminden sonra biyolojik parçalanma süreleri oldukça kısa olduğu için çevreye zarar vermeyerek sağlık açısından olumsuz bir durum oluşturmamaktadır (Topal, 2011: 23). Allelopati çalışmaları yabancı otlar ve kültür bitkileri üzerinde bitkisel üretim açısından etki mekanizmaları ortaya konularak çalışılmaktadır. Araştırmalar genel olarak bazı kültür bitkileri ile yabancı otlar arasında gerçekleşmiştir. Ancak allelopatik etkinin sadece bitkiler arasında olmadığı bitkilerin; bakteri, fungus, liken gibi canlılardan da allelopatik olarak etkilendiği ortaya çıkmıştır.

Likenlerin birçok alanda kullanıldığı bilinmektedir. Ürettikleri sekonder bileşikler; antimikobakteriyel, antiviral, antiproliferatif, antienflamatuvar, analjezik, antikanser, antigenotoksik, antifungal, sitotoksik ve allelopatik özellikler gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedir (Bhattacharyya vd., 2016: 29). Bu biyolojik aktivitelerin tarımsal üretimde zarar verici etmenlere karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (Kalra vd., 2021: 779). Sentetik herbisitlerin yıkıcı etkisine karşı likenlerin ürettiği doğal bileşiklerin biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli taşıdığı çeşitli araştırmalarla gösterilmektedir (Dayan ve Romagni, 2001: 232).

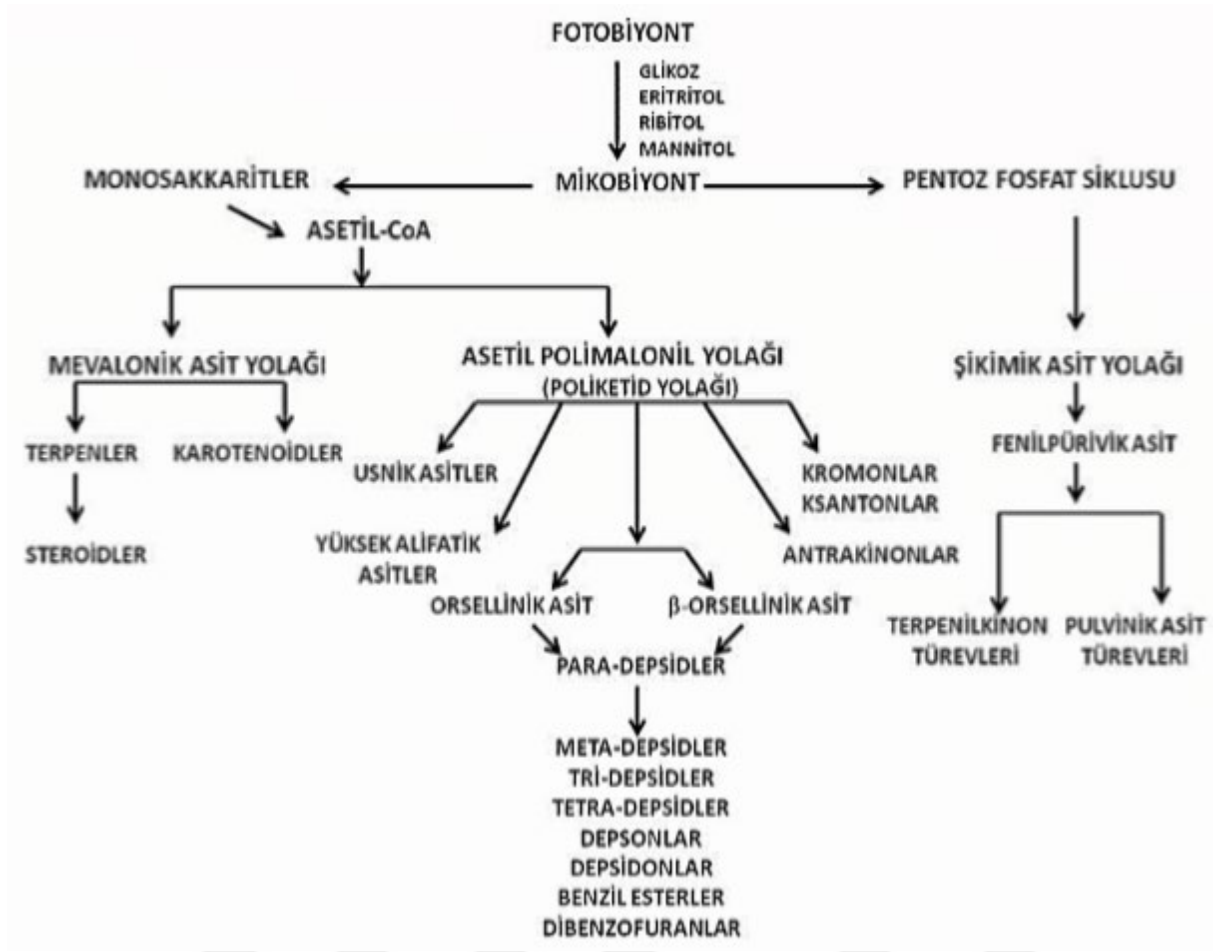
1.1. Likenler

Likenler, mantar ile alg veya siyanobakteri birlikteliğiyle tek bir tallus oluşturmak üzere bir araya gelen simbiyotik ortaklıktır. Likenin mantar ortağına mikobiyont, fotosentetik ortağına (siyanobakteri veya alg) fotobiyont adı verilir. Mikobiyont bileşeni; tallusun ihtiyacı olan su, CO₂, mineral gibi maddelerin ulaşımından sorumludur. Fotobiyont bileşeni ise klorofil yoluyla ürettiği organik maddeleri ve oksijeni tallusa ulaştırmaktadır (Cansaran Duman, 2008: 44). Liken birlikteliğindeki mantar ortağı likenin büyük bir kısmını oluşturması nedeniyle likenler mantarların bir yaşam formu olarak Fungi aleminde sınıflandırılmaktadır (Boustie ve Grube, 2005: 273). Likenler çok çeşitli ekstrem şartlarda yaşamlarını sürdürerek çoğalabilmektedir (Işık, 2021: 4). Karasal bölgelerden sucul bölgelere kadar mikobiyont ve fotobiyont ortaklarının tek başına büyümediği yerlerde bile gelişim gösterirler.

1.1.1. Liken Sekonder Bileşikler

Likenler çeşitli biyolojik maddeler sentezlemektedirler ve bu maddelerin çoğu likenin mikobiyont ortağına özgüdür (Thakur ve Changer, 2021: 40). Sentezlenen ürünler primer ve sekonder bileşikler olarak isimlendirilmektedir. Primer bileşikler diğer canlılarda da bulunan; karbonhidrat, protein, lipit gibi yapısal olarak üretilen bileşiklerdir. Çoğu suda çözünebilir ve ekstrakte edilebilir bileşiklerdir (Levent Kolukısa, 2019: 6). Sekonder bileşikler ise görevleri tam olarak bilinmemekle beraber; savunma, hayatta kalma, adaptasyon gibi süreçlerde sentezlenen bileşiklerdir (Çobanoğlu Özyiğitoğlu vd., 2016: 151). Sudaki çözünürlüğü düşük bileşiklerdir ve organik çözücülerde ekstrakte edilirler (Goga vd., 2020: 182). Üretilen sekonder bileşikler genel olarak asit özellikte olmaları nedeniyle 'liken asitleri' olarak isimlendirilmektedir. Asit özellikleri sayesinde kayaları eritip parçalayarak toprak oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Kayalık ortamların bitkiler tarafından kaplanmasında ve örtülmesinde öncül canlılar olduklarından ekolojik öneme sahiptirler.

Likenin mikobiyont ortağı olan mantar, siyanobakteri veya alg ortağının ürettiği karbonhidratı kullanarak Pentoz Fosfat Yolu veya Glikoliz döngülerine (Şekil 1.1.) girerek sekonder bileşiklerin sentezlenmesini sağlar (Shukla vd., 2014: 27). Liken sekonder bileşiklerinin çoğu likenin mantar ortağına özgü olup, Asetil Polimalonil (Poliketid), Mevalonik Asit ve Şikimik Asit Yolağı olmak üzere üç sentez mekanizması mevcuttur (Kalra vd., 2021: 775).



Şekil 1.1. Liken sekonder bileşiklerinin biyosentez yolları

Kaynak: (Çobanoğlu Özyiğitoğlu vd., 2016: 153)

Asetil Polimalonil (Poliketid) Yolağı: Liken sekonder bileşiklerinin çoğu Poliketid yoluyla sentezlenmektedir. Başlıca; depsid, depsidon, dibenzofuran sınıfına ait olan bu bileşikler, mantar ortağı tarafından sadece alglerle eşleştirildiğinde üretilmektedir (Shukla vd., 2010: 304). Poliketid yolağında Malonil-CoA ve Asetil-CoA molekülleri birleşerek ana zinciri oluştururlar (Çobanoğlu Özyiğitoğlu vd., 2016: 153). Bileşiklerin bir kısmı iki veya üç orcinol veya β -orcinol moleküllerinin ester, eter ve C-C bağlarının oluşmasıyla üretilir (Ranković ve Kosanić, 2019: 9). Asetil polimalonil yolağındaki bileşiklerin yapısal yolları tam olarak netleşmemiştir, bu nedenle sıklıkla karşılaşılan birçok kimyasal yapıya ortak isimler verilmektedir (Shukla vd., 2014: 28).

Mevalonik Asit Yolağı: Sekonder bileşiklerin az bir bölümü bu yolakla sentezlenir. Özellikle terpenlerin sentezinde bu yolak etkilidir (Thakur ve Changer, 2021: 41). Bu yolla üretilen diğer bileşiklerin içinde karoten, steroller ve triterpenlerde bulunmaktadır (Ranković ve Kosanić, 2019: 14). Mevalonik asit yoluyla üretilen bileşiklerin bir kısmı diğer canlılarda üretilenlerle ortaktır (Çobanoğlu Özyiğitoğlu vd., 2016: 154).

Şikimik Asit Yolağı: Bu sentez yolağı, mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından kullanılır (Goga vd., 2020: 200). Oluşan liken bileşikleri pulvinik asit ve terfenilkinondur, bileşikler fenilpirüvik asidin füzyonuyla üretilir (Shukla vd., 2010: 304). Likenlerdeki en yaygın olan sarı renkli pigment bu yolak sonucunda üretilir (Shukla vd., 2014: 28) ve Stictaceae familyasının büyük bölümünü oluşturur (Thakur ve Changer, 2021: 40).

1.1.2. Liken Sekonder Bileşiklerinin Kullanım Alanları ve Biyolojik Aktiviteleri

Ürettikleri bileşiklerle birçok etkiye sahip olduğu bilinen likenlerin çeşitli alanlarda kullanıldığı bilinmektedir (Tigre vd., 2012: 125). Likenler ekolojik olarak toprak ve bitki örtüsünün oluşumunda öncülük etmektedir (Cansaran Duman, 2008: 44). Ekonomik olarak geçmişte Yunanlılar tarafından boya maddesi olarak kullanılmıştır, günümüzde ise bu alanda liken kullanımı giderek azalmıştır. Parfüm ve kozmetik sanayisinde geçmişten günümüze halen kullanımı devam etmektedir (Elix ve Stocker Wörgötter, 2008: 132-133). Likenler ayrıca hava kirliliğinin ne derecede olduğunun belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Cansaran Duman, 2008: 44). Yoğun radyasyona karşı etkili olduğu (Molnar ve Farkas, 2010: 157) ve bazı liken türlerinin UV-B radyasyonunu absorbe ederek iç kısımdaki alg tabakasını koruduğu bilinmektedir (Shukla vd., 2010: 310).

Likenler tıp alanında önemli yere sahiptir. Geçmişte yaygın olarak yaraların, cilt bozukluklarının, solunum ve sindirim rahatsızlıklarının tedavisinde birçok kez kullanılmıştır (Crawford, 2019: 36). Son yıllarda ise biyoteknoloji alanında ve hastalıkların tedavisinde likenlerden elde edilen doğal bileşiklerden yararlanmak amacıyla çalışmalar artmıştır (Şekerli vd., 2017: 95).

Likenlerin ürettiği sekonder bileşiklerin çok çeşitli biyolojik aktiviteleri yapılan araştırmalarla her geçen gün daha fazla açığa çıkarılmaktadır. Likenlerden elde edilen ekstraktlar; antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral, antikanser, antioksidan, anti-inflamatuar (Thakur ve Changer, 2021: 41), sitotoksik (Boustie ve Grube, 2005: 273) ve allelopati (Bhattacharyya vd., 2016: 34) gibi farklı alanlarda biyolojik aktiviteler göstermektedir.

1.2. Allelopati

Allelopati kelimesi Eski Yunanca allelon (bir diğetine) ve pathos (zarar vermek) kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur. Allelopati terimi ilk kez Molisch tarafından 1937 yılında ortaya atılmış ve allelopatiyi “bitkiler veya mikroorganizmalar arasındaki olumlu veya olumsuz etkileşimler” olarak tanımlamıştır (Chou, 2006: 1).

1996'da Uluslararası Allelopati Derneği, allelopatiyi: “Tarımsal ve biyolojik sistemlerin büyümesini ve gelişmesini etkileyen, pozitif ve negatif etkiler dahil olmak üzere bitkiler, mikroorganizmalar, virüsler ve mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitleri içeren bir süreç” olarak tanımlamaktadır (Kruse vd., 2000: 7). Allelopati; ototoksidite ve heterotoksidite olmak üzere iki şekilde oluşmaktadır. Ototoksidite, bitkinin üretmiş olduğu kimyasal maddenin aynı türden bitkiyi negatif olarak etkileme durumudur. Heterotoksidite ise başka türden bitkilerin negatif yönde etkilenme durumudur (Temel ve Tan, 2004: 105). Allelopati özellikle bazı bitkilerin tipik özelliğidir. Allelopatik ilişkiler bitki topluluklarında belirli türlerin dağılımı ve yoğunluk oluşturmada önemli bir faktördür.

1.2.1. Allelokimyasal Maddeler

Allelopatik etki, bitkilerin üretmiş olduğu bazı kimyasal maddeler sayesinde gerçekleşmektedir. Üretilen kimyasal maddelere ‘allelokimyasal’ denilmektedir. Allelokimyasal maddeler diğer bitkilerin büyümesine ve gelişmesine müdahale etmektedir (Pezikoğlu, 2008: 361). Çoğu istilacı türün başarısında oldukça önemli yere sahip olan allelokimyasallar; yaprak, sap, rizom, kök, çiçek, meyve ve tohum gibi bitkinin dokularında bulunmaktadır. Allelokimyasallar diğer canlılara doğrudan iletilebildiği gibi toprakta bazı değişimlere uğradıktan sonra da iletilmektedir.

Allelokimyasalların üretiminden sonra biyolojik parçalanma süreleri oldukça kısa olduğu için çevreye zarar vermeyerek sağlık açısından olumsuz bir durum oluşturmamaktadır (Topal, 2011: 24). Bu sebeple allelopati çalışmaları her geçen gün artmaktadır, özellikle yabancı otlara karşı kullanılan kimyasalların çevreye ve insan sağlığına zararı bilinmektedir. Allelopati sonucunda üretilen allelokimyasalların, herbisit toksisitesine karşı kullanılması için çalışmalar farklı organizmalarda yapılmaktadır.

Allelokimyasalların çoğu primer (ana) metabolik yolun yan ürünü olarak üretilen sekonder (ikincil) bileşiklerdir. Yapılan araştırmalarda bitki ve mikroorganizmalardan elde edilen olası 400.000 sekonder metabolitin sadece yaklaşık %3'ünün tanımlandığı tahmin edilmektedir (Narwal ve Haouala, 2013: 241).

Tanımlanan sekonder metabolitlerden bazıları; fenolik bileşikler, usnik asit ve liken bileşikleri (Macias vd., 2007: 331), flavanoidler, alkaloidler, kumarinler, tanenler, terpenoidler ve steroidlerdir (Arıkan ve Elibüyük, 2015: 47).

1.2.1.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler birçok sekonder bileşikler kapsayan sınıftır. Bitkide büyüme, gelişme, streslere karşı yanıt oluşturmada görev almaktadırlar. Özellikle sinamik asitler, basit fenoller, benzoik asitler ve klorojenik asit gibi çeşitli türevleri bulunmaktadır. Kumarinler ve tanenler polifenolik grubunda yer alırlar ve allelopatide rol oynamaktadırlar (Einhellig, 2004: 218).

1.2.1.2. Usnik Asit ve Liken Metabolitleri

Likenlerde bol miktarda bulunan usnik asit antiherbivor, antibiyotik, antifungal aktivitelere sahiptir. Ayrıca, antrakinonlar ve emodinler fitotoksik aktiviteye sahiptirler (Macias vd., 2007: 331).

1.2.1.3. Flavanoidler

Flavonlar, flavonoller, kalkonlar ve kateşinler grubu; tozlaşma, renk oluşumunda ve hastalıklara karşı direnç mekanizmasında rol oynamaktadır (Macias vd., 2007: 330).

1.2.1.4. Alkaloidler

Protein biyosentezinin engellenmesi, membran geçirgenliğinin üzerindeki etkisi gibi biyolojik aktiviteye sahiptirler. Ayrıca geçmişten günümüze; boyaların (indigo, shikonin), aromaların (vanilin, kapsaisin), zehirlerin (akonitin, striknin) içeriğini oluşturmaktadırlar (Wink, 2004: 184).

1.2.1.5. Kumarinler

Scopoletin, kumarin grubunda en yaygın bulunan sekonder bileşiktir ve mitoz bölünmeyi azalttığı yönde çalışmalar mevcuttur (Einhellig, 2004: 227). Kumarinler günümüzde; sabun yapımında, alkollü içeceklerde ve tütün sanayisinde kullanılmaya devam etmektedir (Tiring vd., 2021: 210).

1.2.1.6. Tanenler

Tannik asidin; serbest yaşayan bakterileri, DNA polimerazı, protein sentezini inhibe ettiği açığa çıkarılmıştır. Ayrıca tanenler otçulluğu sınırlama, hastalık direnci, tohum çürümelerini koruma gibi kimyasal süreçlerde önemli rol oynamaktadır (Einhellig, 2004: 229).

1.2.1.7. Terpenoidler ve Steroidler

Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olan terpenoidler pek çok organizmada mevcut olan sekonder metabolitlerdir. Yabani otlarla mücadelede glukozinolatlar grubu allelopatik etki göstermektedir (Macias vd., 2007: 331-336). Steroidler ise bitki büyüme, gelişme düzenleyicileri olarak görev almaktadırlar (Seigler, 2006: 44).

1.2.2. Allelokimyasalların Salınma Yolları

Allelokimyasal maddeler kendi organizmalarının hücresel işlevlerine zarar vermeden üretilmektedir. Bitkilerde üretilen sekonder bileşikler bitkinin; kök, gövde, yaprak, tohum, çiçek aksamalarında bulunmaktadır. Atmosfere ve rizosfere sekonder bileşiklerin salınma yolları şu şekildedir:

- Buharlaşıma: Bitkilerin terleme yoluyla çeşitli uçucu toksin üretmesiyle ve yağmur yoluyla toprağa karışarak köklerden geçmesi durumudur.
- Toprak üstü organlardan yıkanma: Üretilen sekonder bileşiklerin yağmur veya sis damlaları sayesinde çevreye salınması durumudur.
- Kök salgıları: Bitki köklerinden kimyasalların salgılanıp toprağa geçmesi durumudur.
- Bitki dokularının ayrışması: Bitkilerin ölümünden sonra dokuların parçalanması sonucu bileşik sentezleme durumudur (Arıkan ve Elibüyük, 2015: 47).

1.2.3. Allelopati Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Üretilen allelokimyasallar çevresel koşullara göre de değişiklik gösterebilmektedir. Birçok stres etmenine göre üretilen sekonder bileşiğin türü ve miktarı farklı olabilmektedir (Şişek, 2020: 14). Allelokimyasalları etkileyen etmenler biyotik, abiyotik stres ve diğer canlı etmenler arasında sıcaklık, nem, ışık, besin maddeleri, kuraklık, UV, ağır metal, patojenler, diğer bitkiler ve hayvanlar sayılabilir (Pedrol vd., 2006: 172). Stres faktör çeşidine göre farklılık gösteren allelokimyasalların, türe özgü yanıt verdiği ortaya çıkmıştır, bu durum allelopati konusunda karmaşıklığın artmasına neden olmuştur (Gawronska ve Golisz, 2006: 222).

1.2.4. Allelokimyasalların Etki Şekilleri

Üretilen sekonder bileşikler çevrelerindeki canlıları etkilemeye başlayarak birtakım değişimlere neden olmaktadır. Sekonder bileşikler yüksek dozda engelleyici, düşük dozda uyarıcı olmakla birlikte, başka herhangi bir dozda etki etmeyebilirler (Ambika, 2013: 397).

Yapılan araştırmalar sonucunda allelokimyasallar; replikasyon, protein sentezi, mitoz bölünme (Lotina-Hennsen vd., 2006: 232), membran geçirgenliği, bitki metabolizması, fotosentez, solunum, çiçeklenme, meyve verme, tohumlama (Ambika, 2013: 389) gibi canlının yaşamsal durumuna negatif veya pozitif yönde etki edebilmektedirler. Rizosferde bulunan allelokimyasallar kökteki hücre membran yapısını bozarak organizmanın su ihtiyacının karşılanmasına negatif yönde etki etmektedir. Allelokimyasalın etkilediği bir diğer mekanizma ise fotosentezdir, bitkide elektron taşınmasını ya da karbonhidrat metabolizmasını durdurarak bitkinin fotosentez yapmasına engel olmaktadır (Zhou ve Yu, 2006: 134). Bu etki mekanizmalarının kısmen reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin aktivasyonu ile olduğu öngörülmektedir. Sekonder bileşiklere maruz kalan hücrelerin uyarı niteliğinde ürettikleri ROS, hücrenin ölümü için gerekli mekanizmaların aktivasyonunu sağlar (Ambika, 2013: 402). Sonuç olarak, sekonder bileşikler organizmaların yaşamsal faaliyetlerini durdurabilir ya da daha fazla büyümelerini sağlayabilirler.

1.2.5. Biyolojik Mücadelede Allelopatinin Kullanımı

Tarımsal üretimi etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden akla ilk geleni yabancı otlardır. Yabancı otlar bulundukları çevrede kendiliğinden yetişirler ve diğer türlerin büyümesini engellemektedirler. Bu durumla mücadele etmek için hem maliyet hem de zaman açısından avantajlı gibi görünen herbisitler kullanılmaktadır (Serim vd., 2015: 226). Yabancı otların sınırlandırılması amacıyla kullanılan herbisitlerin yanlış uygulanmasından kaynaklanan hatalar nedeniyle sorunlar ortaya çıkmıştır. Herbisitlerin insan sağlığına ve çevreye etkileri araştırmalarla gösterilmektedir (Mengüç, 2018: 64). Herbisit dozundaki artış hem toprakta hem yetiştirilen ürünlerde toksisiteye sebep olmaktadır, bu durumun sonucunda da satışı yapılan ürünlerin geri gönderilmesi bile söz konusu olmaktadır (Özen vd., 2017: 41). Yabancı otlarla mücadelede çevreye ve insan sağlığına zarar vermeyen yöntemlerin bulunması için çalışmalar hız kazanmıştır.

Kimyasal kullanımı yerine organizmaların kendilerinin üretmiş olduğu doğal bileşiklerden yararlanmak amacıyla allelopatinin yabancı otlarla mücadelede alternatif bir yol olabileceği düşünülmektedir (Novak vd., 2021: 612). Bitkilerin, likenlerin ve mikroorganizmaların ürettiği sekonder bileşikler; bitkiler, böcekler, funguslar ve diğer canlılar için zarar verici olabilmektedir (Pereira Peres vd., 2015: 275). Herbisitlere nazaran çok daha fazla çevre dostudurlar, bileşiğin toprakta ve hedef olmayan organizmalar üzerinde birikme potansiyeli oldukça düşüktür (Soltys vd., 2013: 519). Savunma mekanizması olarak üretilen doğal bileşikler biyolojik mücadelede kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Allelopatik etkisi olan bitkiler biyolojik mücadelede tam olarak etkili olmasa da yabancı ot istilasının en aza indirilmesini sağlamaktadır. Bu bitkilere örnek olarak; arpa, çavdar, mısır, sorgum, buğday, yonca, yulaf, ayçiçeği verilebilir. Kullanılan bu ürünler yabancı ot kontrolünün belirli bir seviyede sabit kalmasında kullanılabilir (Narwall ve Haouala, 2013: 220-242).

Likenlerin ürettiği sekonder bileşiklerin birçok aktivitede rol aldığı bilinmektedir. Liken sekonder bileşikleri; likenlerin, yosunların, alglerin, mikroorganizmaların ve çevrelerindeki bitkilerin gelişimini pozitif ya da negatif yönde etkilemektedir (Thakur ve Changer, 2021: 43). Örneğin; likenler asetil polimalonil yolağı ile otçullara karşı fenolik asitleri üreterek allelopatik etki göstermektedir (Pereira Peres vd., 2015: 275). Usnik asit ve atranorin bileşiklerinin büyüme geriliği, klorofil inhibisyonu gibi bitki canlılığının önemli mekanizmalarını negatif yönde etkilediği ortaya çıkmıştır (Bačkor vd., 2010: 36; Bajpai ve Upreti, 2020: 2). Liken sekonder bileşiklerinden barbatik asit, lekanorin ve tridepsid kloroplastta PSII mekanizmasını inhibe ederek herbisitler gibi davranmaktadır. Emodin ve türevleri ise çimenler üzerinde negatif etkiye sahiptir (Dayan ve Romagni, 2001: 231). Liken sekonder bileşiklerinin birçok alanda etkili olması kompleks bir canlı olduğunu göstermektedir. Sentezlenen sekonder bileşiklerin diğer canlılar üzerindeki etkileri yapılan araştırmalarla ortaya konulmaya devam etmektedir.

1.3. Genotoksisite

Toksikoloji biliminin alt dalı genetik toksikoloji, genomda oluşan hasarların araştırılması esasına dayanır (Young, 2002: 103). DNA, kromozom ve çekirdek yapısında yani genomda çeşitli ajanların meydana getirdiği anormallikler sonucu oluşan toksisiteye genotoksisite denir. Anormallikler; DNA kırıkları, eklemeleri, silinmeleri, gen mutasyonları, kromozom anomalileri gibi hasarlardır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011: 222).

Fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların DNA'ya doğrudan ya da dolaylı yollarla bağlanması neticesinde DNA'da hasarlar oluşmaktadır (Young, 2002: 103). Oluşan hasarlar hücrenin yapısı, madde miktarı ve maddenin çeşidine göre değişmektedir (Akarsu, 2019: 2). DNA hasarlarına UV ışınları, kimyasal maddeler gibi çeşitli ajanlar neden olabilmektedir (Onur vd., 2009: 61).

Genotoksik ajanların genlerde meydana getirmiş olduğu anormallikleri incelemek için tarama testlerinin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (Zhiyi ve Haowen, 2004: 96). Nitekim genotoksik etkilerin araştırılabilmesi için moleküler belirteç adı verilen çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Böylelikle organizmalardaki genom boyutundaki etkiler yeni bir bakış açısıyla incelenebilmektedir.

1.4. Moleküler Belirteçler

Moleküler belirteçler veya DNA belirteçleri, kısa gen bölgelerini içeren DNA parçalarıdır. Genetik diziliş farklılığının ortaya çıkarılmasında önemli rol oynarlar (Yorgancılar vd., 2015: 2). Genetik diziliş farklılıkları; gen bölgelerinin eklenmesi, silinmesi, yer değiştirmesi, duplike olması gibi olaylardır (Filiz ve Koç, 2011: 207), moleküler belirteçler bu farklılıkların ortaya çıkarılmasında en çok kullanılan ve en güvenilir belirteç türleridir (Vardar Kanlıtepe vd., 2010: 36). Moleküler belirteçler tekrarlanabilir olması, çevresel şartlardan etkilenmemesi, organizmadaki tüm dokularda tanımlanması ve dokular üzerinde herhangi bir olumsuz duruma yol açmaması gibi pek çok özelliğe sahiptirler (Devran, 2003: 3).

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler moleküler belirteçlerin kullanım potansiyelini de arttırarak birçok alanda fonksiyonel olmasını sağlamıştır (Grover ve Sharma, 2016: 290). Bitki türlerinin varyasyonlarını belirlemede (Sipahi ve Yumurtacı, 2020: 276), bitki ıslahında, genetik çeşitlilik ve gen haritalamanın yanı sıra genotoksisite çalışmalarında da kullanılmaktadırlar (Pradeep Reddy vd., 2002: 9). Moleküler belirteçler, hibridizasyona dayalı belirteçler ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı belirteçler olmak üzere iki grup altında incelenirler.

1.4.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler Belirteçler:

RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Moleküler belirteçlerin ilk uygulanan mekanizması RFLP tekniğidir (Devran, 2003: 1). DNA'nın restriksiyon enzimi yardımı ile belirlenmiş bölgelerinden kesilip fragmentler elde edilmesi ve oluşan farklı boyutlardaki DNA parçalarının jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmesi işlemine dayanır. RFLP tekniği polimorfizm çalışmalarında kolay anlaşılabilir bir yöntem olduğu için avantajlıdır. Ancak kaliteli ve yüksek miktarda DNA'nın bulunması gerektiği ve ekonomik yönden tekniğin pahalı olması nedeniyle dezavantajlıdır (Kolören vd., 2017: 218).

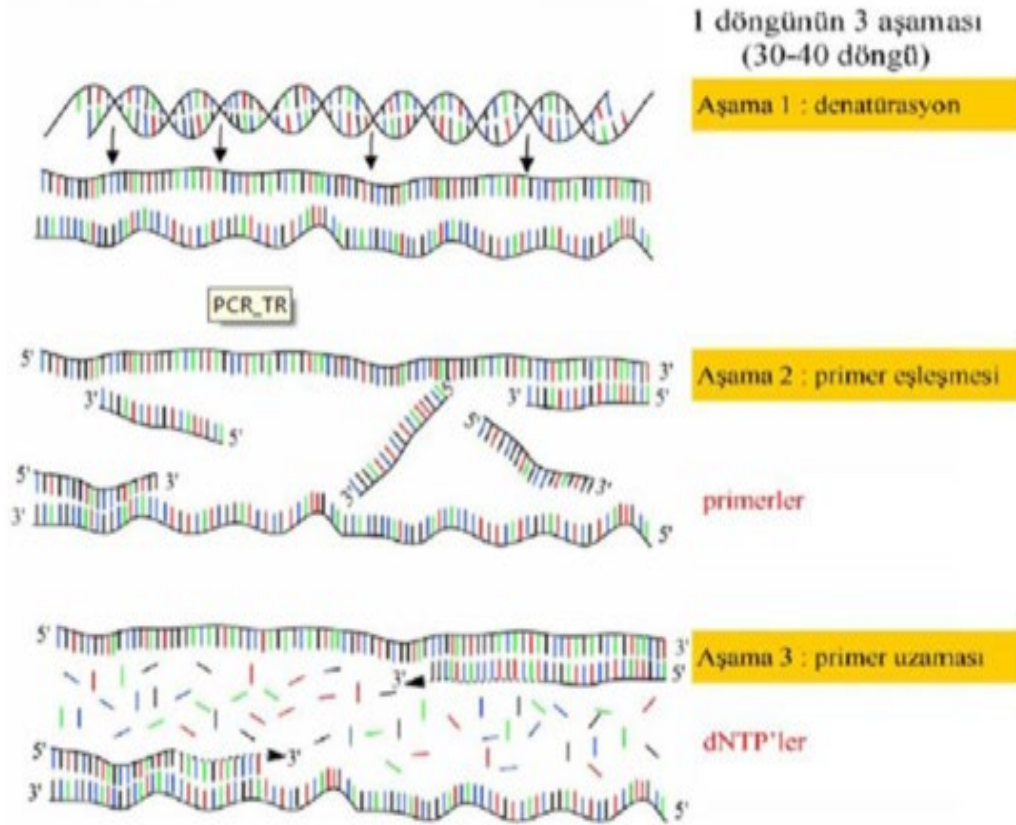
1.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Moleküler Belirteçler:

Kary Mullis tarafından 1985 yılında keşfedilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA'nın çoğaltılması tekniğidir (Kâhya vd., 2013: 32). Tekniğin temelini *Thermus aquaticus* adlı bakteriden izole edilen enzim oluşturmaktadır. Taq polimeraz isimli bu enzim yüksek sıcaklığa dayanıklı olması sayesinde DNA replikasyonu *in vitro* ortamda gerçekleşmektedir.

Çalışma prensibi; DNA molekülünün iki zincirinin yüksek sıcaklıkta denatüre edilip, tek zincire tamamlayıcı primerlerin bağlanması ve enzim yardımıyla zincirin uzaması şeklindedir. Ancak reaksiyon için ortamda kalıp DNA, primerler ve enzimin yanında; tampon çözelti, $MgCl_2$, Adenin-Timin-Guanin-Sitozin bazları bulunmaktadır. Sonuç olarak; DNA 5' ucundan 3' yönünde uzatılmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısı üretilmiş olur (Yorgancılar vd., 2015: 5).

Bir PCR döngüsü:

- DNA zincirlerinin birbirinden ayrılarak açılması (Denatürasyon), 94 °C, 30-60 sn
- Primerin bağlanması-eşlenmesi (Annealing), 54 °C, 30-60 sn
- Primerlerin uzaması (Extention), 72 °C, 30-90 sn olmak üzere üç aşamadan oluşur.



Şekil 1.2. PCR döngü aşamaları

Kaynak: (Lab Akademi, 2021)

PCR tekniği günümüzde birçok alanda sıkl a kullanılmaktadır. Bitki ve hayvan popülasyon çeşitliliği, popülasyonda bulunan genotipler arasındaki akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi, bitki ve hayvan türlerinin ıslahı, genetik haritalama, hastalıkların teşhisi vb. konularda polimeraz zincir reaksiyonundan yararlanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005: 27). PCR tekniği sayesinde; RAPD, AFLP, SSR, ISSR gibi moleküler belirteçler geliştirilerek uygulama alanı geni letilmi tir.

RAPD (Rastgele  oğaltılmı  Polimorfik DNA)

RAPD tekniği, çalışılan organizmaya ait genomik DNA'ya rastgele seçilen 9-10 bp uzunluğundaki primerlerin yine rastgele bağlanmasıyla çoğaltılması esasına dayanır. Çoğaltılan PCR  r nleri jel elektroforezi yöntemiyle yürütülerek bantlar gözlemlenir. Bantların var ya da yok olmasıyla sonuçlar kar ıla tırılır ( z Aydın, 2004: 115).

RAPD tekniği, tüm PCR tekniklerinin en kolayıdır. Kullanılan primerlerin çoğunluğu Guanin ve Sitozin bazlarından oluşmaktadır ve rastgele kalıp DNA'ya bağlanarak 200-2000 baz çifti uzunluğunda gen bölgeleri çoğaltılır. Oluşan  r nler agaroz jel veya poliakrilamid jel üzerinde yürütülür. Birbirinden ayrılan bantların karşılaştırılması yapılarak sonuçlar değerlendirilir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011:67-68). Teknik  abuk sonuç verir, maliyeti ucuzdur ve i  gücü daha azdır (Yorgancılar vd., 2015: 7). RAPD tekniğinin en önemli avantajı çalışılan organizmaya ait genomun bilinmesine ihtiyaç yoktur. Bu durum tekniğin uygulanabilir olmasını sağlamaktadır. Ayrıca farklı organizmalarda aynı primer kullanılacağı için türlerin kar ıla tırılmasını sağlar. RAPD tekniğinin tekrarlanabilirliği, PCR'ın yapıldığı esnada ortam şartlarının tümüne bağlı olduğu için düşüktür ( z Aydın, 2004: 116).

Güvenilirliği sınırlıdır (Yorgancılar vd., 2015: 7). Teknik; polimorfizm çalışmalarında, bireyler arası akrabalık ilişkilerinde, haritalamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005: 31).

AFLP (Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi)

AFLP tekniği RAPD ve RFLP tekniklerinin birle tirilmi  bir şekli olup, genellikle bakteri identifikasyonunda anlamlı sonuçlar veren bir tekniktir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011: 68). Yöntemin temel olarak çalışma prensibi; kalıp DNA, 6-7 baz çifti uzunluğunda olan restriksiyon endonükleaz (RE) enzimiyle kesilir ve enzimin açık u  kısmını tamamlayıcı primerler kullanılarak amplifikasyonu sağlanır. Oluşan DNA fragmentlerinin analizi yapılır (Köksal, 1999: 193). Bu teknik için DNA miktarının çok olmasına ihtiyaç olmadığı için tekrarlanabilirliği yüksektir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011: 68).

SSR (Basit Dizi Tekrarları) / VNTR

Mikrosatellitler olarak isimlendirilen basit dizi tekrarları ökaryotlarda bulunan kısa, ardışık dizi tekrarlarıdır (Maia vd., 2008: 1). Mikrosatellitlerin etrafındaki DNA dizileri primer olarak işaretlenir ve PCR yöntemi ile çoğaltılır. Böylelikle lokuslardaki farklı allellerin tespit edilmesi sağlanır. Lokuslara ait primer dizilerinin bilinmesi gerektiği için uygulanması zor bir tekniktir (Yorgancılar vd., 2015: 6). Mikrosatellitlerin; kromatin organizasyonu ve DNA onarımıyla ilgisi olduğu ve genomda protein kodlanan ve kodlanmayan bölgelerde dizi tekrarlarının varlığı ispatlanmıştır (Maia vd., 2008: 1).

SSR belirteçleri genetik haritalama ve çeşitliliğin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005:32). Mikrosatellitler yüksek oranda polimorfik oldukları için özellikle bitki genetiği çalışmalarında fazla bilgiye ulaşmamızı sağlamaktadır (Yorgancılar vd., 2015: 6).

ISSR (Basit Dizi Tekrarları Arası Polimorfizm)

Basit diziler arası tekrar tekniği, mikrosatellitler arasında kalan gen bölgelerinin çoğaltılması prensibine dayanır (Pradeep Reddy vd., 2002: 9). Zıt yönde yönlendirilmiş aynı mikrosatellit arasındaki DNA'nın amplifikasyonunu sağlamak için, 16-25 bp uzunluğundaki primerler kullanılmaktadır (Vijayan, 2005: 80). Primerlerin bağlanması sonucu oluşan PCR ürünlerinin jelde yürütülüp çıkan bantların büyüklüğüne göre sonuçlar değerlendirilir (Gülşen ve Mutlu, 2005:32).

ISSR tekniğinde RAPD primerlerine göre daha uzun primerler kullanıldığı için tekniğin tekrarlanabilirliği yüksektir (Pradeep Reddy vd., 2002: 11). Teknikte kullanılan primerler yeterli bilgiyi verdiği için; güvenilirlik açısından da yüksektir bu durum tekniğin düşük maliyetli olmasını ve zamandan tasarruf edilmesini sağlar (Yorgancılar vd., 2015: 9). Ayrıca ISSR tekniği DNA dizi bilgisi gerektirmediği için avantajlıdır (Filiz ve Koç, 2011: 210).

ISSR tekniğinin kullanım alanları oldukça geniştir; genetik çeşitlilikte, gen haritalamada, filogenetik analizlerde (Yorgancılar vd., 2015: 9), SSR motif frekansının belirlenmesinde (Pradeep Reddy vd., 2002: 15), tarımsal özelliklerle ilişkili belirteçleri belirlemede (Vijayan, 2005: 83) uygulanmaktadır.

Bu moleküler belirteçlere ek olarak; SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Site), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic), ALP (Amplicon Length Polymorphism) ve bunlara ilaveten DNA sekanslamasına dayalı SNP (Single Nucleotide Polymorphism) belirteçleri ve MP-PCR (Microsatellite Primed Polymerase Chain Reaction), AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), AS-PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction), DAF (DNA Amplification Fingerprinting) gibi belirteçler de polimorfizm belirlenmesinde kullanılmaktadır (Yorgancılar vd., 2015: 3).



2. LİTERATÜR ÖRNEKLERİ

Yano-Melo vd. (1999), *Cladonia verticillaris* liken ekstraktlarının ve fumarprotocetrarik asidin, *Allium cepa*'da çimlenmiş fidelerin erken büyümesi üzerindeki allelopatik etkilerini araştırmışlardır. *C. verticillaris* likeninin; sulu, fosfat tampon ve total ekstraktı elde edildikten sonra soğan tohumlarına farklı konsantrasyonlarda uygulanarak laboratuvar koşullarında çimlenmeye bırakılmıştır. Deney sonucunda; total ekstraktın yüksek derecede fumarprotocetrarik asit içerdiği ve soğan kök uzunluğunu uyardığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca HPLC ile ölçülen yüksek düzeyde metil β -orcinol karboksilat içeren fosfat tampon ekstraktının hipokotillerin uzunluğunu önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. *Cladonia verticillaris* farklı liken ekstraktlarının *Allium cepa* çimlenme ve büyümesi üzerine allelopatik etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Cansaran vd. (2006), yaptıkları bir çalışmada Anadolu'da bulunan *Usnea* türlerinden *Usnea barbata*, *Usnea florida*, *Usnea hirta*, *Usnea longissima*, *Usnea rigida* ve *Usnea subflorida* likenlerinin aseton ekstrelerinin bazı bakteri suşları üzerinde antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Likenlerin sentezlediği sekonder bileşik olan usnik asit bileşeninin konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal aktivitenin arttığı ortaya çıkmıştır. *Usnea* türlerinin kullanılan bakterilerin üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Cansaran 2007 yılında yaptığı çalışmasında; dört farklı liken türünün (*Evernia divaricata*, *Pseudevernia furfuracea*, *Letharia vulpina* ve *Flavoparmelia caperata*) aseton ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. Liken türlerinden elde ettiği sekonder metabolit olan usnik asidin çeşitli bakteriler üzerindeki etkisini araştırmıştır. HPLC metodu ile usnik asit miktarlarını belirlediği likenlerin aseton ekstraktlarını, bakterilerin besiyeri ortamına bekleterek inkübasyonunu sağlamıştır. Sonuç olarak; *L. vulpina* aseton ekstraktı en yüksek usnik asit miktarına sahiptir ve antimikrobiyal etkiyi en çok bu liken türü göstermiştir. En yüksek oranda usnik asit içeren liken türünün en çok antimikrobiyal etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Fritz vd. (2007), *Hypericum myrianthum* ve *H. polyanthemum* ekstraktlarının *Lactuca sativa* üzerine çimlenme ve büyümeyi önleyici etkilerini araştırmışlardır. Sarı kantaron türleri olan bitkilerin toprak üstü kısımlarının kurutulup toz haline getirilerek etanol eklenmesiyle elde edilen etanolik ekstraktlarının, marul tohumlarının çimlenmesi ve gelişimi üzerindeki etkisini inceleyerek allelopatik etkisini ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak; yedi gün süren deneyde marul tohumlarının kontrole göre çimlenme yüzdesinin önemli ölçüde azaldığı ve marul

büyümesini inhibe ettiği sonucu ortaya çıkmıştır. *H. myrianthum* ve *H. polyanthemum* ekstraktlarının *Lactuca sativa* üzerindeki çimlenme ve büyümeyi önleyici etkileri, bu bitkilerde bulunan yüksek miktarda fenolik bileşik ile ilişkilendirileceğini belirtmişlerdir. Ancak sonuçlara göre, özütlerin allelopatik etkilere sahip olduğunun kesin olarak kanıtlanmadığı, *Hypericum* ekstraktlarının fitotoksik etkisine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Campos vd. 2008 yılında *Myelochroa lindmanii* ve *Canoparmelia texana* liken türleri sulu ekstraktlarının mısır ve marul bitkilerinin meristematik hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Liken ekstraktlarının her iki bitki türünde de hücre döngüsünü inhibe ettiği ve hücre ölümüne yol açtığı gibi sitotoksik etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Karagöz vd. 2009 yılında bazı liken ekstraktlarının antibakteriyel etkisini araştırmak amacıyla, 11 adet liken türünün su ve etanol ekstraktlarını 6 standart ve 2 çevresel bakteri suşuna uygulamışlardır. Deney sonucunda liken ekstraktının denenen tüm bakteri suşlarına ettiği ortaya çıkmıştır. Etanol ekstraktları, sulu ekstraktlardan daha iyi antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bazı liken ekstraktlarının orta derecede antibakteriyel etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak liken ekstraktlarının bazı suşlar üzerinde antibakteriyel etkisi olduğu ortaya çıkmıştır.

Peres vd. 2009 yılında, orsellinik asit türevlerinin allelopatik potansiyeli çalışmasında liken sekonder metabolitlerinin aktivitelerini incelemeyi amaçlamışlardır. *Parmotrema tinctorum* liken türünden elde edilen lekanorik asidin eldesi için, kuru liken materyalini toz haline getirip çeşitli çözücülerle (kloroform, aseton ve su) muamele etmişlerdir. Deneyde dört farklı konsantrasyon uygulanmıştır. Deney sonuçlarına göre, *A. cepa* 'nın tüm dozlarda daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır. *L. sativa* 'nın çimlenmesini ise önemli bir şekilde etkilemediğini göstermiştir. Yapılan deneyin, lekanorik asit ve orsellinatların potansiyel allelopatik özelliklere sahip olduğu ve çimlenme ve büyüme tepkilerinin her türe özel olduğu, dolayısıyla yüksek değişkenliklerinin olduğunu göstermektedir.

Ağar vd. 2010 yılında *Rhizoplaca chrysouleuca* ve *Rhizoplaca melanophthalma* likenlerinin metanol ekstraktlarının mutasyon önleyici ve antigenotoksik potansiyelini mitotik indeks ve Ames-*Salmonella* testleri ile araştırmışlardır. NaN_3 genotoksik maddesine karşı *Zea mays* tohumları ve *Salmonella typhimurium* bakterisi ile muamele edilen liken ekstraktlarının farklı konsantrasyonları antigenotoksik etki göstermiştir. Deney sonucunda, likenlerden elde edilen doğal bileşiklerin genotoksik maddelerin etkilerini azaltma veya önleme kabiliyetine sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Tigre vd. (2012), *Cladonia verticillaris* liken türünün marul tohumlarının çimlenmesinin üzerine allelopatik etkisini ve biyoherbisidal potansiyelini araştırmışlardır. Likenin farklı konsantrasyonlarda eter ve aseton ekstraktları hazırlanarak tohumlara uygulanmıştır. Deney sonucunda; liken ekstraktlarının marul tohumu çimlenmesinde bir etkisinin olmadığını gözlemlenmiştir. Yaprak alanı, hipokotil ve kök gelişiminde değişiklikler meydana gelmiştir. Büyüme deneylerinde, eter veya aseton ekstraktına maruz bırakılan fideler, kontrollere kıyasla kök uyarana zarar verecek şekilde azalmış hipokotil büyümesi göstermiştir. Ekstrakt konsantrasyonlarındaki artışlar anormal fide oluşumuna yol açmıştır. Liken sekonder metabolitlerinin *L. sativa* fidelerinin gelişimini yüksek konsantrasyonlarda etkileyerek, biyoherbisit potansiyelini gösterdiğini belirtmişlerdir.

Goel vd. (2014), liken sekonder metabolitlerinin etkilerini araştırmak amacıyla, *Parmelia reticulata* liken türünün, *Phalaris minor* yabancı otuna olan allelopatik etkilerini incelemişlerdir. Likenin; heksan, etil asetat ve metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (50, 25 ve 12.5 ml⁻¹) yabancı otun çimlenme ve erken fide büyümesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Liken ekstraktı içerisinde bir gece muamele edilip ekimi yapılan yabancı ot tohumlarının hem çimlenmesinde hem de gelişmesinde olumsuz allelopatik etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Kullanılan çözücüye göre sonuçlar değişim göstermiştir. Heksan ve etil asetat ekstraktları, tohum çimlenmesi üzerinde maksimum zararlı etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, likenlerin gelecekteki tarımsal kimyasalların yerine alternatif olma potansiyeli taşıdığını vurgulamıştır.

Lokajová vd. (2014), liken sekonder metabolitleriyle yaptıkları çalışmada, beş liken türünden (*Cladonia arbuscula*, *Cladonia furcata*, *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea*) elde edilen sekonder metabolitleri, apo simbiyotik liken türü olan *Trebouxia erici* kültürü üzerindeki allelopatik etkisini değerlendirmişlerdir. Sekonder metabolitlerin toksisitesini seçilen iki dozda (0.1mg ve 0.01mg) test etmişlerdir. Sonuç olarak; test edilen tüm metabolitlerin uygulanması, fotobiyont hücrelerinin büyümesini doza bağlı bir şekilde azalttığı ortaya çıkmıştır. Likenlerin ikincil metabolitlerinin ve bunların doğal metabolitlerinin liken fotobiyontları üzerinde fitotoksik, allelopatik etkileri olduğu sonucuna varılmıştır.

Latkowska vd. (2015), liken sekonder bileşikleriyle yapmış olduğu araştırmada ise epifitik liken *Hypogymnia physodes* kolonizasyonunun ladin kabuğu (*Picea abies*) üzerine allelopatik etkileri incelemişlerdir. *Hypogymnia physodes* liken türü tarafından üretilen sekonder bileşikler; atranorin, kloroatranorin, protocetraric, physodalic, physodic, 3-

hydroxyphysodic ve 2'-O-methylphysodic asit olarak bilinmektedir. Sonuç olarak; likenin ladin kabuğu dallarının neredeyse tüm yüzeyini ve konak gövdenin büyük bir kısmını kolonize ettiği görülmüş, canlılığın azalmasına neden olmuştur. Ormanın bir kısmında ağaçların canlılığını kaybettiği gözlemlenmiştir.

Peres vd. (2015) likenlerden izole edilen fenolik bileşiklerin herbisit ve bitki büyümesini uyarıcı etkilerini araştırmışlardır. Liken sekonder bileşiklerinden; atranorin, difraktaik asit, hipostitik, protosetrarik, salazinil asit, ksanton sekalonik asit ve usnik asit fitotoksikleri hedef organizma *Allium cepa* için değerlendirilmiştir. Sekonder bileşiklerin elde edildiği liken türleri; *Parmotrema dilatatum*, *Usnea subcavata*, *Parmotrema cetratum* ve *Pseudoparmelia sphaerospora* şeklindedir. Araştırma sonuçlarında; difraktaik ve hipostitik asitlerin bitki büyümesini uyardığı, protosetrarik ve salazinik asitlerin ve atranorinin soğan tohumlarının çimlenmesini önleyerek ve kök ve koleoptil büyümesini yavaşlatarak herbisidal bir etki sergilediği bulunmuştur. Usnik asidin; tohum çimlenmesini desteklediği, hem kök büyümesini (%54) hem de koleoptil büyümesini (%43) yavaşlattığı ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak; bu bileşiklerin, monokotiledon türlerine uygulandığında allelopatik aktiviteler sergilediklerini ve yabancı ot kontrolü için herbisitler olarak kullanımda iyi bir aday olabileceklerini belirtmişlerdir.

Pathak vd. (2016), *Usnea orientalis*'in antidermatofitik aktivitesini incelemişlerdir. Antidermatofitik testler için altı dermatofit türü seçip, ekstraktların dermatofitlere karşı etkinliğini anlayabilmek için CLSI tarafından önerilen broth mikrodilüsyon prosedürünü kullanmışlardır. Liken ekstraktlarının TLC metodu ile sekonder bileşiklerinin izolasyonu (salazinik asit ve usnik asit) yapılmıştır. Sonuç olarak; *U. orientalis* ekstraktı, üç tür dermatofitin tümüne karşı geniş kapsamlı antidermatofitik aktivite sergilediği ortaya çıkmıştır. *U. orientalis* ekstraktı, test edilen tüm patojenlere karşı umut verici antidermatofitik etkinlik gösterdiği anlaşılmıştır.

Goga vd. 2017 yılında yaptıkları araştırmada; liken sekonder bileşiklerinin allelopati ile *Physcomitrella patens* 'in (yosun) büyümesini etkilediği sonucuna varmışlardır. Kullanılan liken türleri; *Usnea hirta*, *Parmotrema robustum*, *Parmotrema tinctorum*, *Pleurosticta acetabulum*, *Flavoparmelia baltimorensis*, *Usnea florida* şeklindedir. Çalışmada incelenecek olan briyofit türü yosun laboratuvar ortamında yetiştirilmiş ve liken özleriyle muamele edilmiştir. Altı liken türünün sekonder bileşikleri aseton ekstraktları HPLC ve TLC ile analiz edilmiştir. Liken türlerinin ürettikleri sekonder bileşikler: *P. robustum*'da protocetraric asit ve atranorin, *P. tinctorum*'da lecanoric asit ve atranorin, *P. acetabulum*'da nortistic asit ve atranorin, *F. Baltimorensis*'da usnic asit ve protocetraric asit, *U. florida*'da thamolic asit ve

usnic asit, *U. hirta* 'da usnic asit şeklindedir. Sonuç olarak; hücre uzunluk ve genişliklerinde de önemli farklılıklar görülmüştür, usnik asit varlığında protonemata ve gametoforların büyüme inhibisyonunu kontrol ettiği ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, usnik asidin protonematadaki hücre bölünmesi üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu göstermiştir. Buna göre, liken sekonder bileşiklerinin briyofit gelişiminin erken aşamaları üzerinde güçlü etkisi olduğunu ve buna bağlı olarak bitki büyümesinin erken aşamalarının özellikle liken sekonder bileşikleri ile doğrudan temas halinde olanların en çok etkilendiği hipotezini desteklemektedir.

Cankılıç vd. (2017), *Usnea florida*'da bulunan tamnolik asidin antibakteriyel, antitüberküloz, antifungal özelliklerini araştırmıştır. Çalışmada, *Usnea florida* likeninin aseton, metanol ve kloroform ekstraktları hazırlanarak çeşitli mantar ve maya türlerine uygulanmıştır. Tüm liken ekstraktlarının bakteri ve mayalara karşı kuvvetli aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. *Usnea florida* 'nın farklı hastalıkları kontrol etmek amacıyla olası bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Guo vd. (2017), suda bulunan canlılara zarar veren mantarların kontrolünü sağlamak için liken ekstraktlarının ve usnik asidin antifungal etkisini araştırmışlardır. *Cladonia amaurocraea*, *Cladonia rangiferina* ve *Usnea longissima* olmak üzere üç likenin aseton ekstraktları ve usnik asidin antifungal aktivitesi, üç patojenik mantar (*Saprolegnia parasitica*, *Achlya bisexualis* ve *Pythium sp.*) üzerinde araştırılmıştır. Sonuç olarak, mantarlar üzerinde antifungal aktivite için test edilen tüm liken ekstraktları ve usnik asit arasında, düşük bir konsantrasyon dışında, *Pythium* için büyümeyi teşvik edici aktiviteler gözlemlendiği ortaya çıkmıştır. Liken sekonder metabolitlerinin, bazı patojenik mantarların enfeksiyonuna karşı tedavi için etkili bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Likenlerin, su ürünleri yetiştiriciliğinde zararlı patojenleri kontrol etmek için yeni bir terapi geliştirmede kullanım potansiyeline sahip olabileceği anlaşılmıştır.

Türkyılmaz vd. (2017), *Cinclidotus pachylomoides* (Bryophyta)'ın su ve etanol çözeltileriyle elde edilen ekstraktlarının biber *Capsicum annuum* ve mısır *Zea mays* bitkileri üzerine allelopatik etkisini incelemişlerdir. Sonuç olarak, *C. pachylomoides* farklı dozlardaki ekstraktlarının biber ve mısır bitkilerinin büyüme parametreleri ve fizyolojik aktiviteleri üzerinde allelopatik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Dieu vd. (2018) *Usnea florida* ve *Flavoparmelia caperata* likenlerinin antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Likenlerin aseton ekstraktlarının, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *Aspergillus brasiliensis*'e karşı antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; asetonik ekstraktların, *Candida albicans* ve *Aspergillus brasiliensis*'e karşı orta düzeyde bir fungisidal aktivite sergilediği ortaya çıkmıştır.

Pizňak ve Bačkor' un (2018) yaptıkları 'Sulu liken ekstraktının kozalak ağaçlarının çimlenmesine etkisi' çalışmasında *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Physcia adscendens*, *Pseudevernia furfuracea* liken türlerinin su ekstraktları ile *Picea abies*, *Pinus sylvestris* ve *Pinus mugo* türlerinin çimlenme oranları incelenmiştir. Sonuç olarak; *P. sylvestris*'in liken özütlerine en duyarlı olduğu görülmüştür.

Kınalıoğlu vd. (2019), *Usnea longissima* likeninin insan patojenlerine karşı antimikrobiyal potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada, *Usnea longissima* likeninin etil asetat ve etanol ekstraktlarının disk difüzyon yöntemiyle bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenerek sentetik ajanlara karşı alternatif olma potansiyeli incelenmiştir. Araştırma sonucunda *U. longissima*'nın etil asetat ve etanol ekstraktlarının; insan tedavisinde, hayvan ve bitki hastalıklarında test edilen bakteri ve mantarlara karşı önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. *U. longissima*'nın sentetik antimikrobiyal ajanlara alternatif olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Pizňak vd. 2019 yılında Liken metaboliti usnik asidin Norveç ladini (*Picea abies*) ve sarıçam (*Pinus sylvestris*) fidelerinin büyüme ve fizyolojik tepkileri üzerindeki allelopatik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada temel amaç, 14 gün süreyle yetiştirilen *Pinus sylvestris* ve *Picea abies* fidelerinde usnik asit (UA) miktarının belirlenmesidir. Sarıçam ve ladin köklerindeki UA miktarı HPLC cihazı ile test edilmiştir. Usnik asidin çam ve ladin fidelerinin seçilmiş morfolometrik özelliklerini (kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, kök: sürgün oranı) olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır. Usnik asidin, kozalaklı ağaçların dokularında poliploid (aneuploid) hücrelerle sonuçlanan mitotik anormallikler oluşturmadığı ortaya çıkmıştır. Ancak, usnik asidin varlığının orman ekosisteminde önemli bir rol oynayabileceği ve fide oluşumunu olumsuz etkileyebileceği ifade edilmiştir.

2.1. Çalışmanın Amacı

Yabani otların sınırlandırılması amacıyla kullanılan herbisitlerin verdiği zarar bilinmektedir. Bu zararın giderilmesi ve herbisit kullanımına alternatif yolların kullanımı için birçok alanda çalışmalar devam etmektedir. Alternatif yol olarak organizmaların kendilerinin sentezlediği doğal bileşiklerin biyoherbisit olarak kullanılması ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Likenlerin sentezlediği bileşiklerin etkisi geçmişten günümüze kadar birçok alanda kullanılmıştır. Bu çalışma likenlerin sentezlediği doğal bileşiklerin, herbisit kullanımının önüne geçmek amacıyla biyoherbisit olarak çeşitli zarar verici etmenlere karşı kullanılabilme potansiyelini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Literatürde bugüne kadar *Usnea* türleri ile ilgili çalışmalar liken ekstraktlarının antimikrobiyal, antifungal, antitüberküloz özelliklerini belirlemek üzerine yoğunlaşmıştır (Cansaran ve ark. 2006; Cankılıç ve ark., 2017). Allelopatik etkilerinin belirlenmesi için *Usnea* türleri ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. *Usnea* cinsinden bir tür olan *Usnea florida* likeninin total ekstraktıyla allelopatik ve genotoksik etkilerinin incelenmesi ile ilgili bir çalışma literatürde mevcut değildir. Araştırmamızda *Usnea florida* (L.) Weber Ex. F.H. Wigg total aseton ekstraktının allelopatik ve genotoksik etkileri incelenmiş ve biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Liken ve Bitki Örnekleri

Çalışmada kullanılan liken türü, 2015 yılında Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet CANDAN tarafından Bolu Dağı Abant yolunun kuzeyi, Dereceören Köyü'nün kuzeybatısında ormanlık alanda 1080m. yükseklikte *Quercus sp.* dalları ve gövdesi üzerinden toplanmış ve tanımlanmıştır.

Araştırmada kullanılan liken *Usnea florida*; *Parmeliaceae* familyasındaki bir sakal likeni türüdür. İlk olarak Carl Linnaeus tarafından 1753 tarihli *Species Plantarum* adlı eserinde tanımlanmıştır. Alman botanikçi Friedrich Heinrich Wiggers, *Usnea* cinsine eklemiştir. *Usnea florida*, sarkık tallusa, radikal simetriye sahip soluk, sarımsı yeşil dallara, sakal benzeri yapıya sahiptir (Clerc, 1998: 321) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Liken *Usnea florida* genel görünümü

Kaynak: (<https://wales-lichens.org.uk/species-account/usnea-florida>)

Çalışmada kullanılan yabani ot türleri; *Amaranthus retroflexus* L. (Kırmızı Köklü Horozibiği) ve *Setaria verticillata* L. (P. Beauv.) (Yapışkan Ot), Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme tarlalarının kenar bölgelerinden toplanmıştır. *Portulaca oleracea* L. (Semizotu) (Arzuman marka) ticari tohum çiçek pazarından temin edilmiştir.

Kültür bitkisi *Triticum aestivum* L. Kutluk çeşidine ait buğday tohumları ise Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

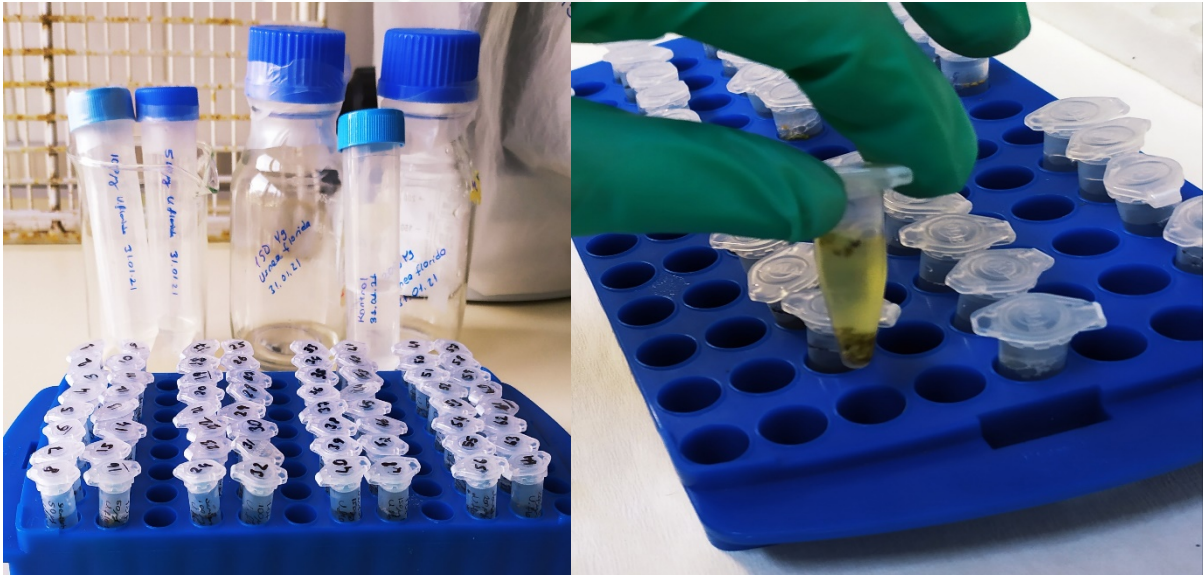
3.2. Liken Ekstraktının Hazırlanması

Liken örneği suyla temizlendikten sonra kurutulup üzerine aseton eklenerek bekletilmiştir. Filtre kağıdından süzülerek 280 mbar 42 °C’de 104 rpm’de Rotary Evaporatörde buharlaşması sağlanmıştır. Elde edilen liken ekstraktı tartılarak üzerine 1:1 oranında aseton eklenerek stok çözelti hazırlanmıştır.

Liken ekstraktı 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/ml konsantrasyonları, 20 ml hacim için 1 ml liken ekstraktı oranıyla hesaplanmıştır. Ekstrakt içerisine eşit oranda %0,1 Tween 20 eklenerek total hacim 5 ml olacak şekilde distile suyla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler, deney süresi boyunca +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Çimlendirme Uygulamaları

Bitki tohumları, sterilizasyon işlemi için %1’lik sodyum hipokloritte 1 dk bekletilmiştir. Ardından 4 defa 1’er dk distile suyla çalkalanarak sodyum hipokloritten arındırılmıştır.



Şekil 3.2. Liken ekstraktının eppendorflara aktarılması

Yabani ot tohumlarından bir petri için 25 tohum, buğday tohumlarından 10 tohum seçilerek 1’er ml eppendorf içerisine farklı konsantrasyonlardaki liken ekstraktları eklenerek 1 gece boyunca 24 °C’de bekletilmiştir. Ertesi gün 2 kat filtre kâğıdı yerleştirilmiş steril cam petrilere, asetonlu çözelti içerisinde bulunan tohumlar aktarılmıştır. Aseton oda sıcaklığında uçurularak petri kağıtlarının kuruması sağlanmıştır. Tohumların distile su ile sulanması yapılarak ekim işlemi tamamlanmıştır. 16 saat gündüz / 8 saat gece fotoperiyotlu iklim kabininde (SANYO-MLR-350H) yabani ot tohumları 28 °C, buğday tohumları 25 °C’de çimlenmeye bırakılmıştır. Sulama işlemi deney süresince yalnızca distile su ile yapılmıştır.

Deneyler 4 tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Kontrol grubu tüm tohumlar için su ve %0,1 Tween 20 içermektedir. Deney yabancı ot tohumları için 30 gün, buğday tohumu için 14 gün boyunca devam etmiştir. Çimlenen tohumlar günlük kayıt altına alınmıştır. Deney sonunda çimlenen tohumlardan örnekler dikkatli bir şekilde alınarak örnek miktarına göre alüminyum folyo ya da eppendorf içerisinde genotoksisite analizleri için -20 °C’de saklanmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

Deney sonunda elde edilen veriler ile tohum çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır (Yücel, 2000: 266) ve çimlenme yüzdelerinin deney süresine bağlı grafiği çizilmiştir. Sonuçlara SPSS (Statistics 20 package) istatistik programında varyans analizi uygulanmış, elde edilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar Tukey testi $P<0.05$ duyarlılık ile belirlenmiştir.

3.5. DNA İzolasyonu

-20 °C’den muhafaza edilen bitki örnekleri sıvı azotta öğütüldükten sonra 2 ml’lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. DNA izolasyonu 2X CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) tamponu ile yapılmıştır. 2X CTAB tamponu bileşenleri Tablo 3.1.’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. 2X CTAB tamponu (50 ml) bileşenleri

CTAB	1 gr
PVP (Polyvinyl pyrodine)	0.5 gr
1 M Tris (pH:8)	5 ml
0.5 M EDTA	2 ml
5 M NaCl	14 ml

Hazırlanan tampon 50 ml’ye kadar distile su ile tamamlanarak 120 °C’de 20 dk otoklavlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra tampon içerisine steril ortamda 200 µl β-merkaptotanol (15 ml CTAB için 75 µl β-merkaptotanol) eklenerek kullanılmıştır.

2X CTAB DNA İzolasyon Protokolü:

1. Merkaptotanol eklenen 2X CTAB tamponu 65 °C’de su banyosunda yaklaşık 10 dk ısıtılmıştır.
2. Sıvı azotta öğütülüp tüplere aktarılan 200-500 mg bitki örneklerinin üzerine 700 µl CTAB tamponu eklenmiştir, pipetaj yaparak homojen hale gelmesi sağlanmıştır.

3. Tüpler 65 °C’de su banyosunda her 5 dk ’da bir yavaşça alt üst edilerek 30-60 dk boyunca inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra tüplerin içerisine eşit hacimde kloroform: isoamil alkol (24:1) eklenmiş ve 10 dk boyunca yavaşça alt üst edilmiştir.
5. Tüpler 10000 rpm’ de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant dikkatli bir şekilde yeni tüpe aktarılmıştır.
6. Yeni tüpe aktarılan miktarın 2/3’ü kadar -20 °C’de bulunan isopropanol eklenmiştir, tüpler birkaç defa yavaşça alt üst edilip -20 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir.
7. -20 °C’den çıkarılan tüpler 10000 rpm’de 10dk santrifüj edilmiştir.
8. Oluşan DNA peletinin yıkama işlemi için tüpün içerisine 300 µl %70 etanol eklenerek 10000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Etanol tüpten dökülüp aynı işlemler bir kez daha tekrarlandıktan sonra tüpler havalandırması açık çeker ocakta peletler kuruyana kadar bekletilmiştir.
9. Kuruyan DNA peletinin büyüklüğüne göre üzerine 50-100 µl steril deiyonize su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır.

3.6. DNA Miktar Ölçümü

İzole edilen DNA’ların miktar ve kaliteleri elektroforetik ve spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla her bir DNA örneğinden 7 µl alınarak RedSafe (İntron Bio) içeren %0,8’lik agaroz jelde 90 V 30 dk yürütülmüştür. Jelde görüntülenen silik, dağınık görünüm (smear) oluşturan örneklerden yeniden DNA izole edilmiştir. Tek bant ve parlak olan DNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri ise, Nanodrop spektrofotometre cihazında 260-280 nm dalga boylarında (ND-1000, Wilmington, USA) okutularak belirlenmiştir. Nanodrop ölçüm sonuçlarına göre DNA örnekleri 2 ng/µl olacak şekilde steril distile su kullanılarak dilüe edilmiştir. DNA örnekleri PCR işlemlerine kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.7. PCR Analizleri

3.7.1. ISSR PCR Analizi

Bu çalışmada daha önce laboratuvarımızda bulunan 5 adet ISSR primeri kullanılmıştır. Bitki örneklerinden elde edilen DNA'lar ve ilgili primerler ile PCR reaksiyonları kurulmuştur. Kullanılan primerler Tablo 3.2'de listelenmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ISSR primerlere ait bilgiler

Primer No	Primer adı	Primer dizisi 5'→3'	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Primer uzunluğu (bç)	G/C (%)
810	(GA) ₈ T	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50	17	44.44
812	(GA) ₈ A	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50	17	47.06
813	(CT) ₈ T	CTC TCT CTC TCT CTC TT	50	17	47
814	(CT) ₈ A	CTC TCT CTC TCT CTC TA	50.4	17	47.1
815	(CT) ₈ G	CTC TCT CTC TCT CTC TG	52.8	17	52.9

PCR reaksiyonları 15 µl hacimde Tablo 3.3'de belirtilen miktarlarla hazırlanmıştır. PCR döngü koşulları ise Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.3. ISSR PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
dH ₂ O	7.4 µl
10X Taq Buffer	1.5 µl (1X)
25mM MgCl ₂	1.2 µl (2 µM)
2,5mM dNTP	1.2 µl (2.5 µM)
2,5mM Primer	1 µl (2.5 µM)
Kalıp DNA	2.5 µl
Taq Polimeraz	0.2 µl
Toplam	15 µl

Tablo 3.4. ISSR PCR döngü koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Öndenatürasyon	94	4 dk	1
Denatürasyon	94	45 sn	45
Bağlanma	50-53	45 sn	
Uzama	72	90 sn	
Son Uzama	72	7 dk	1

3.7.2. RAPD PCR Analizi

Bu çalışmada daha önce laboratuvarımızda bulunan 4 adet RAPD primeri kullanılmıştır. Bitki örneklerinden elde edilen DNA'lar ve ilgili primerler ile PCR reaksiyonları kurulmuştur. Kullanılan primerler Tablo 3.5'de listelenmiştir.

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan RAPD primer listesi

Primer No	Primer dizisi	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Primer uzunluğu (bp)	G/C (%)
PM3	5'→3' TGC GCC CTT C	34	10	70
PM10	5'→3' CTG CGC TGG A	34	10	70
OPA2	5'→3' TCG CGA GCT G	34	10	70
D11	5'→3' GTC CCG ACG A	34	10	70

RAPD PCR reaksiyonları 15 µl hacimde Tablo 3.6'da belirtilen miktarlarla hazırlanmıştır. PCR döngü koşulları ise Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.6. RAPD PCR bileşenleri

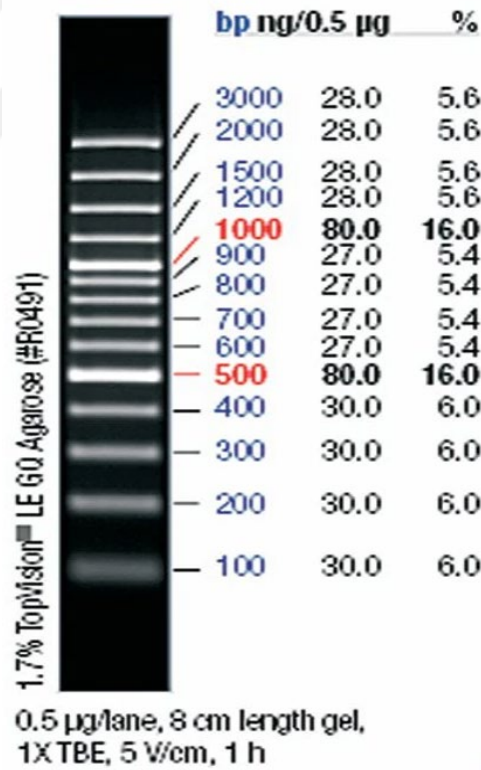
Bileşenler	Miktar
dH ₂ O	7.4 µl
10X Taq Buffer	1.5 µl (1X)
25mM MgCl ₂	1.2 µl (2 µM)
2,5mM dNTP	1.2 µl (2.5 µM)
2,5mM Primer	1 µl (2.5 µM)
Kalıp DNA	2.5 µl
Taq Polimeraz	0.2 µl
Toplam	15 µl

Tablo 3.7. RAPD PCR Döngü Koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Öndenatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	40
Bağlanma	34	1 dk	
Uzama	72	2 dk	
Son Uzama	72	7 dk	1

ISSR ve RAPD PCR analizi için steril PCR tüplerine prosedür sırasına ve miktarına göre bileşenler eklenmiştir. Kontaminasyon kontrolü için DNA içermeyen negatif kontrol her primer için ilave edilmiştir. PCR reaksiyonları Applied Biosystems Veriti gradient termal döngü cihazı ile gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri jelde yürütülene kadar buzdolabında +4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile Redsafe (İntron Bio) içeren %1,5'lik agaroz jel üzerinde ayrılmıştır. PCR ürünleri her bir kuyucuk için 6 µl ve 2 µl DNA Loading Dye (Thermo) boyası ile yüklenmiştir. Bant boyutlarının belirlenmesi için jeldeki ilk kuyucuğa 100 bç DNA Ladder Plus (Thermo) (Şekil 3.3.) 3 µl yüklenerek 100 V 40-50 dk elektroforez cihazında (Thermo, Midicell Primo) yürütülmüştür. Jeller yürütme işleminden sonra UV pro jel dökümantasyon sistemi (Uvitec, Cambridge, İngiltere) ile görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.3. Thermo GeneRuler 100 bç DNA Ladder Plus

3.7.3 PCR Sonuçlarının Yorumlanması

Her bir primer için elde edilen bantlar Total Lab CLIQS 1D Programı ile analiz edilmiştir. Bantların kontrol ve liken asidi uygulanan dozlarda var (1) veya yok (0) şeklinde sayılması ile ikili matris oluşturulmuştur. Aynı programda bu veriler kullanılarak kontrol ve dozlar arasındaki genetik benzerlik değerleri Jaccard eşitliği ile hesaplanmış, UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) metodu ile dozlar arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendrogram elde edilmiştir. Genotoksik etki, oluşturulan matris tablosundaki polimorfik bantların sayılarak genomik kalıp stabilite (GKS) yüzdesi (% GTS: Genomic Template Stability) hesaplanmıştır. Kontrol grubunun GKS yüzdesi 100 olarak kabul edilerek konsantrasyonlarda hesaplanan GKS yüzdesinin giderek artma ya da azalmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

Genomik kalıp stabilitesi (GKS) yüzdesi her birey için aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

GKS Yüzdesi: $100 - 100 \cdot a/n$

a: Her örnekteki toplam polimorfik bant sayısı

n: Kontrol grubundaki toplam bant sayısı

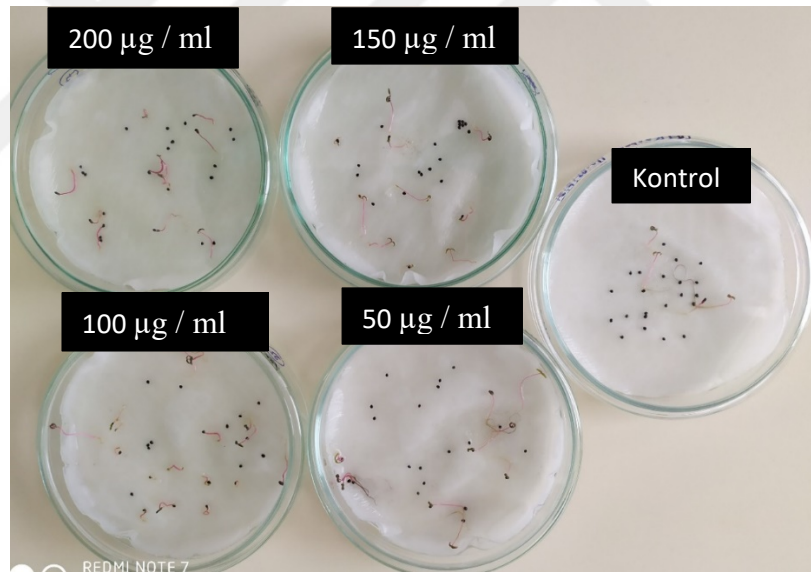
4. BULGULAR

4.1. Liken Ekstraktının Bitkilerdeki Tohum Çimlenme Üzerine Etkisi

Usnea florida total aseton ekstraktının dört farklı dozu; yabani ot örnekleri, *Amaranthus retroflexus* (horozibiği), *Portulaca oleracea* (semizotu), *Setaria verticillata* (yapışkan ot) ve kültür bitkisi örneği *Triticum aestivum* (buğday) tohumlarına uygulanmasıyla yapılan çalışmada, liken aseton ekstraktının tohumlar üzerinde dozlara bağlı olarak pozitif ya da negatif yönde etkisi olduğu görülmüştür.

Çimlenme yüzdesi, iklim kabininde çimlendirilmiş her petri kabında çimlenen tohum sayısının, toplam tohum sayısına oranının 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir (Yücel, 2000: 266).

4.1.1. Liken Ekstraktının *Amaranthus retroflexus* (Horozibiği) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

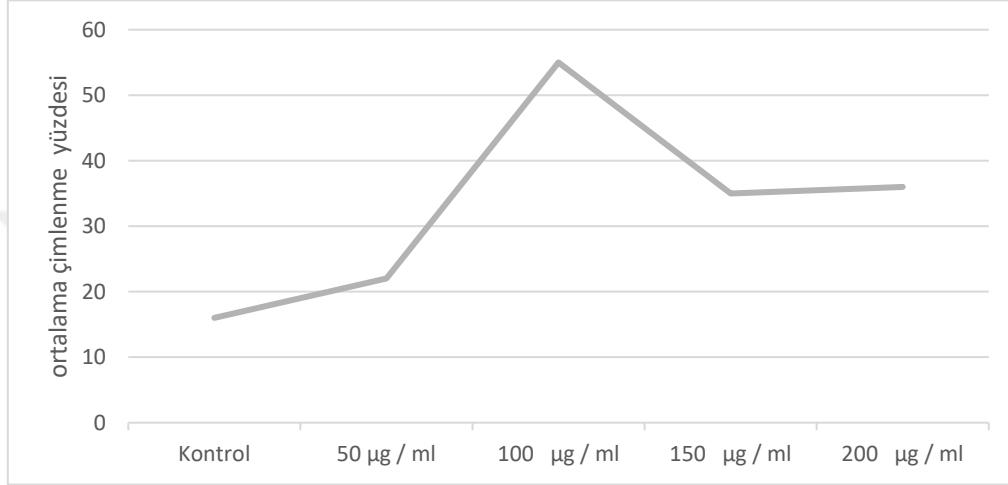


Şekil 4.1. *Usnea florida* aseton ekstraktının *A. retroflexus* tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)

U. florida total aseton ekstraktının horozibiği tohum çimlenmesi üzerindeki etkileri Şekil 4.1. ve Tablo 4.1.'de belirtilmiştir. Çimlenme yüzdesine ait grafik Şekil 4.2.'de ve istatistiksel olarak fark oluşturan varyans analizi sonuçları Tablo 4.2.'de mevcuttur.

Tablo 4.1. *Usnea florida* aseton ekstraktının *A. retroflexus* tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata)

<i>U. florida</i> / <i>A. retroflexus</i>	Çimlenme Yüzdesi (%)
Kontrol	16 $\pm$ 4,3
50 $\mu\text{g} / \text{ml}$	22 $\pm$ 6,2
100 $\mu\text{g} / \text{ml}$	55 $\pm$ 7,5
150 $\mu\text{g} / \text{ml}$	35 $\pm$ 6,6
200 $\mu\text{g} / \text{ml}$	36 $\pm$ 8,2



Şekil 4.2. *A. retroflexus* ortalama çimlenme yüzdesi grafiği

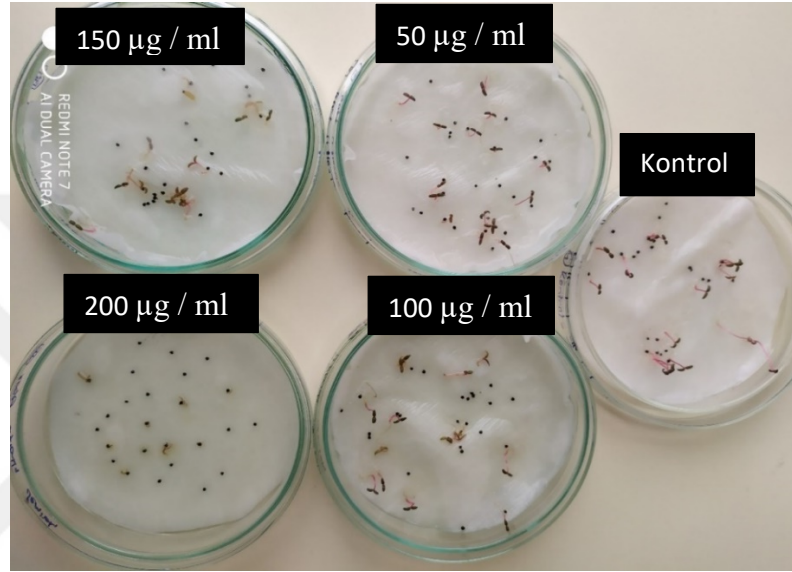
En yüksek çimlenmenin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda %55, en düşük çimlenmenin ise kontrol grubunda %16 olduğu görülmektedir (Tablo 4.1. ve Şekil 4.2). Çimlenme yüzdeleri 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda %22, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda %35 ve 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda ise %36 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre 50, 100, 150 ve 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonların çimlenme yüzdelerinin yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 4.2. Liken ekstraktının *A. retroflexus* tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları ($p < 0,05$)

	Kareler Toplamı	S.d	Kareler Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark Bulunan Konsantrasyonlar
Gruplar Arası	3627,2	4	906,8	5,045	0,009	Kontrol ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Gruplar İçi	2696,0	15	179,7			50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Toplam	6323,2	19				

Tablo 4.2.'de %95 güvenle *A. retroflexus* tohumlarının çimlenme etkisini gösteren varyans analizi sonucunda, kontrol grubu ile en fazla anlamlı farkı oluşturan konsantrasyonun 100 µg/ml olduğu ayrıca 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer konsantrasyonlar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır.

4.1.2. Liken Ekstraktının *Portulaca oleracea* (Semizotu) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

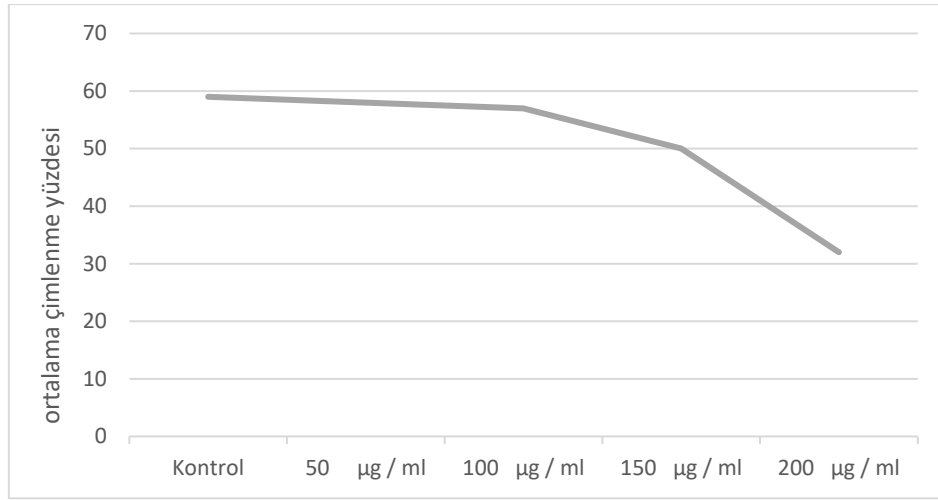


Şekil 4.3. *Usnea florida* aseton ekstraktının *P. oleracea* tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)

U. florida total aseton ekstraktının semizotu tohumları üzerindeki çimlenme etkileri Şekil 4.3. ve Tablo 4.3.'de görülmektedir. Çimlenme yüzdesine ait grafik Şekil 4.4.'de istatistiksel olarak fark oluşturan varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. *Usnea florida* aseton ekstraktının *P. oleracea* tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata)

<i>U. florida</i> / <i>P. oleracea</i>	Çimlenme Yüzdesi (%)
Kontrol	59 $\pm$ 2,5
50 µg / ml	58 $\pm$ 6,2
100 µg / ml	57 $\pm$ 3,0
150 µg / ml	50 $\pm$ 2,5
200 µg / ml	32 $\pm$ 3,6



Şekil 4.4. *P. oleracea* ortalama çimlenme yüzdesi grafiği

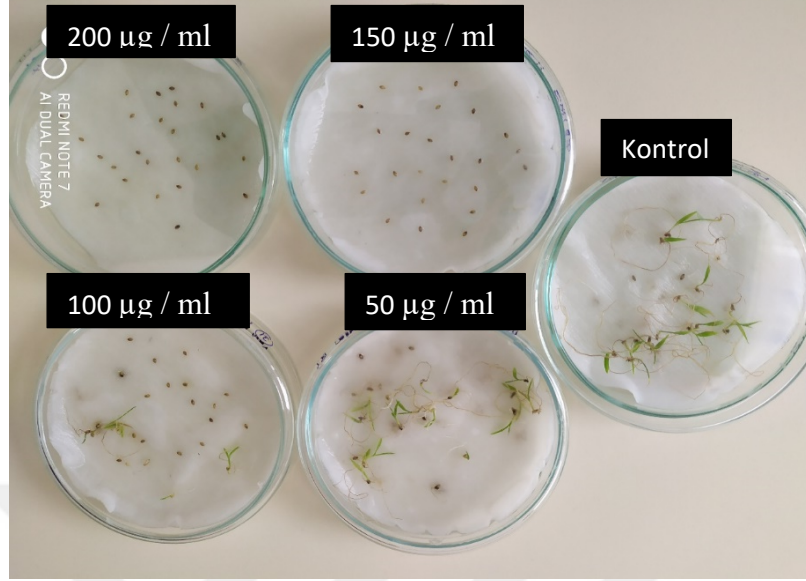
Çimlenme yüzdesinin en yüksek kontrol grubunda %59, en düşük 200 µg/ml konsantrasyonda %32 olduğu belirlenmiştir. Çimlenme yüzdesi 50 µg/ml konsantrasyonda %58, 100 µg/ml konsantrasyonda %57, 150 µg/ml konsantrasyonda %50 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4. ve Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Lichen ekstraktının *P. oleracea* tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları ($p < 0,05$)

	Kareler Toplamı	S.d	Kareler Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark Bulunan Konsantrasyonlar
Gruplar Arası	2043,2	4	510,8	8,628	0,001	Kontrol ve 200 µg/ml
Gruplar İçi	888,0	15	59,2			50 µg/ml ve 200 µg/ml
						100 µg/ml ve 200 µg/ml
						150 µg/ml ve 200 µg/ml
Toplam	2931,2	19				

Tablo 4.4.'de %95 güvenle *P. oleracea* tohumlarının çimlenme etkisini gösteren varyans analizi sonucunda, kontrol grubu ile en fazla anlamlı farkı oluşturan 200 µg/ml konsantrasyonu olduğu ortaya çıkmıştır. Kontrol grubu ile; 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarının aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca konsantrasyonların kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda 200 µg/ml ve 50 µg/ml, 200 µg/ml ve 100 µg/ml, 200 µg/ml ve 150 µg/ml konsantrasyonlarının arasında anlamlı fark olduğu varyans analizinde belirlenmiştir.

4.1.3. Liken Ekstraktının *Setaria verticillata* (Yapışkan Ot) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

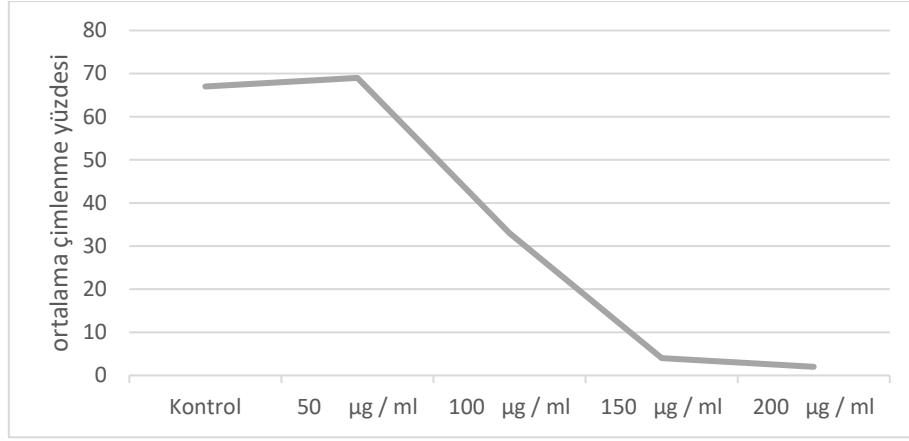


Şekil 4.5. *Usnea florida* aseton ekstraktının *S. verticillata* tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)

U. florida total aseton ekstraktının yapışkan ot tohumları üzerindeki çimlenme etkileri Şekil 4.5. ve Tablo 4.5.'de görülmektedir. Çimlenme yüzdesine ait grafik Şekil 4.6.'da istatistiksel olarak fark oluşturan varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.6.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. *Usnea florida* aseton ekstraktının *S. verticillata* tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata)

<i>U. florida</i> / <i>S. Verticillata</i>	Çimlenme Yüzdesi (%)
Kontrol	$67 \pm 3,0$
50 µg / ml	$69 \pm 7,5$
100 µg / ml	$33 \pm 5,9$
150 µg / ml	$4 \pm 2,8$
200 µg / ml	$2 \pm 2,0$



Şekil 4.6. *S. verticillata* ortalama çimlenme yüzdesi grafiği

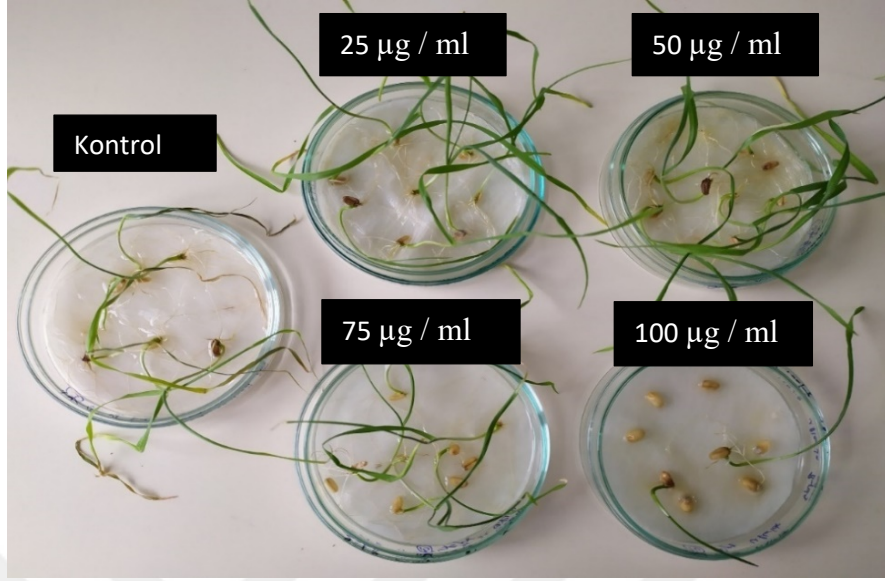
Çimlenme yüzdesinin en yüksek 50 µg/ml konsantrasyonda %69 ve en düşük 200 µg/ml konsantrasyonda %2 olduğu belirlenmiştir. Çimlenme yüzdesi kontrol grubunda %67, 100 µg/ml konsantrasyonda %33, 150 µg/ml konsantrasyonda %4 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.5. ve Şekil 4.6.).

Tablo 4.6. Liken ekstraktının *S. verticillata* tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları (p<0,05)

	Kareler Toplamı	S.d	Kareler Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark Bulunan Konsantrasyonlar
Gruplar Arası	16936,0	4	4234,0	46,562	0,000	Kontrol ve 100 µg/ml Kontrol ve 150 µg/ml Kontrol ve 200 µg/ml
Gruplar İçi	1364,0	15	90,9			50 µg/ml ve 100 µg/ml 50 µg/ml ve 150 µg/ml 50 µg/ml ve 200 µg/ml
Toplam	18300,0	19				100 µg/ml ve 150 µg/ml 100 µg/ml ve 200 µg/ml

Tablo 4.6.' da %95 güvenle *S. verticillata* tohumlarının çimlenme etkisini gösteren varyans analizi sonucunda kontrol grubu ile en fazla anlamlı farkı oluşturan konsantrasyon 200 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve 100 µg/ml, kontrol ve 150 µg/ml konsantrasyonları arasında da anlamlı fark olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca konsantrasyonların kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda; 50 µg/ml ve 100 µg/ml, 50 µg/ml ve 150 µg/ml, 50 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonları ve 100 µg/ml ile 150 µg/ml ve yine 100 µg/ml ile 200 µg/ml konsantrasyonları arasında anlamlı fark olduğu hesaplanmıştır.

4.1.4. Liken Ekstraktının *Triticum aestivum* (Buğday) Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

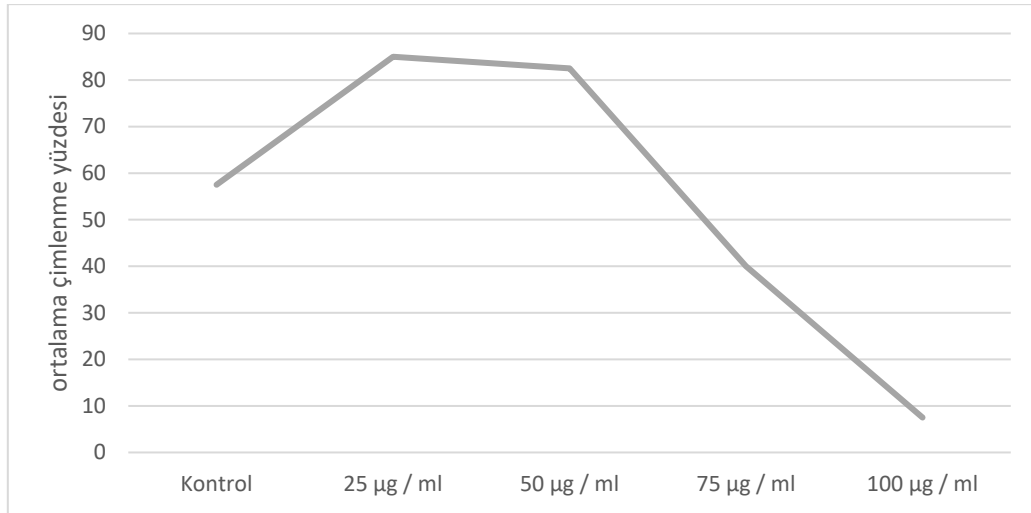


Şekil 4.7. *Usnea florida* aseton ekstraktının *T. aestivum* tohum çimlenme üzerindeki etkileri (14. Gün)

U. florida total aseton ekstraktının buğday tohumları üzerindeki çimlenme etkileri Şekil 4.7. ve Tablo 4.7.'de görülmektedir. Çimlenme yüzdesine ait grafik Şekil 4.8.'de istatistiksel olarak fark oluşturan varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. *Usnea florida* aseton ekstraktının *T. aestivum* tohumları üzerindeki çimlenme yüzdesi (Ortalama $\pm$ standart hata)

<i>U. florida</i> / <i>T. aestivum</i>	Çimlenme Yüzdesi (%)
Kontrol	57,5 $\pm$ 4,7
25 μg / ml	85 $\pm$ 6,4
50 μg / ml	82,5 $\pm$ 4,7
75 μg / ml	40 $\pm$ 10,8
100 μg / ml	7,5 $\pm$ 5,0



Şekil 4.8. *T. aestivum* ortalama çimlenme yüzdesi grafiği

Çimlenme yüzdesinin en yüksek 25 µg/ml %85, en düşük 100 µg/ml konsantrasyonda %7,5 olduğu belirlenmiştir. Çimlenme yüzdesi kontrol grubunda %57,5 değerinde ortaya çıkmıştır. 50 µg/ml konsantrasyonda %82,5 ve 75 µg/ml konsantrasyonda ise %40 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.7. ve Şekil 4.8.).

Tablo 4.8. Liken ekstraktının *T. aestivum* tohumları üzerindeki çimlenme etkisinin konsantrasyonlar arasındaki farklılığın belirlenmesinde varyans analizi sonuçları (p<0,05)

	Kareler Toplamı	S.d	Kareler Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark Bulunan Konsantrasyonlar
Gruplar Arası	10194,4	4	2548,6	13,253	0,000	Kontrol ve 25 µg/ml Kontrol ve 50 µg/ml Kontrol ve 100 µg/ml
Gruplar İçi	2500,0	15	192,3			25 µg/ml ve 75 µg/ml 25 µg/ml ve 100 µg/ml 50 µg/ml ve 75 µg/ml 50 µg/ml ve 100 µg/ml
Toplam	12694,4	19				75 µg/ml ve 100 µg/ml

Tablo 4.8.' de %95 güvenle *T. aestivum* tohumlarının çimlenme etkisini gösteren varyans analizi sonucunda, kontrol grubu ile en fazla anlamlı farkı oluşturan konsantrasyon 100 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve 25 µg/ml, kontrol ve 50 µg/ml konsantrasyonları arasında da anlamlı fark olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca konsantrasyonların kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda; 25 µg/ml ve 75 µg/ml, 25 µg/ml ve 100 µg/ml, 50 µg/ml ve 75 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonları ve son olarak 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonları arasında anlamlı fark olduğu varyans analizi ile hesaplanmıştır.

4.2. DNA İzolasyonu Sonucu DNA Miktar ve Saflık Ölçümü

Çalışmamızda dört bitki türünden dozlara göre CTAB yöntemiyle 19 farklı DNA izole edilmiştir (Yapışkan ot yabani ot türünde 200 µg/ml konsantrasyonda yeterli miktarda örnek çimlenmediği için DNA izolasyonu yapılmamıştır.). İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.9.'da verilmiştir.

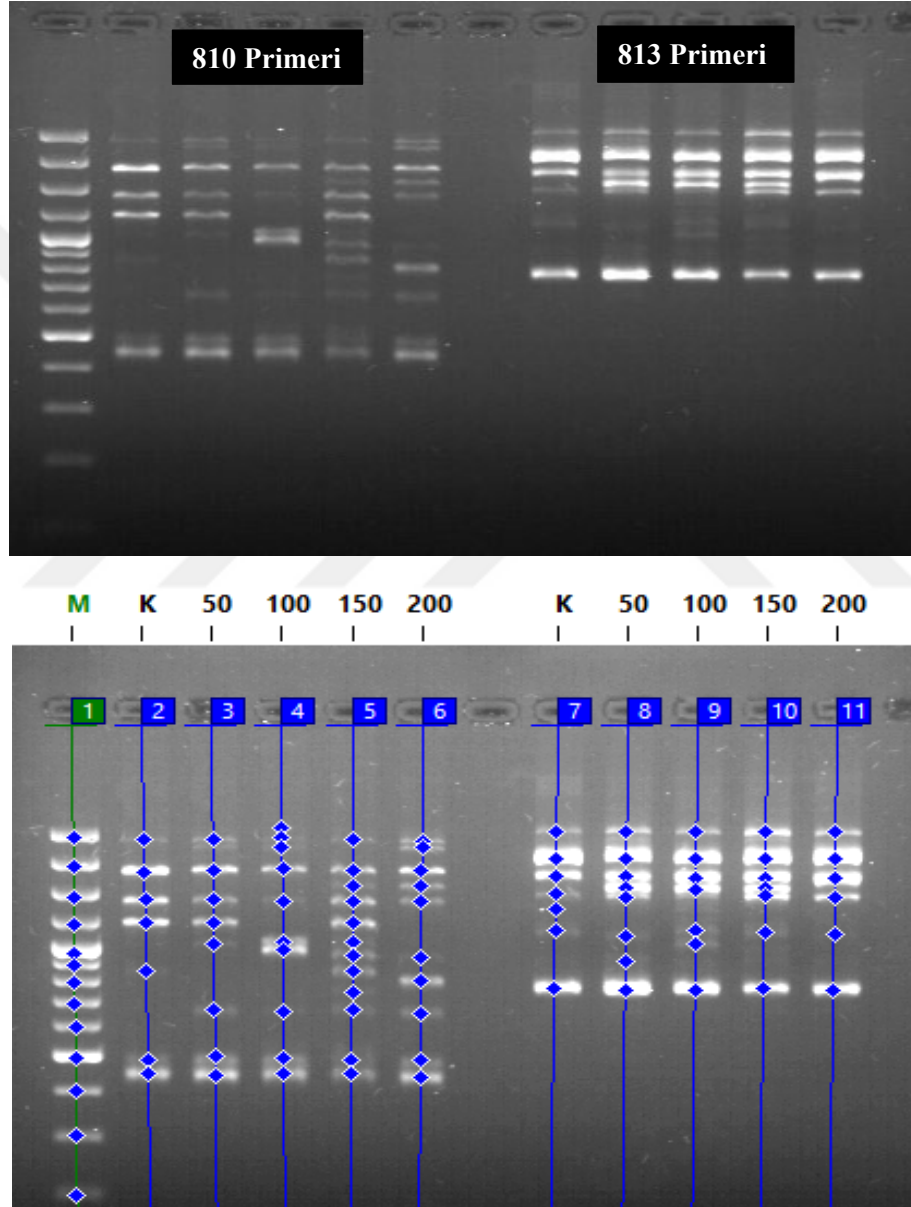
Tablo 4.9. Yabani otlardan ve kültür bitkisinden izole edilen DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları

Örnek İsimleri	DNA Miktarı (ng/ml)	DNA Saflığı (260/280 nm)
Kontrol Horozibiği	151,2	2,02
50 µg Horozibiği	82,3	1,98
100 µg Horozibiği	98,3	2,01
150 µg Horozibiği	127,8	1,99
200 µg Horozibiği	88,5	2,01
Kontrol Semizotu	412,4	2,05
50µg Semizotu	259,9	2,03
100 µg Semizotu	714,9	1,98
150 µg Semizotu	516,6	2,02
200 µg Semizotu	324,2	2,02
Kontrol Yapışkan Ot	264,3	1,90
50 µg Yapışkan Ot	407,1	1,89
100 µg Yapışkan Ot	273,2	1,86
150 µg Yapışkan Ot	251,6	1,83
Kontrol Buğday	907,9	2,07
25 µg Buğday	927,4	2,09
50 µg Buğday	506,5	2,01
75 µg Buğday	717,2	2,07
100 µg Buğday	836,1	2,05

4.3. ISSR ve RAPD PCR Analizleri

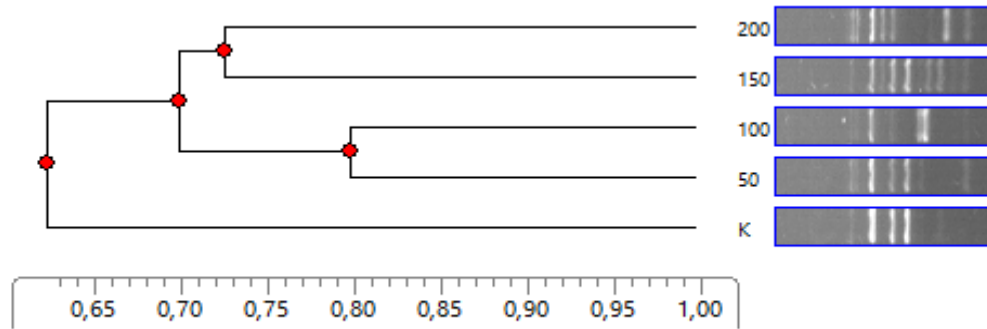
4.3.1. *Amaranthus retroflexus* (Horozibiği) ISSR ve RAPD PCR Analizleri

Usnea florida total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile 4 adet ISSR ve 4 adet RAPD primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.9. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının ISSR 810 ve 813 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

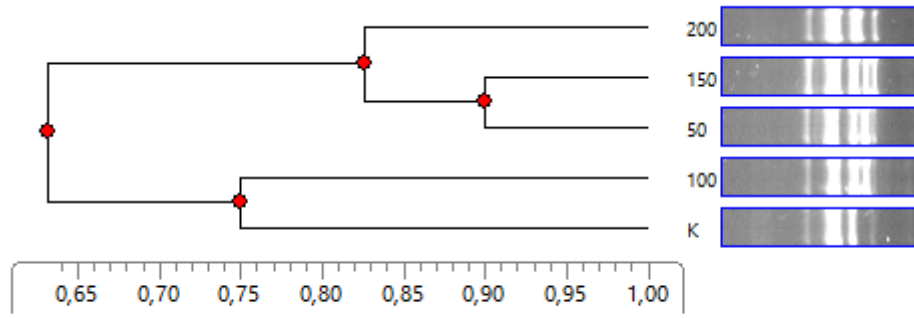
ISSR 810 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 15 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 430 bp ile 3300 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.9.). Kontrol grubunda toplam 7 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 8, 7, 12 ve 10 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 16 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 4 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 3300 bp büyüklüğündeki bant 100 µg/ml konsantrasyonda; 50 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonda; 800 bp büyüklüğündeki bant 200 µg/ml konsantrasyonda; 1100 bp büyüklüğündeki bant 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonda; 2600 bp büyüklüğündeki bant 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda; 1650 bp büyüklüğündeki bant 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonda; 1100 bp büyüklüğündeki bant 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 650 bp büyüklüğündeki bant 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1200 bp büyüklüğündeki bant 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve 860 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca 1860 bp büyüklüğündeki bandın liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı ve kontrol grubunda bulunan 2900 bp büyüklüğündeki bandın yoğunluğunun 200 µg/ml konsantrasyonda arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. ISSR-PCR 810 primerinden oluşan dendogram

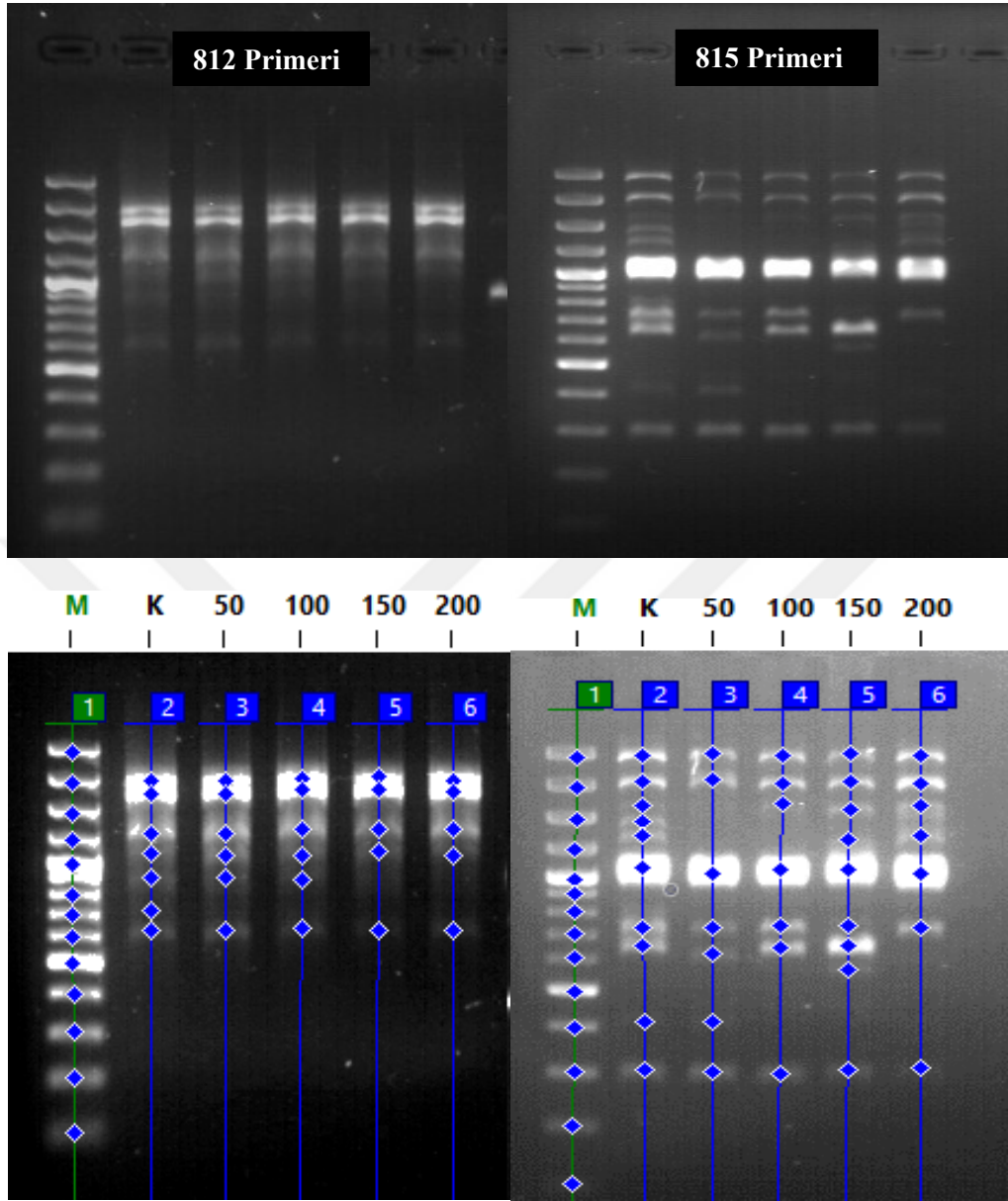
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.10.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

ISSR 813 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 12 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 730 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.9.). Kontrol grubunda toplam 7 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 9, 9, 9 ve 6 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 7 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 2 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 920 ve 2700 bp büyüklüğündeki bantlar 50 µg/ml konsantrasyonda; 1550 bp büyüklüğündeki bantlar 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda; 1000 bp büyüklüğündeki bantlar ise 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1300 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca 1500 ve 3200 bp büyüklüğündeki bantların liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve kontrol grubunda bulunan 1700 bp büyüklüğündeki bandın 200 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. ISSR-PCR 813 primerinden oluşan dendogram

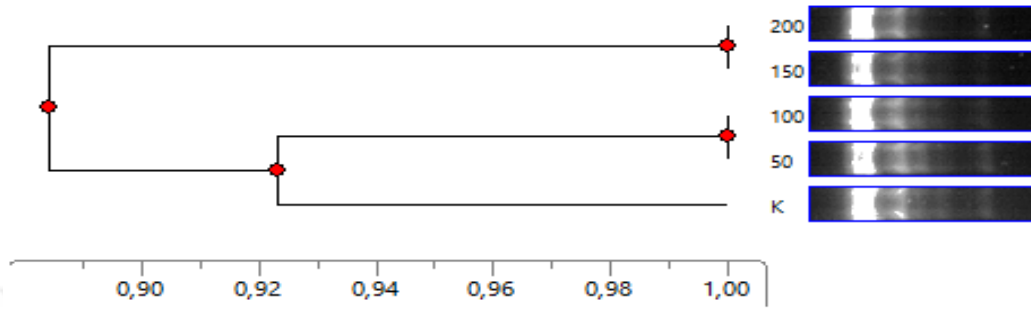
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.11.) göre kontrol grubunun 100 µg/ml konsantrasyonla bir arada kümelendiği gözlemlenmektedir. 50, 150 ve 200 µg/ml olan konsantrasyonlar ise ikinci bir kümede toplanmıştır. 50 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarının birlikte gruplanması benzerlik oranlarının yüksek olduğu sonucunu göstermektedir.



Şekil 4.12. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının ISSR 812 ve 815 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

ISSR 812 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 7 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 700 bp ile 2100 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.12.). Kontrol grubunda toplam 7 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 6, 6, 5 ve 5 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 6 tanesi kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. ISSR 812 primerinde kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bant olmamıştır.

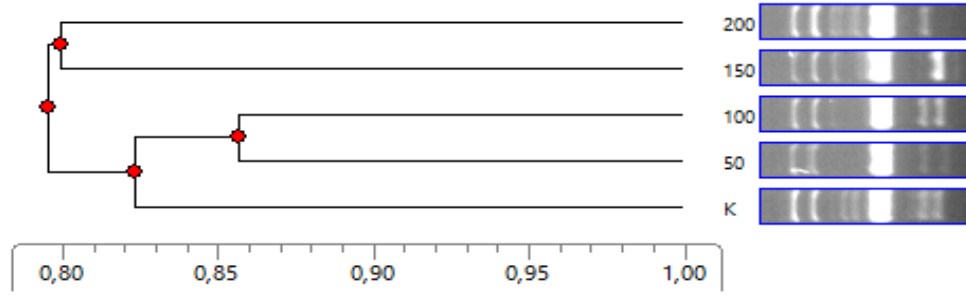
Kontrol grubunda var olan 820 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve 950 bp büyüklüğündeki bant 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca 720 ve 1300 bp büyüklüğündeki bantların liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13. ISSR-PCR 812 primerinden oluşan dendogram

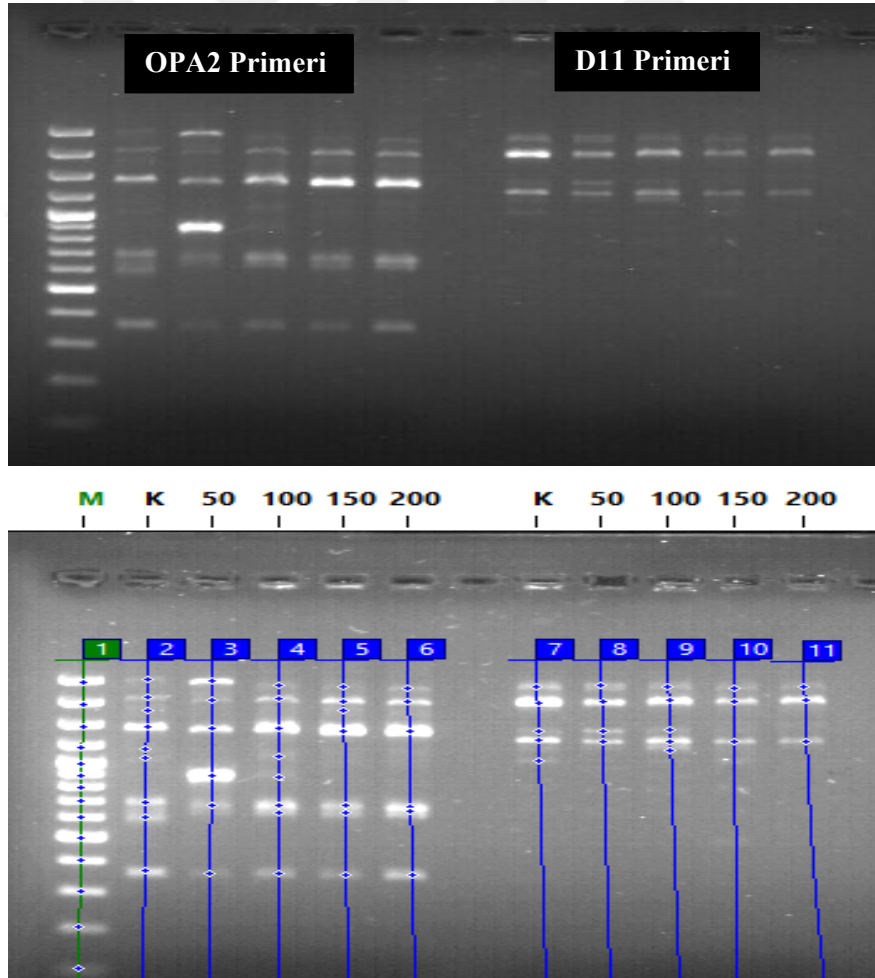
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.13.) göre kontrol grubunun düşük konsantrasyonlarla aynı yerde kümелendiği görülmüştür. Şekil 4.13.'ya göre 50 ve 100 µg/ml ile 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarının kendi aralarında benzerlik yönünden aynı oldukları ortaya çıkmıştır. Yüksek konsantrasyonların ayrı dal oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

ISSR 815 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 11 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 300 bp ile 3100 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.12.). Kontrol grubunda toplam 10 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 7, 7, 8 ve 7 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 1 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 12 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan 1600 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1450 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve 1320 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 1650 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda; 410 bp büyüklüğündeki bant 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 640 bp büyüklüğündeki bant 200 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1030 ve 2150 bp büyüklüğündeki bantların 200 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



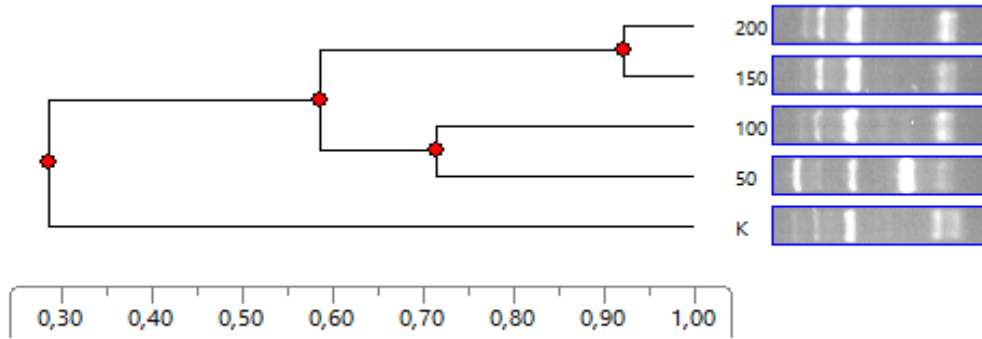
Şekil 4.14. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.14.) göre yüksek konsantrasyonların dallanmalar oluşturup kontrol grubu ve düşük konsantrasyonlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Kontrol grubu ile 150 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının benzerlik oranlarının düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.15. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının RAPD OPA2 ve D11 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

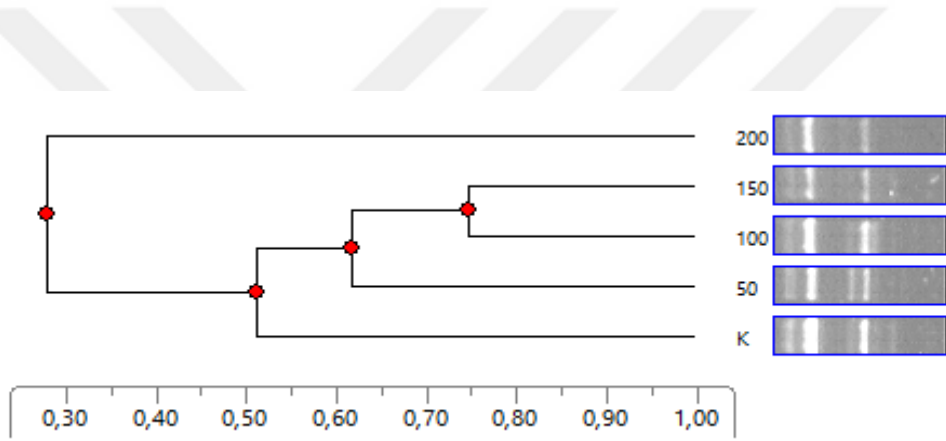
RAPD OPA2 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 12 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 340 bp ile 3100 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.15.). Kontrol grubunda toplam 9 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 6, 8, 7 ve 6 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 8 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 17 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan 650 ve 2800 bp büyüklüğündeki bantlar 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve 900 bp büyüklüğündeki bant ise 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 600 ve 1200 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve 1800 bp büyüklüğündeki bant 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonda; 3100 bp büyüklüğündeki bant 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonda son olarak 1000 bp büyüklüğündeki bant 50, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca 690, 1500 ve 2300 bp büyüklüğündeki bantların liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve kontrol grubunda bulunan 3100 bp büyüklüğündeki bandın 50 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.16. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendrogram

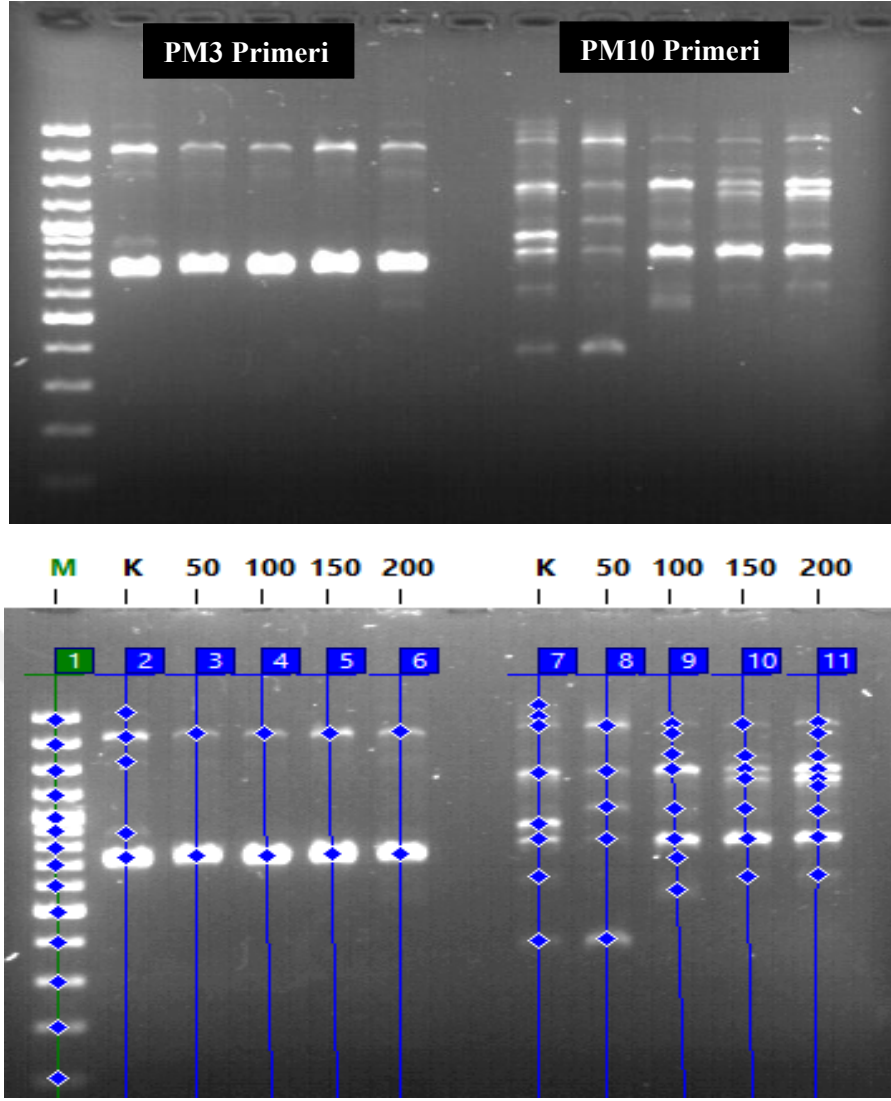
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.16.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Buna göre kontrol grubu ve liken ekstraktı uygulanan konsantrasyonların benzerlik oranlarının düşük olduğu ve sonuçların anlamlı olduğu ortaya çıkmaktadır. 50 ve 100 µg/ml ile 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlar ayrı ayrı alt kümelenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak primer bağlanma bölgelerindeki değişikliklerin arttığı ifade edilebilir.

RAPD D11 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 6 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 1000 bp ile 2800 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.15.). Kontrol grubunda toplam 5 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 4, 5, 3 ve 3 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 1 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 6 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan 1200 bp büyüklüğündeki bant 100 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Ayrıca kontrol grubunda var olan 1000 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve 1430 bp büyüklüğündeki bant 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. 1300, 2100 ve 2800 bp büyüklüğündeki bantların liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



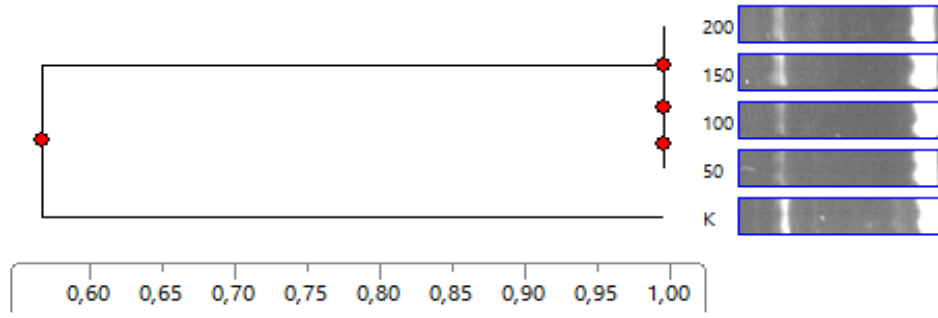
Şekil 4.17. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.17.) göre 200 µg/ml konsantrasyonunun ayrı dallanma yaptığı gözlemlenmektedir. Yüksek konsantrasyonun kontrol ve diğer dozlardan ayrılması benzerliğinin azaldığını ifade etmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.18. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği bitki DNA'larının RAPD PM3 ve PM10 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

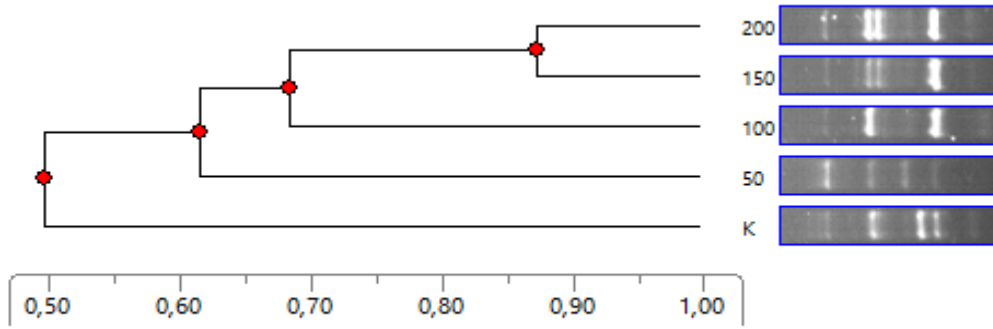
RAPD PM3 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 5 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 750 bp ile 3100 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.18.). Kontrol grubunda toplam 5 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 2, 2, 2 ve 2 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 12 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. RAPD PM3 primerinde kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bant olmamıştır. Kontrol grubunda var olan 900, 1600 ve 3100 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca 850 bp büyüklüğündeki bandın liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.19. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.19.) göre kontrol grubunun konsantrasyonlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Liken ekstraktının tüm konsantrasyonlarındaki bant profili aynı olduğundan % 100 benzerlikle bir arada kümelenmişlerdir.

RAPD PM10 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen horozibiği fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 15 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 400 bp ile 3600 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.18.). Kontrol grubunda toplam 8 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 5, 8, 7 ve 9 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 14 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 17 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan 580 ve 740 bp büyüklüğündeki bantlar 100 µg/ml konsantrasyonda; 1300 bp büyüklüğündeki bant ise 200 µg/ml konsantrasyonda; 2400 bp büyüklüğündeki bant 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda; 1400 bp büyüklüğündeki bant 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda; 700 bp büyüklüğündeki bant ise 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 1100 bp büyüklüğündeki bant 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 950, 3150 ve 3600 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda; 640 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda ve 400 bp büyüklüğündeki bant 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca 850 ve 1500 bp büyüklüğündeki bantların liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.20. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.20.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu ile konsantrasyonlar arasındaki benzerlik oranının düşük olduğu ortaya çıkmıştır.

Yapılan ISSR ve RAPD PCR analizleri sonrasında her primer için örneklerin bant profilleri kontrolün bant profilleriyle karşılaştırılarak polimorfizm hesaplamaları yapılmıştır. Kontrolde var olup dozlarda bulunmayan ve/veya kontrole göre dozlarda yeni oluşan bantlar polimorfik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.10.)

Tablo 4.10. *A. retroflexus* bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri

Primer ISSR RAPD	Kontrol Toplam Bant Sayısı	50 µg		100 µg		150 µg		200 µg	
		a	b	a	b	a	b	a	b
810	7	2	1	5	2	5	0	4	1
813	7	3	1	2	0	2	0	0	1
812	7	0	1	0	1	0	2	0	2
815	10	0	3	0	3	1	3	0	3
OPA2	9	1	4	3	4	2	4	2	5
D11	5	0	1	1	1	0	2	0	2
PM3	5	0	3	0	3	0	3	0	3
PM10	8	1	4	5	5	3	4	5	4
a+b	58	25		35		28		32	
GKS		%56,9		%39,7		%51,7		%44,9	

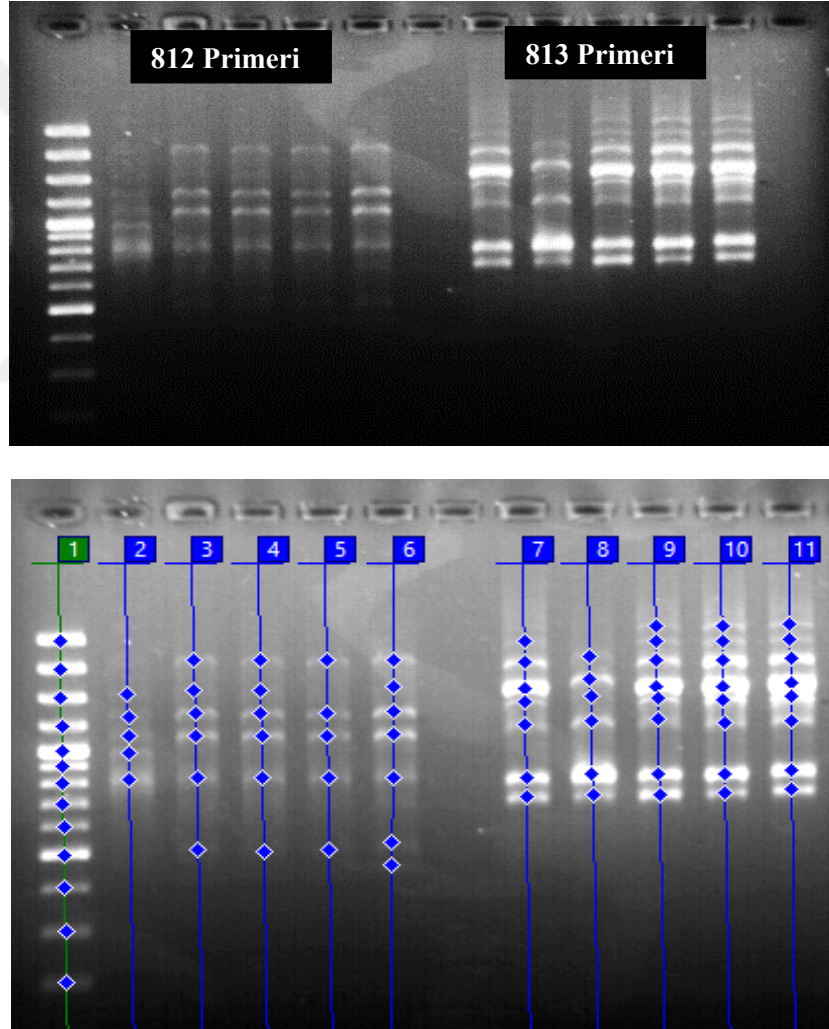
a: Kontrole göre yeni oluşan bant sayısı, b: Kontrole göre kaybolan bant sayısı,

a+b: Polimorfik bant sayısı

ISSR ve RAPD analizi sonuçlarına göre genomik kalıp stabilitesi değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerlere göre *Usnea florida* total aseton ekstraktı uygulanan horozibiği yabani ot türünde en yüksek GKS değeri 50 µg/ml konsantrasyonda %56,9 ve en düşük GKS değeri 100 µg/ml konsantrasyonda %39,7 olarak hesaplanmıştır. GKS değerleri sırasıyla; 150 µg/ml konsantrasyon için %51,7 ve 200 µg/ml konsantrasyon için %44,9 olarak bulunmuştur (Tablo 4.10.).

4.3.2. *Portulaca oleracea* (Semizotu) ISSR ve RAPD PCR Analizleri

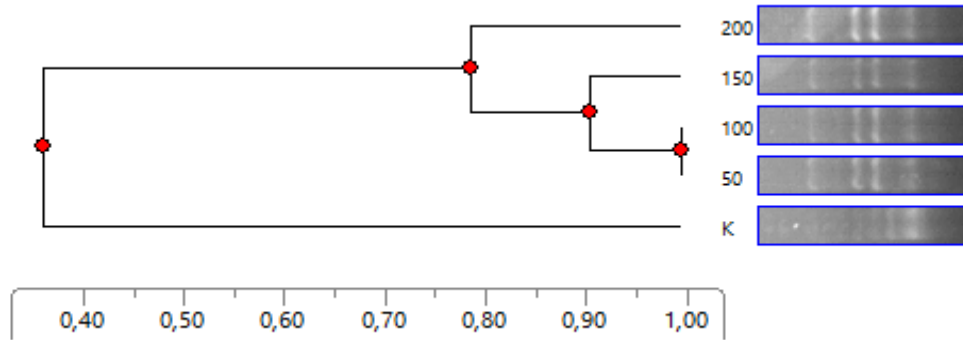
Usnea florida total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile 4 adet ISSR ve 4 adet RAPD primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.21. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının ISSR 812 ve 813 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

ISSR 812 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 9 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 470 bp ile 2290 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.21.). Kontrol grubunda toplam 5 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 6, 6, 5 ve 7 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 9 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 5 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

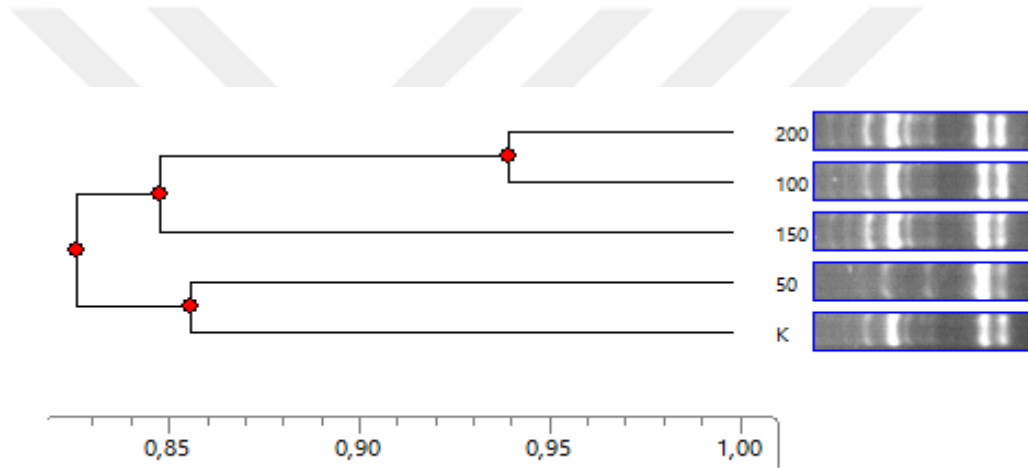
Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 2290 bp büyüklüğündeki bantlar 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda; 520 bp büyüklüğündeki bant 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 540 ve 470 bp büyüklüğündeki bantlar 200 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 990 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve 1550 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1300 ve 1120 bp büyüklüğündeki bantların 200 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı ve 820 bp büyüklüğündeki bandın liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.22. ISSR-PCR 812 primerinden oluşan dendrogram

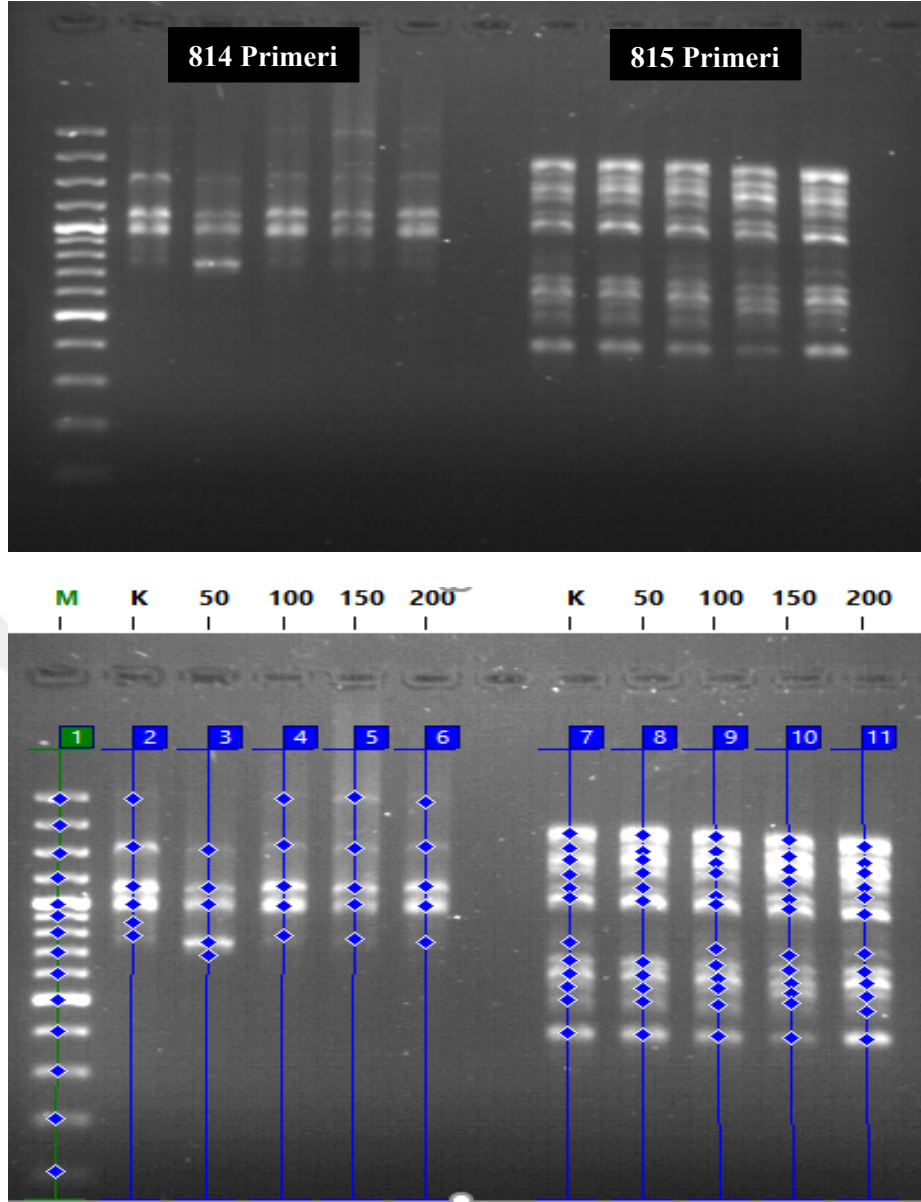
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.22.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Buna göre kontrol grubu ve konsantrasyonların benzerlik oranlarının düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

ISSR 813 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 8 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 730 bp ile 3500 bp arasında değişmektedir. (Şekil 4.21.) Kontrol grubunda toplam 7 sayıda bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 6, 8, 8 ve 8 sayıda bant oluşmuştur. Bu bantlardan 3 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 1 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 3500 bp büyüklüğündeki bant 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda bulunan 3000 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 750 ve 850 bp büyüklüğündeki bantların liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.23. ISSR-PCR 813 primerinden oluşan dendrogram

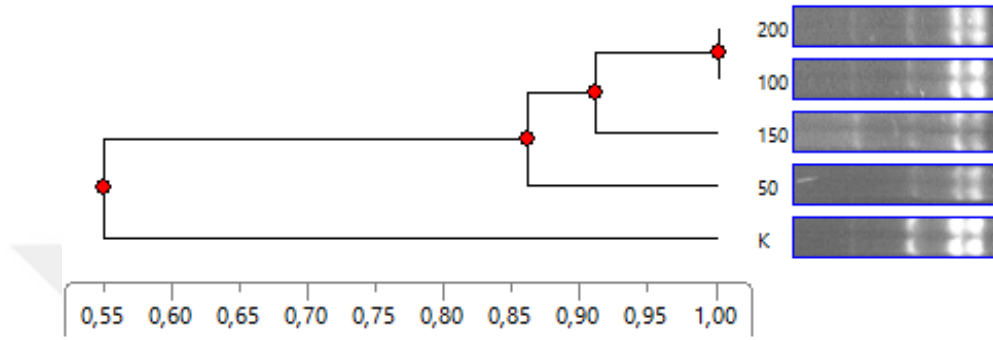
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.23.) göre kontrol grubunun düşük konsantrasyonla dallanma yaptığı sonucu ortaya çıkmıştır. Dendrograma göre kontrol grubu ile 50 µg/ml konsantrasyonu aynı dalda kümelenirken 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarının bir arada kümelandikleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.24. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının ISSR 814 ve 815 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

ISSR 814 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 8 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 650 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.24.). Kontrol grubunda toplam 6 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 5, 5, 5 ve 5 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 2 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 6 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

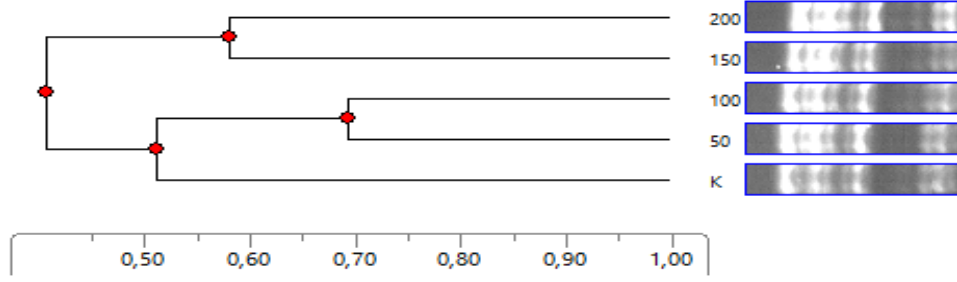
Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 690 ve 750 bp büyüklüğündeki bantlar 50 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda bulunan 780 ve 3000 bp büyüklüğündeki bantlar 50 µg/ml konsantrasyonda; 850 bp büyüklüğündeki bant ise tüm konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1000, 1120 ve 1550 bp büyüklüğündeki bantların liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.25. ISSR-PCR 814 primerinden oluşan dendrogram

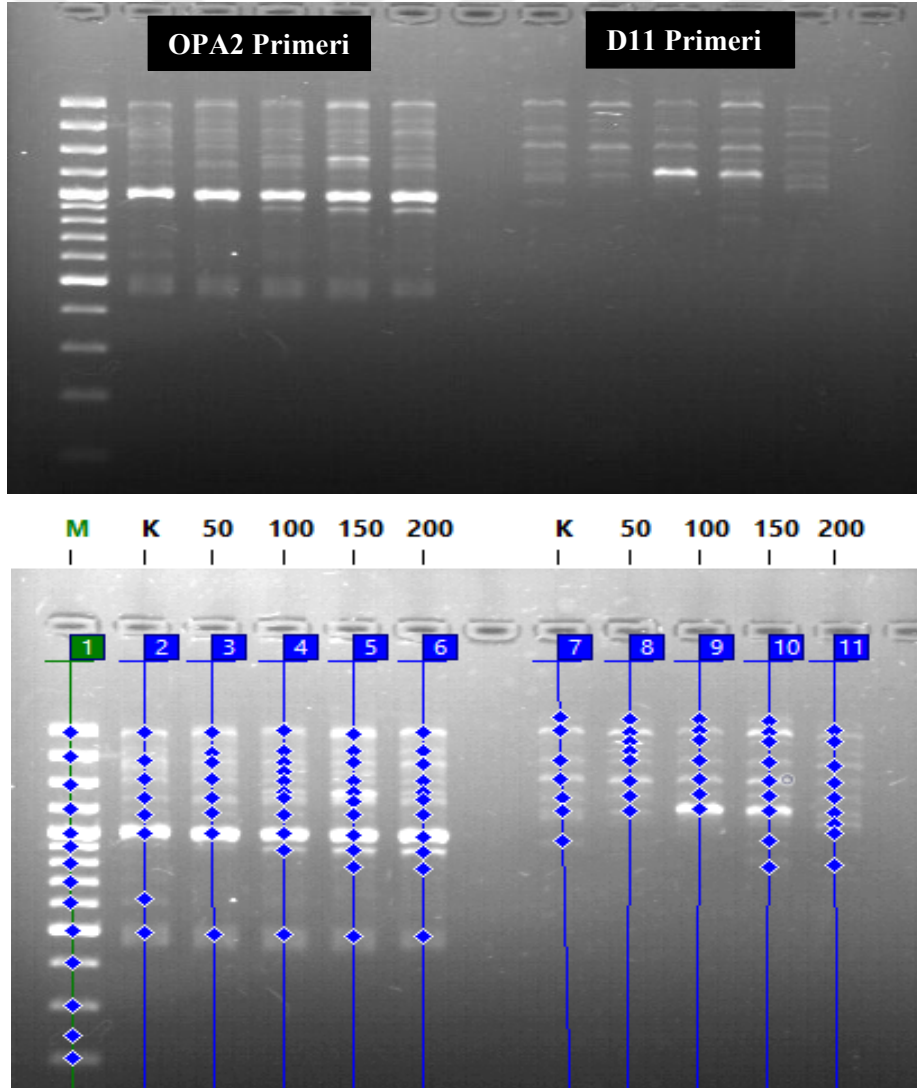
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.25.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Dendrograma göre konsantrasyonlar ile kontrol grubunun benzerlik oranının düşük olduğu ortaya çıkmıştır.

ISSR 815 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 12 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 500 bp ile 2800 bp arasında değişmektedir. (Şekil 4.24.) Kontrol grubunda toplam 12 sayıda bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 11, 12, 11 ve 11 sayıda bant oluşmuştur. Bu bantlardan 3 tanesi kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. ISSR 815 primerinde kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bant olmamıştır. Kontrol grubunda var olan 870 bp büyüklüğündeki bant ise 50 µg/ml konsantrasyonda ve 600 bp büyüklüğündeki bant 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 820 bp büyüklüğündeki bandın yoğunluğunun 200 µg/ml konsantrasyonda arttığı ve 1300 bp büyüklüğündeki bandın yoğunluğunun liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.26. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendrogram

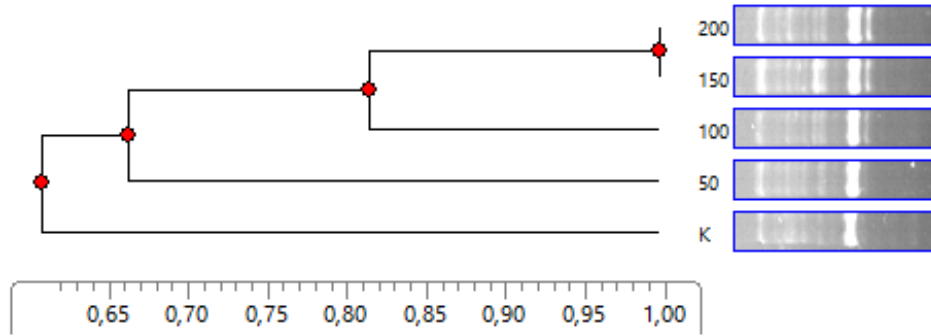
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.26.) göre kontrol grubunun 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlar ile aynı kümede ama farklı dallandığı görülmüştür. 150 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının dendrogramda ayrı kümелendiği ve kontrol grubu ile benzerlik oranlarının düşük olduğu ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.27. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının RAPD OPA2 ve D11 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

RAPD OPA2 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 13 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 480 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.27.). Kontrol grubunda toplam 8 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 8, 11, 11 ve 11 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 13 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 4 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 1700 bp büyüklüğündeki bantlar 100 µg/ml konsantrasyonda; 770 bp büyüklüğündeki bant 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonda; 870 ve 1400 bp büyüklüğündeki bantlar 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 2200 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 610 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 3000 bp büyüklüğündeki bandın liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.

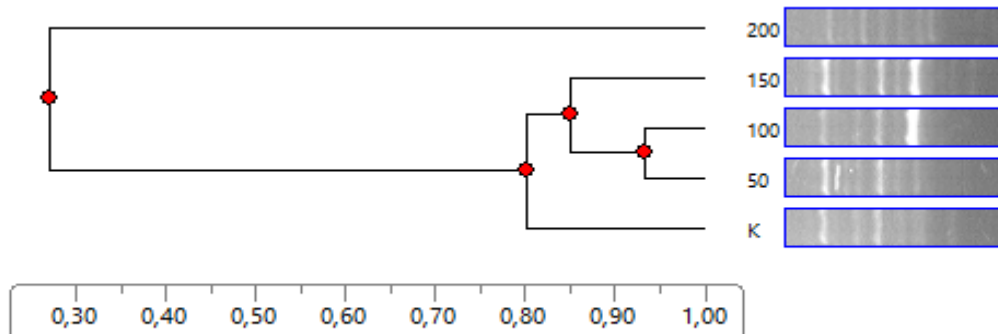


Şekil 4.28. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.28.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca kontrol grubu ile 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarının benzerlik oranlarının düşük olduğu ortaya çıkmıştır.

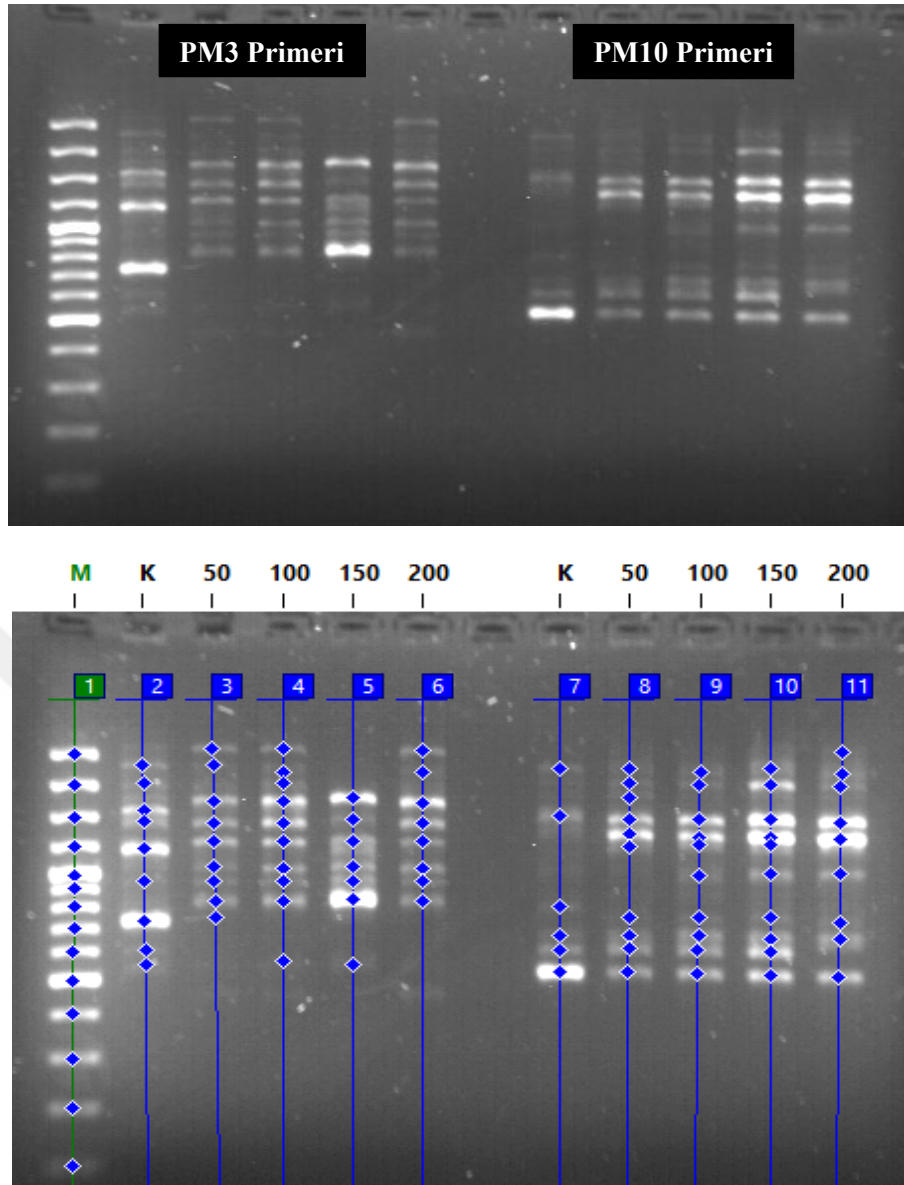
RAPD D11 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 13 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 750 bp ile 3500 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.27.). Kontrol grubunda toplam 7 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 8, 7, 9 ve 9 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 10 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 5 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 2200 bp büyüklüğündeki bant ise 50 µg/ml konsantrasyonda; 1000, 1100 ve 1800 bp büyüklüğündeki bantlar 200 µg/ml konsantrasyonda; 785 bp büyüklüğündeki bant 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 2500 bp büyüklüğündeki bant 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır.

Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1900 ve 3500 bp büyüklüğündeki bantlar 200 µg/ml konsantrasyonda ve 940 bp büyüklüğündeki bant 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1200 bp büyüklüğündeki bandın liken ekstraktı uygulanan 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda yoğunluğunun arttığı; 1600 ve 3000 bp büyüklüğündeki bantlarının ise 200 µg/ml' de yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.29. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendrogram

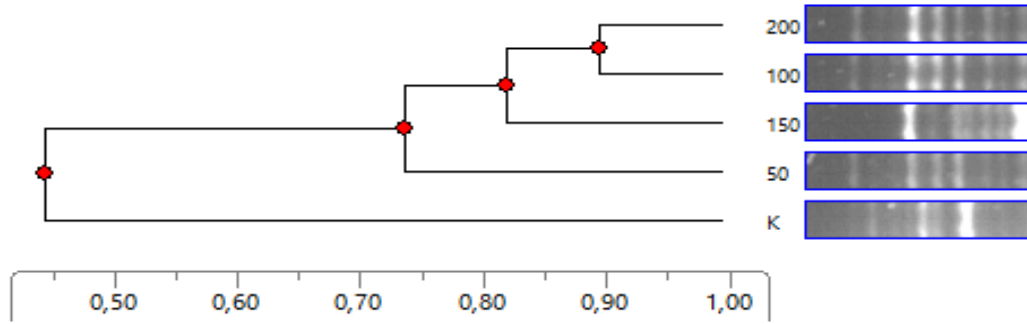
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.29.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Uygulanan yüksek konsantrasyonun ayrı bir dallanma yapması kontrol grubu ve diğer konsantrasyonlar ile benzerlik oranlarının düşük olduğunu göstermektedir. *Usnea florida* total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.30. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen semizotu bitki DNA'larının RAPD PM3 ve PM10 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

RAPD PM3 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 15 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 450 bp ile 3200 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.30.). Kontrol grubunda toplam 10 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 8, 10, 8 ve 9 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 16 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 21 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 450 bp büyüklüğündeki bant 200 µg/ml konsantrasyonda; 830, 1050, 1200 bp büyüklüğündeki bantlar 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 3200 bp büyüklüğündeki bantlar 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır.

Ayrıca kontrol grubunda var olan 2600 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonda; 550 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda; 2100 bp büyüklüğündeki bant 50, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda; 1150 bp büyüklüğündeki bant ise 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 600, 730 ve 1600 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Kontrolde bulunan 1700 bp büyüklüğündeki bandın 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda yoğunluğunun artışı gözlemlenmiştir.

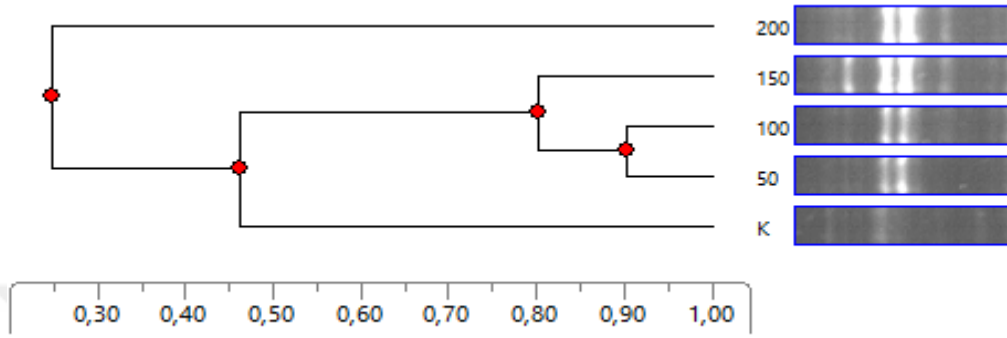


Şekil 4.31. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.31.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Dendograma göre kontrol grubu ile 200 µg/ml konsantrasyonunun benzerlik oranının düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

RAPD PM10 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen semizotu fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 13 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 500 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.30.). Kontrol grubunda toplam 6 adet bant oluşurken 50, 100, 150 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla 10, 10, 10 ve 9 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 20 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 5 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 150 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda; 3000 bp büyüklüğündeki bant 200 µg/ml konsantrasyonda; 1000 bp büyüklüğündeki bant 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda; 1200 bp büyüklüğündeki bant 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda; 750, 1300 ve 2100 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır.

Ayrıca kontrol grubunda var olan 800 bp büyüklüğündeki ban liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda; 600 bp büyüklüğündeki bant 200 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Kontrol grubunda bulunan 1500 bp büyüklüğündeki bandın liken ekstraktı uygulanan konsantrasyonlarda yoğunluğunun konsantrasyon arttıkça arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.32. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.32.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. 200 µg/ml konsantrasyonun ayrı bir dallanma yapması kontrol grubu ile diğer konsantrasyonlar ile benzerlik oranlarının düşük olduğunu göstermektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğuna işaret etmektedir.

Yapılan ISSR ve RAPD PCR analizleri sonrasında her primer için örneklerin bant profilleri kontrolün bant profilleriyle karşılaştırılarak polimorfizm hesaplamaları yapılmıştır. Kontrolde var olup dozlarda bulunmayan ve/veya kontrole göre dozlarda yeni oluşan bantlar polimorfik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.11.).

Tablo 4.11. *P. oleracea* bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri

Primer ISSR RAPD	Kontrol Toplam Bant Sayısı	50 µg		100 µg		150 µg		200 µg	
		a	b	a	b	a	b	a	b
812	5	2	1	2	1	2	2	3	1
813	7	0	1	1	0	1	0	1	0
814	6	2	3	0	1	0	1	0	1
815	12	0	1	0	0	0	1	0	1
OPA2	8	1	1	4	1	4	1	4	1
D11	7	2	1	1	1	2	0	5	3
PM3	10	4	6	4	4	3	5	5	6
PM10	6	5	1	5	1	5	1	5	2
a+b	61	32		26		28		38	
GKS		%47,5		%57,4		%54,1		%44,2	

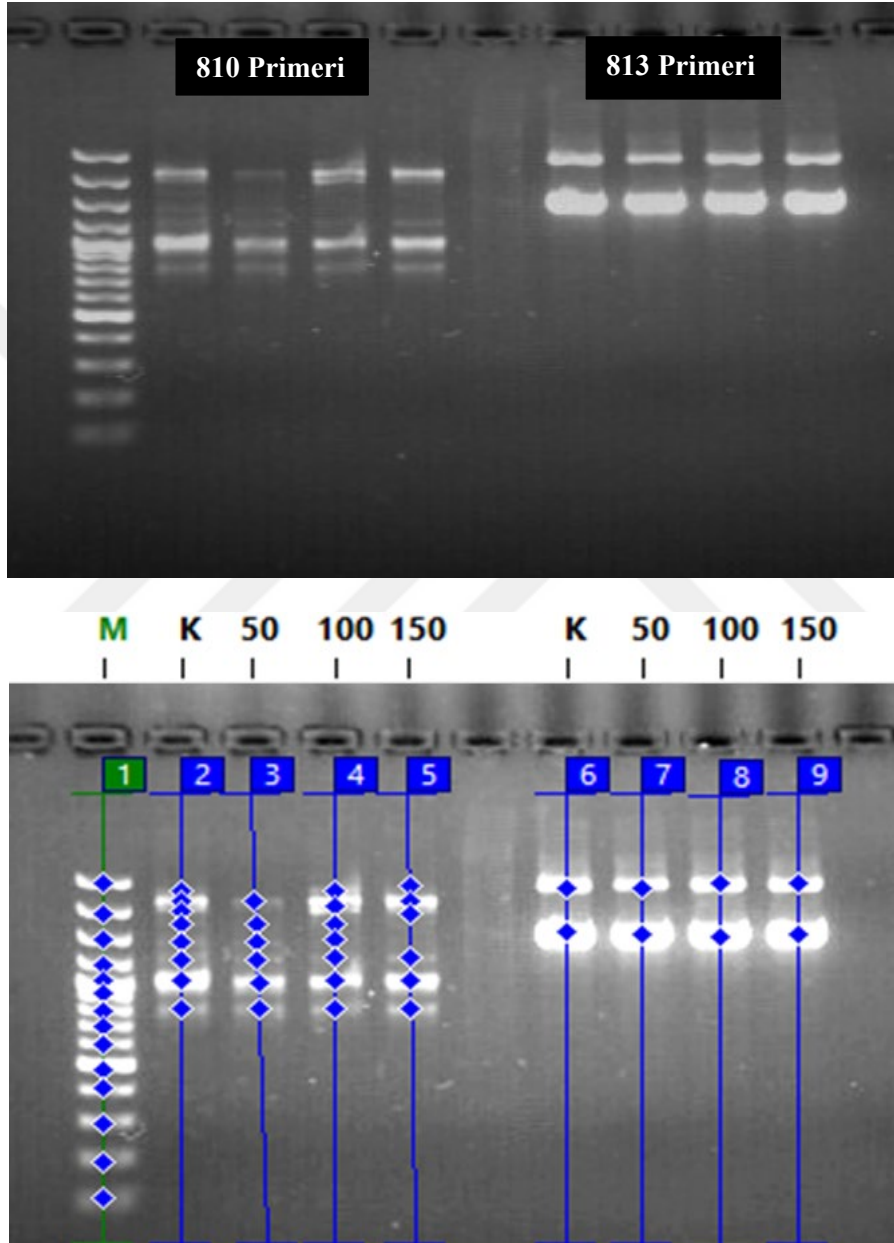
a: Kontrole göre yeni oluşan bant sayısı, b: Kontrole göre kaybolan bant sayısı,

a+b: Polimorfik bant sayısı

ISSR ve RAPD analizi sonuçlarına göre genomik kalıp stabilitesi hesaplanmıştır. Elde edilen değerlere göre *Usnea florida* total aseton ekstraktı uygulanan semizotu yabancı ot türünde en yüksek GKS değeri 100 µg/ml konsantrasyonda %57,4 ve en düşük GKS değeri 200 µg/ml konsantrasyonda %44,2 olarak hesaplanmıştır. GKS değerleri sırasıyla; 50 µg/ml için %47,5 ve 150 µg/ml konsantrasyon için %54,1 olarak bulunmuştur (Tablo 4.11.).

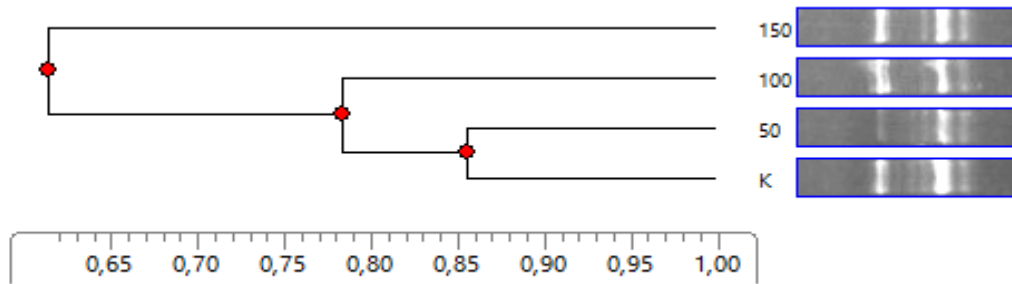
4.3.3. *Setaria verticillata* (Yapışkan Ot) ISSR ve RAPD PCR Analizleri

Usnea florida total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile 4 adet ISSR ve 4 adet RAPD primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.33. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının ISSR 810 ve 813 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

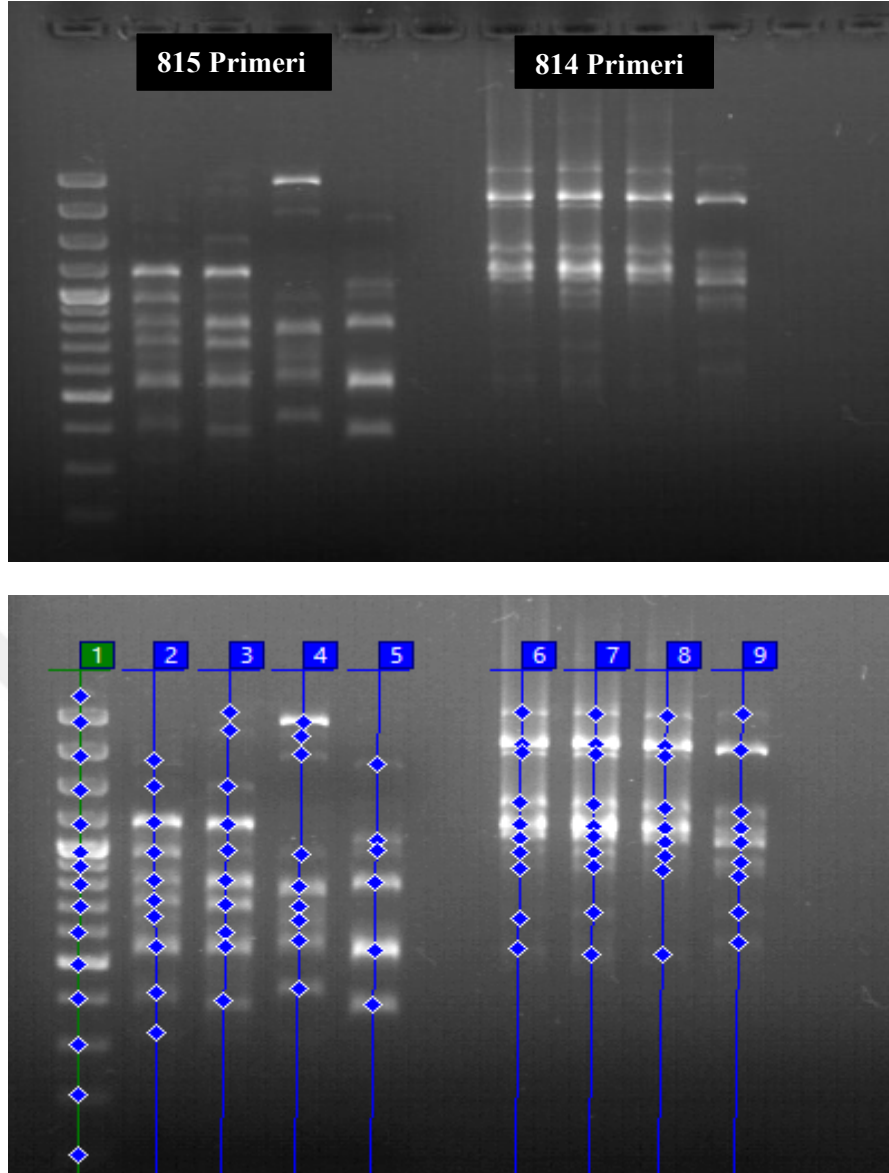
ISSR 810 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 9 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 800 bp ile 2900 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.33.). Kontrol grubunda toplam 8 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında sırasıyla 6, 7 ve 6 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 1 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 6 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bant 2200 bp büyüklüğündeki bant 100 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 2700 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda; 2400 bp büyüklüğündeki bant 100 µg/ml konsantrasyonda; 1500 ve 1750 bp büyüklüğündeki bantlar 150 µg/ml konsantrasyonda ve son olarak 2000 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 2400 bp büyüklüğündeki bandın yoğunluğunun 50 µg/ml konsantrasyonda azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.34. ISSR-PCR 810 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.34.) göre kontrol grubunun düşük konsantrasyonla dallanma yaptığı sonucu ortaya çıkmıştır. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

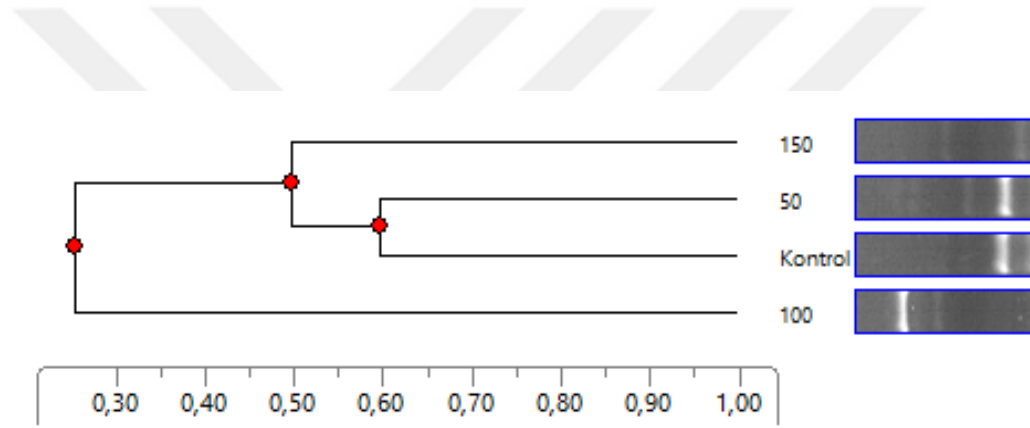
ISSR 813 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 2 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 1600 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.33.). Kontrol grubunda toplam 2 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarının tümünde de 2 adet bant oluşmuştur. 813 primerinin kontrol ve dozlar arasında yeni oluşan veya kaybolan bant gibi herhangi bir farklılık yapmadığı ortaya çıkmıştır. Buna göre Jaccard benzerlik dendrogramı da oluşmamıştır.



Şekil 4.35. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının ISSR 815 ve 814 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

ISSR 815 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 20 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 200 bp ile 2300 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.35.). Kontrol grubunda toplam 10 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında sırasıyla 10, 9 ve 6 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 12 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 17 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 500 ve 2350 bp büyüklüğündeki bantlar 50 µg/ml konsantrasyonda; 300, 500, 700, 1500 ve 2000 bp büyüklüğündeki bantlar 100 µg/ml konsantrasyonda; 950 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonda; 290 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda; 1750 bp büyüklüğündeki bant ise 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 220 ve 200 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olan 450 ve 720 bp büyüklüğündeki bantlar 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 600 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonda; 1450 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 1000 ve 1200 bp büyüklüğündeki bantlar 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda; 550 bp büyüklüğündeki bant ise 50 ve 150 konsantrasyonlarda kaybolmuştur.

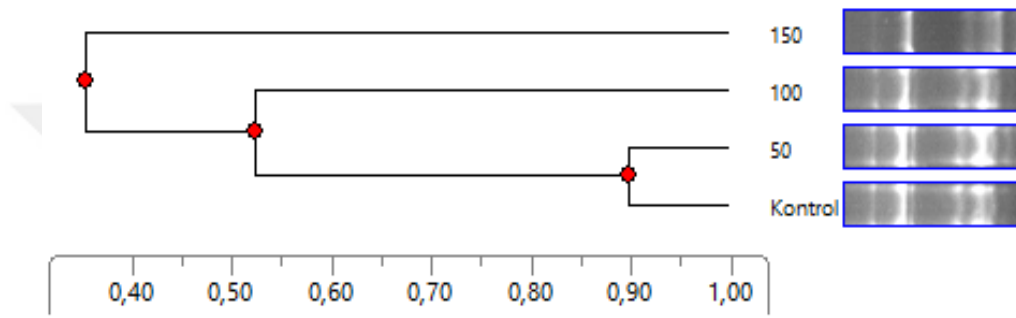


Şekil 4.36. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.36.) göre kontrol grubunun düşük konsantrasyonla dallanma yaptığı ve 100 µg/ml konsantrasyonun kontrol ve tüm dozlardan ayrı bir dallanma yaptığı sonucu ortaya çıkmıştır.

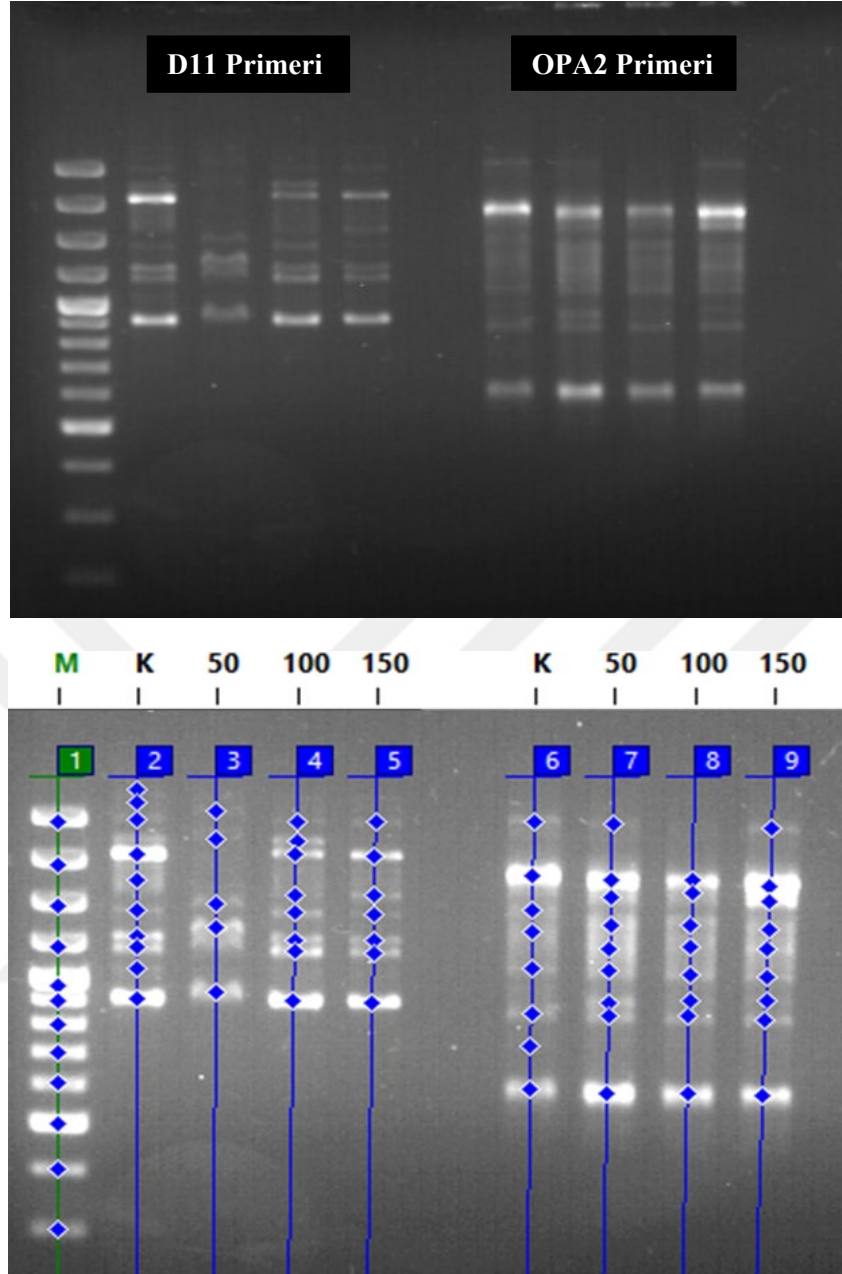
ISSR 814 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 14 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 430 bp ile 2300 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.35.). Kontrol grubunda toplam 10 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında sırasıyla 10, 9 ve 9 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 4 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 6 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 480, 740, 830 ve 1100 bp büyüklüğündeki bantlar 150 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan; 550 bp büyüklüğündeki bant 100 µg/ml konsantrasyonda ve 450, 750, 900, 1200 ve 1500 bp büyüklüğündeki bantlar 150 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 990, 1600 ve 2300 bp büyüklüğündeki bantların liken ekstraktı uygulanan 150 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.37. ISSR-PCR 814 primerinden oluşan dendrogram

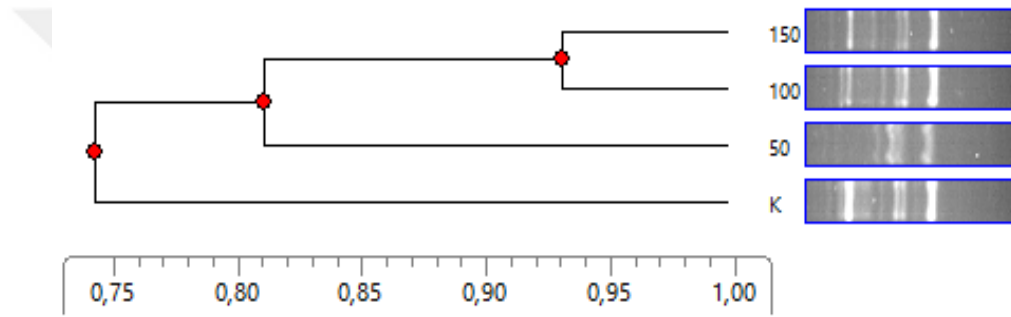
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.37.) göre kontrol grubu ve düşük konsantrasyonların yüksek konsantrasyondan ayrı bir dallanma yaptığı gözlemlenmektedir. Buna göre kontrol ve 150 µg/ml konsantrasyonun benzerlik oranlarının düşük olduğu ifade edilebilir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.38. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının RAPD D11 ve OPA2 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

RAPD D11 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 11 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 880 bp ile 3750 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.38.). Kontrol grubunda toplam 10 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında sırasıyla 6, 8 ve 7 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 2 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 11 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 1600 bp büyüklüğündeki bantlar 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1100, 1800 ve 3750 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olan 3100 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonda ve 2200 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca 900 bp büyüklüğündeki bandın liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı ve kontrol grubunda var olan 2200 bp büyüklüğündeki bandın 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.

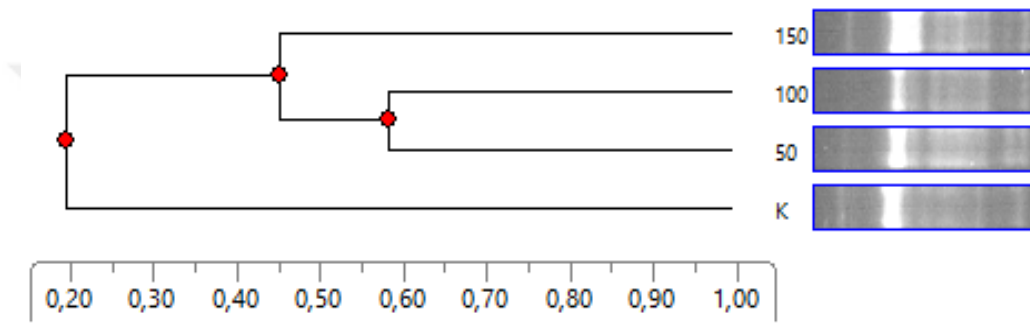


Şekil 4.39. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.39.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarının kontrol grubu ile benzerlik oranlarının düşük olduğunu göstermektedir.

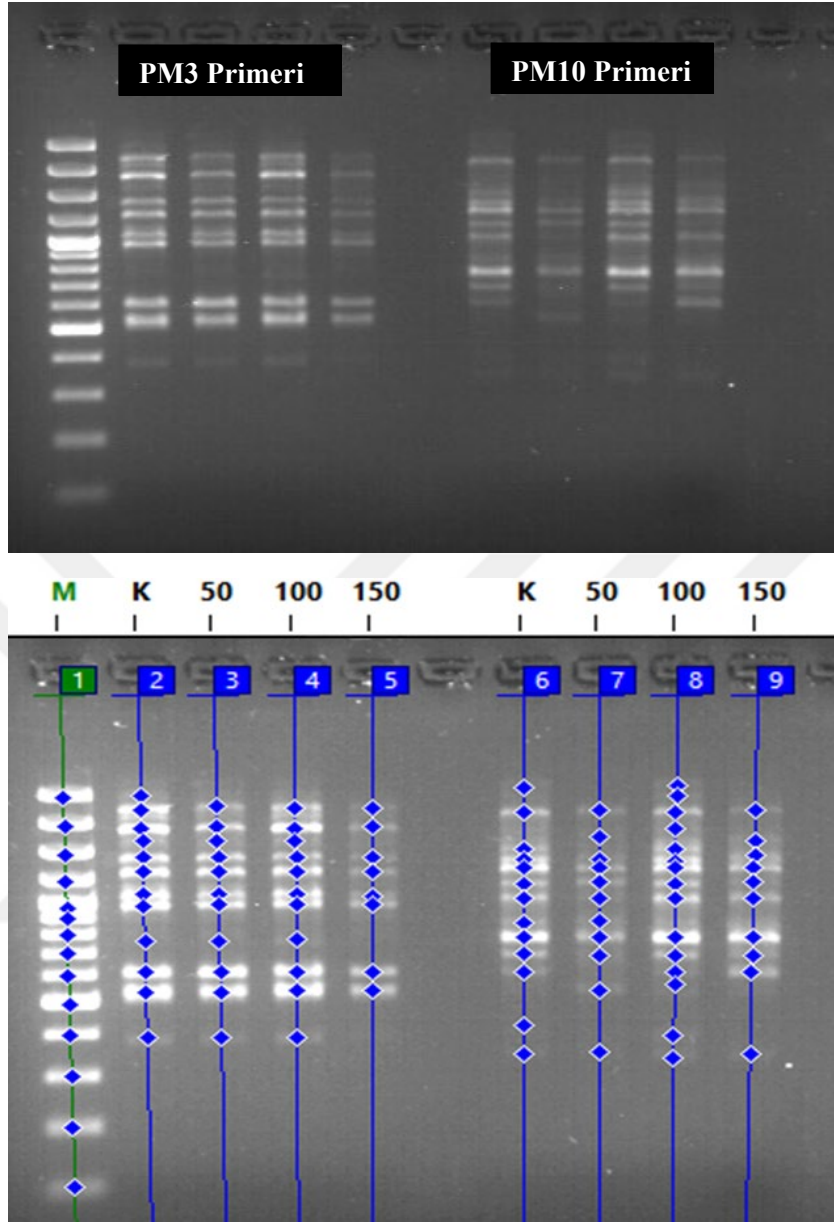
RAPD OPA2 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 13 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 560 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.38.). Kontrol grubunda toplam 8 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında sırasıyla 9, 8 ve 9 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 14 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 12 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 900, 1150, 1330 ve 1600 bp büyüklüğündeki bantlar 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda ve 1000 bp büyüklüğündeki bantlar 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 700, 1250 ve 1400 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda; 1100 bp büyüklüğündeki bant 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 3000 bp büyüklüğündeki bant ise 100 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1500 bp büyüklüğündeki bandın 150 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.40. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendrogram

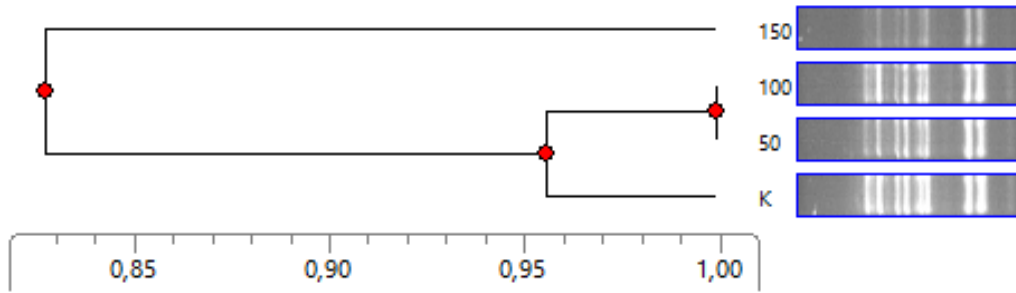
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.40.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu ve kontrol grubu ile konsantrasyonların benzerlik oranlarının düşük olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.41. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot bitki DNA'larının RAPD PM3 ve PM10 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

RAPD PM3 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 12 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 400 bp ile 3100 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.41.). Kontrol grubunda toplam 12 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında sırasıyla 11, 11 ve 8 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 6 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. RAPD PM3 primerinde kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bant olmamıştır.

Kontrol grubunda var olan 3100 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda; 400, 750 ve 1700 bp büyüklüğündeki bantlar ise 150 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca 1000, 1100, 1300, 1450, 1950 ve 2500 bp büyüklüğündeki bantların liken asidi uygulanan tüm konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda bulunan 400 ve 550 bp büyüklüğündeki bantların yoğunluğu 150 µg/ml konsantrasyonda azaldığı ortaya çıkmıştır.

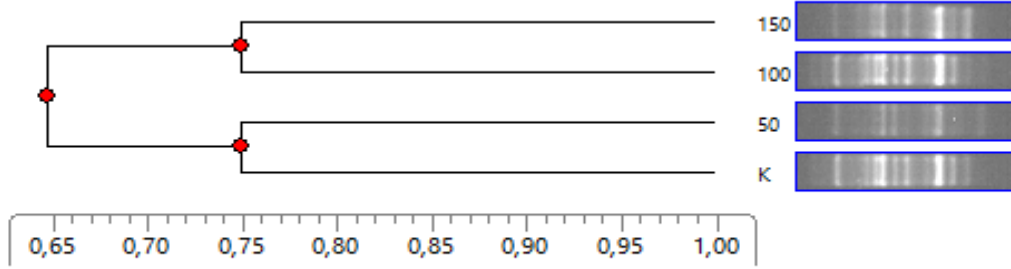


Şekil 4.42. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.42.) göre kontrol grubunun düşük konsantrasyonlarla bir arada kümelenirken ayrı dallanma yaptığı gözlemlenmektedir. En yüksek doz olan 150 µg/ml konsantrasyonunun kontrol ve diğer konsantrasyonlara benzerlik oranlarının daha düşük olduğu ortaya çıkmaktadır.

RAPD PM10 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen yapışkan ot fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 18 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 340 bp ile 3400 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.41.). Kontrol grubunda toplam 13 adet bant oluşurken 50, 100 ve 150 µg/ml dozlarında sırasıyla 11, 15 ve 10 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 6 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 9 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 550 ve 1800 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda; 570, 2000 ve 3400 bp büyüklüğündeki bantlar 100 µg/ml konsantrasyonda ve son olarak 1700 bp büyüklüğündeki bant 150 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 400, 1600 ve 3400 bp büyüklüğündeki bantlar 50 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda; 900 bp büyüklüğündeki bantlar 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda; 610 bp büyüklüğündeki bant ise 50 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur.

Ayrıca kontrol grubunda bulunan 790 bp büyüklüğündeki bandın 50 µg/ml konsantrasyonda; 1350 bp büyüklüğündeki bandın ise 150 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.43. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.43.) göre yüksek konsantrasyonların kontrol grubu ve 50 µg/ml konsantrasyondan ayrı küme oluşturması aralarındaki benzerlik oranlarının düşük olduğunu ifade etmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

Yapılan ISSR ve RAPD PCR analizleri sonrasında her primer için örneklerin bant profilleri kontrolün bant profilleriyle karşılaştırılarak polimorfizm hesaplamaları yapılmıştır. Kontrolde var olup dozlarda bulunmayan ve/veya kontrole göre dozlarda yeni oluşan bantlar polimorfik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.12.).

Tablo 4.12. *S. verticillata* bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri

Primer ISSR RAPD	Kontrol Toplam Bant Sayısı	50 µg/ml		100 µg/ml		150 µg/ml	
		a	b	a	b	a	b
810	8	0	2	1	2	0	2
813	0	0	0	0	0	0	0
815	10	4	4	6	7	2	6
814	10	0	0	0	1	4	5
D11	10	0	4	1	3	1	4
OPA2	8	4	3	5	5	5	4
PM3	12	0	1	0	1	0	4
PM10	13	2	4	3	1	1	4
a+b	71	28		36		42	
GKS		%60,57		%49,3		%40,85	

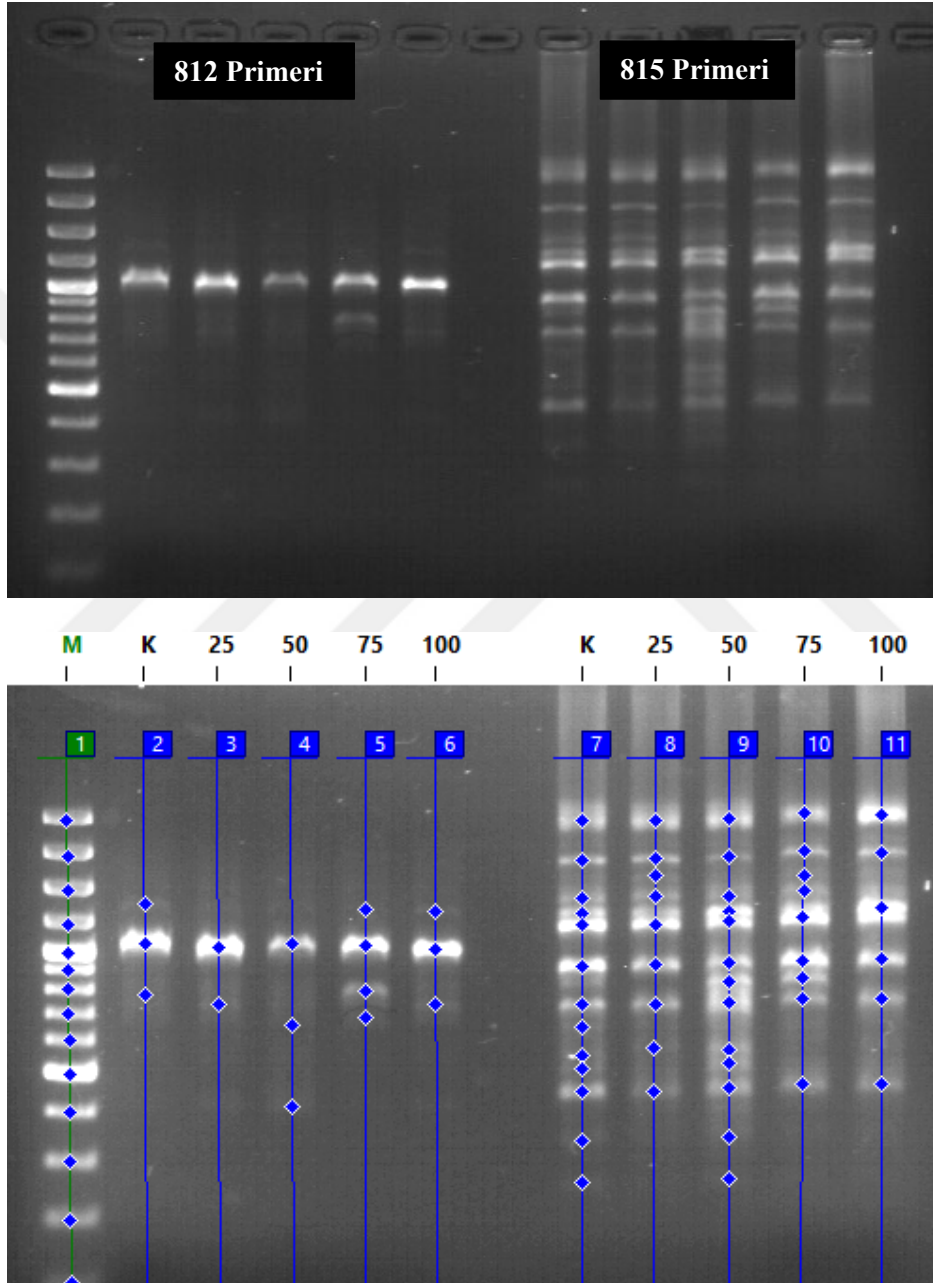
a: Kontrole göre yeni oluşan bant sayısı, b: Kontrole göre kaybolan bant sayısı,

a+b: Polimorfik bant sayısı

ISSR ve RAPD analizi sonuçlarına göre genomik kalıp stabilitesi hesaplanmıştır. Elde edilen değerlere göre *Usnea florida* total aseton ekstraktı uygulanan yapışkan ot yabancı ot türünde en yüksek GKS değeri 50 µg/ml konsantrasyonda %60,57 olarak hesaplanmıştır. GKS değerleri sırasıyla; 100 µg/ml konsantrasyon için %49,3 ve 150 µg/ml konsantrasyon için %40,85 olarak bulunmuştur (Tablo 4.12.). Yapışkan ot türünde uygulanan *Usnea florida* total aseton ekstraktının konsantrasyon yükseldikçe genomik kalıp stabilitesi değerlerinin azaldığı ortaya çıkmıştır.

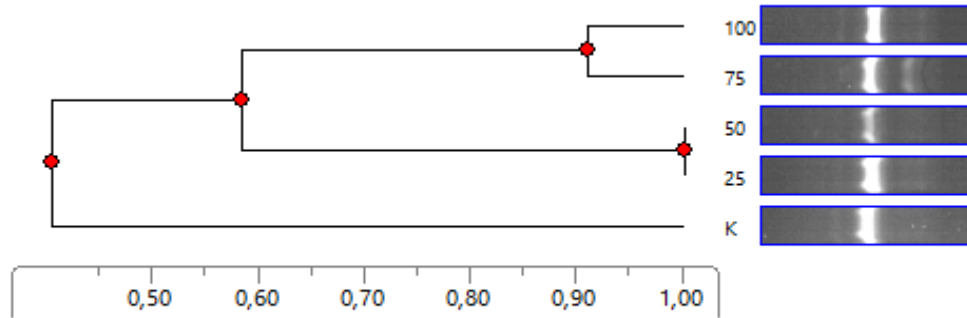
4.3.4. *Triticum aestivum* (Buğday) ISSR ve RAPD PCR Analizleri

Usnea florida total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile 4 adet ISSR ve 4 adet RAPD primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.44. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen buğday bitki DNA'larının ISSR 812 ve 815 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

ISSR 812 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 7 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 410 bp ile 1400 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.44.). Kontrol grubunda toplam 3 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 2, 3, 4 ve 3 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 7 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 7 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 1300 bp büyüklüğündeki bantlar 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. 700 bp büyüklüğündeki bant 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 650 bp büyüklüğündeki bant 75 µg/ml konsantrasyonda ve 410 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1400 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve 800 bp büyüklüğündeki bant 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1100 bp büyüklüğündeki bandın 200 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.

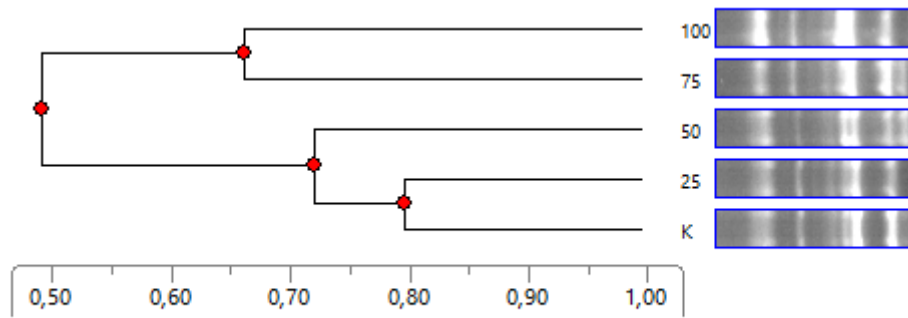


Şekil 4.45. ISSR-PCR 812 primerinden oluşan dendogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.45.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Liken ekstraktı uygulanan konsantrasyonlarının kontrol grubundan ayrı küme oluşturması aralarındaki benzerlik oranlarının düşük olduğunu ifade etmektedir. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

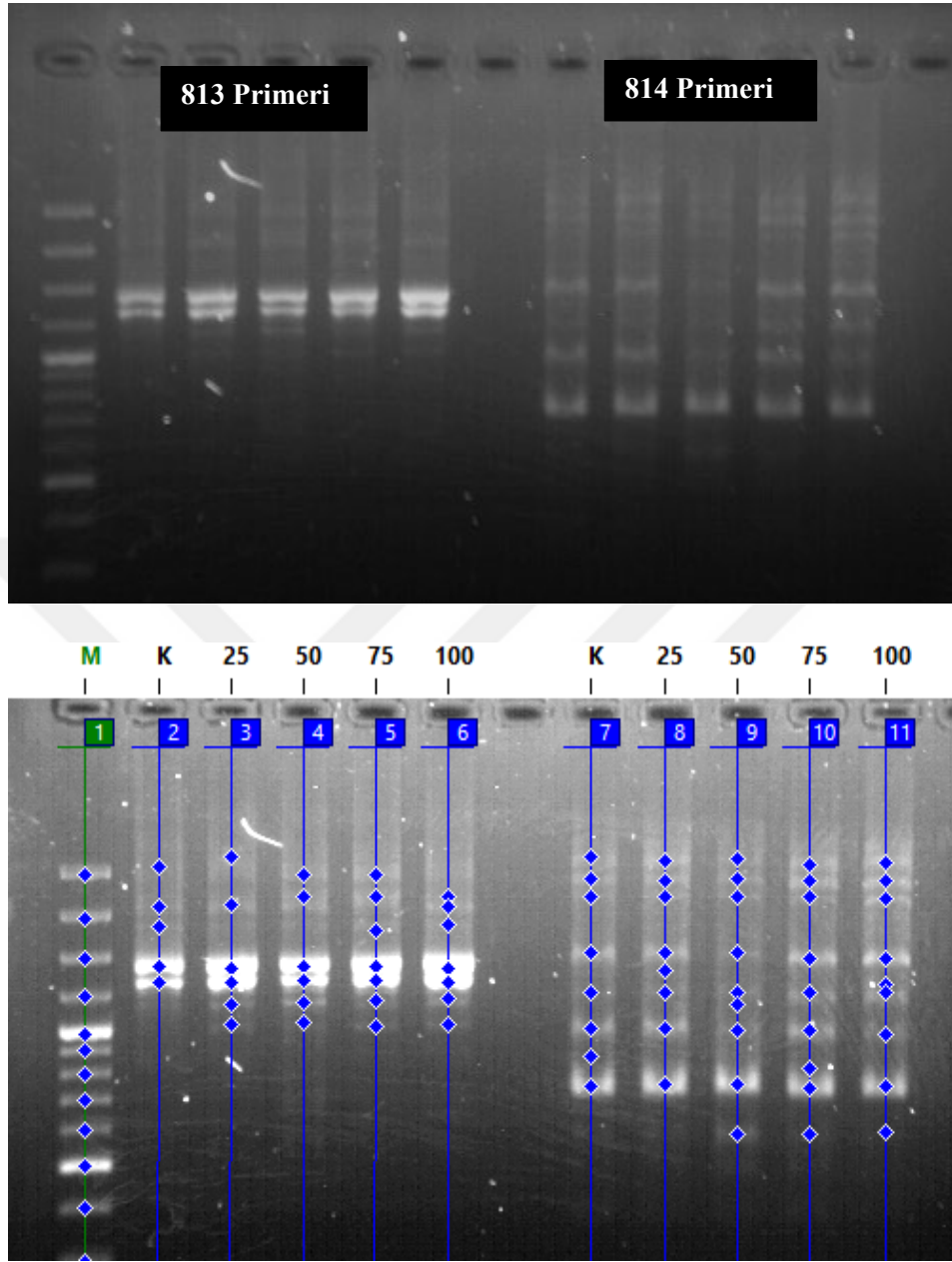
ISSR 815 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 15 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 260 bp ile 3100 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.44.). Kontrol grubunda toplam 13 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 10, 13, 9 ve 6 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 4 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 18 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 1680 bp büyüklüğündeki bant 25 ve 75 µg/ml konsantrasyonlarda ve 850 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 75 µg/ml konsantrasyonlarda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 650 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda; 1400 bp büyüklüğündeki bantlar 100 µg/ml konsantrasyonda; 550 ve 1300 bp büyüklüğündeki bantlar 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 260, 340 ve 520 bp büyüklüğündeki bant 25, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1200 ve 3000 bp büyüklüğündeki bantların 200 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.46. ISSR-PCR 815 primerinden oluşan dendrogram

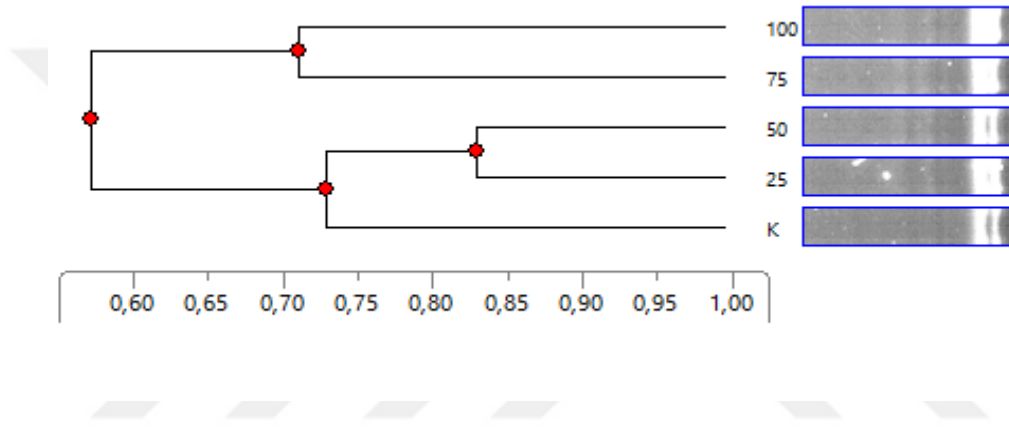
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.46.) göre kontrol grubu 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlar ile bir arada kümelenmiştir. Yüksek dozlar ise ayrı bir küme oluşturmuştur. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca dendrogram sonucuna göre kontrol grubu ve yüksek konsantrasyonların benzerlik oranlarının düşük olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 4.47. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen buğday bitki DNA'larının ISSR 813 ve 814 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

ISSR 813 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 9 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 1000 bp ile 3400 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.47.). Kontrol grubunda toplam 5 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 6, 6, 7 ve 7 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 10 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 4 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 1000 ve 1150 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda; 3400 bp büyüklüğündeki bant 25 µg/ml konsantrasyonda ve 2200 bp büyüklüğündeki bantlar 100 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 2000 bp büyüklüğündeki bantlar 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda; 3200 bp büyüklüğündeki bant 25 ve 100 µg/ml konsantrasyonda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1300 ve 1400 bp büyüklüğündeki bantların 100 µg/ml konsantrasyonda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.

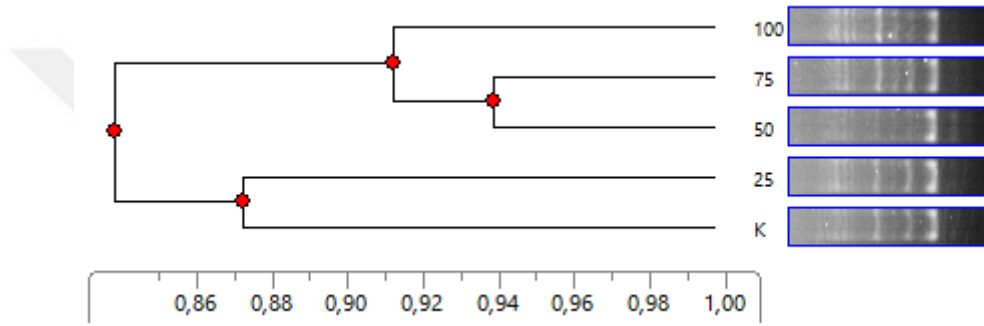


Şekil 4.48. ISSR-PCR 813 primerinden oluşan dendogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.48.) göre kontrol grubunun düşük konsantrasyonlarla aynı grupta kümelendiği, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının ise bir arada kümelendikleri sonucu ortaya çıkmıştır. Buna göre kontrol grubu ile 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının benzerlik oranının düşük olduğu söylenebilir. Ayrıca liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanma yapması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

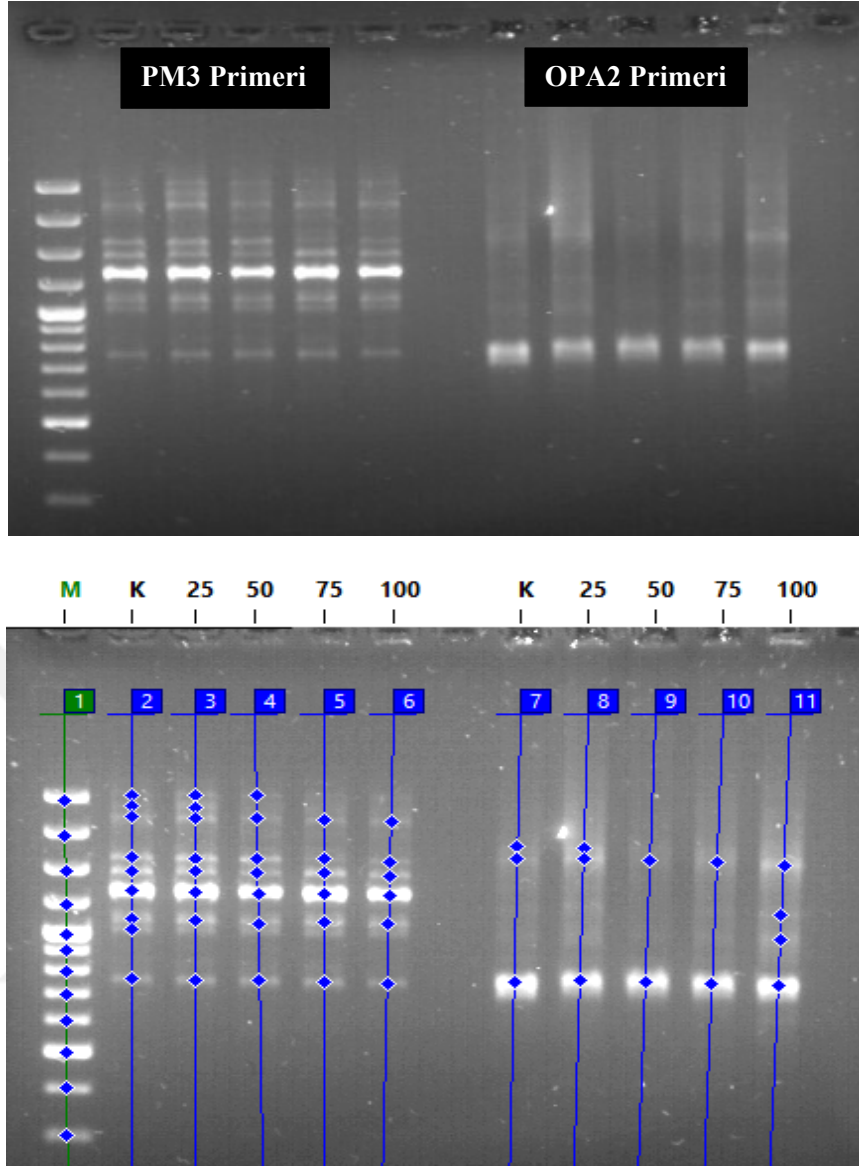
ISSR 814 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 12 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 580 bp ile 3400 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.47.). Kontrol grubunda toplam 8 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 8, 9, 8 ve 9 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 6 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 4 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 580 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 1400 bp büyüklüğündeki bant 25 µg/ml konsantrasyonda; 1155 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda ve son olarak 1300 bp büyüklüğündeki bant 100 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 870 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1500 bp büyüklüğündeki bandın 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



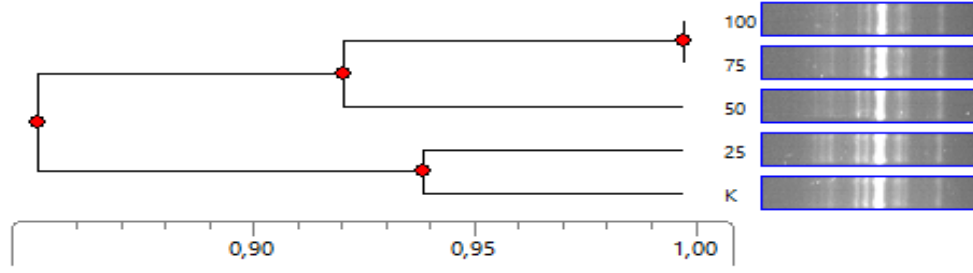
Şekil 4.49. ISSR-PCR 814 primerinden oluşan dendogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.49.) göre kontrol grubunun en düşük konsantrasyonla bir arada kümelenerek yüksek dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Buna göre kontrol grubu ve yüksek konsantrasyonların arasındaki benzerlik oranının düşük olduğu ve sonuçların anlamlı olduğunu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.50. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında çimlenen buğday bitki DNA'larının RAPD PM3 ve OPA2 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

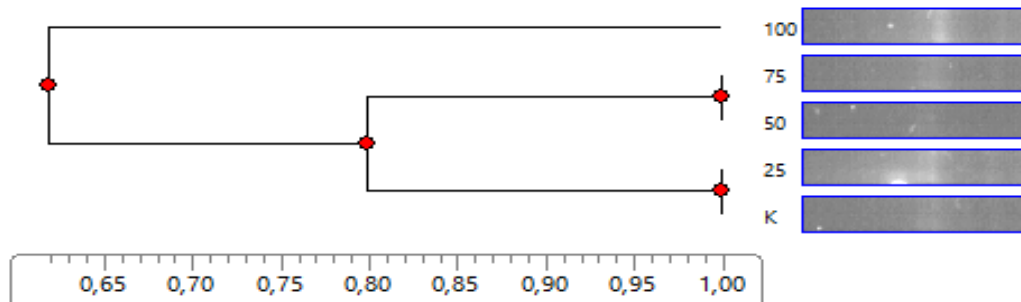
RAPD PM3 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 9 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 740 bp ile 3150 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.50.). Kontrol grubunda toplam 9 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 8, 7, 6 ve 6 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 9 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. RAPD PM3 primerinde kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bant olmamıştır. Kontrol grubunda var olan 1000 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve yine kontrol grubunda olan 3150 bp büyüklüğündeki bant 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 2800 bp büyüklüğündeki bant 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarda kaybolmuştur.



Şekil 4.51. RAPD-PCR PM3 primerinden oluşan dendrogram

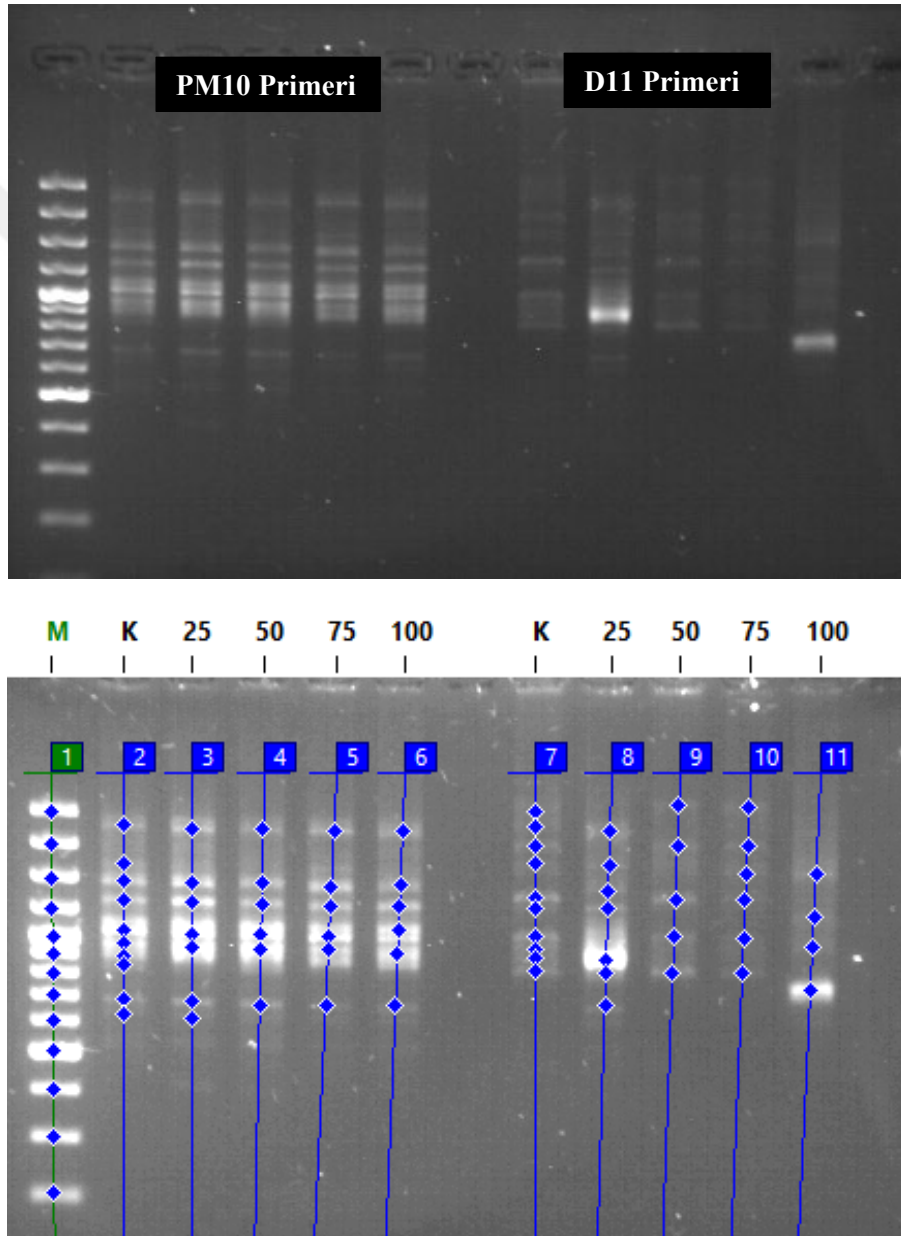
Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.51.) göre kontrol grubunun en düşük konsantrasyonla bir arada kümelenecek yüksek dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Buna göre kontrol grubu ile yüksek konsantrasyonların benzerlik oranının düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Uygulanan liken total aseton ekstraktının düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru dallanmalar oluşturması sonuçların anlamlı olduğunu göstermektedir.

RAPD OPA2 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 5 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 730 bp ile 1800 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.50.). Kontrol grubunda toplam 3 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 3, 2, 2 ve 4 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 2 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 3 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 740 ve 960 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan 100 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1800 bp büyüklüğündeki bant liken ekstraktı uygulanan 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1600 bp büyüklüğündeki bandın 100 µg/ml konsantrasyonlarda yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir.



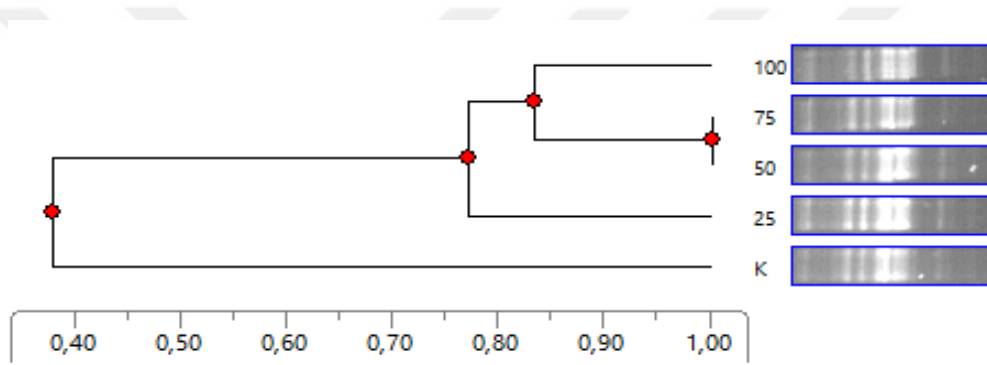
Şekil 4.52. RAPD-PCR OPA2 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (şekil 4.52.) göre 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunun ayrıca bir dallanma yaptığı gözlemlenmektedir. Yüksek konsantrasyonun kontrol ve diğer dozlardan ayrılması benzerliğinin azaldığını ifade etmektedir. Kontrol grubu ve 25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonun ile 50 ve 75 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının kendi aralarında alt kümelenmesi benzerlik oranlarının yüksek olduğunu göstermektedir.



şekil 4.53. Liken ekstraktının farklı konsantrasyonlarında imlenen buğday bitki DNA'larının RAPD PM10 ve D11 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve oluşan bant profilleri

RAPD PM10 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 11 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 600 bp ile 2600 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.53.). Kontrol grubunda toplam 11 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 7, 6, 6 ve 6 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 19 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur. RAPD PM10 primerinde kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bant olmamıştır. Kontrol grubunda var olan 680, 850, 890 ve 1700 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve 600 bp büyüklüğündeki bant 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur. Ayrıca kontrol grubunda bulunan 1040 bp büyüklüğündeki bandın 100 µg/ml konsantrasyonlarda yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.

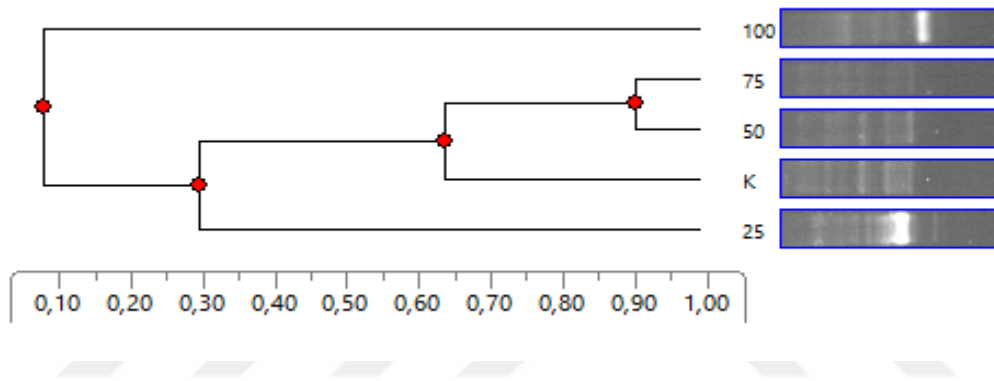


Şekil 4.54. RAPD-PCR PM10 primerinden oluşan dendrogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendrogramına (Şekil 4.54.) göre kontrol grubunun dozlardan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Buna göre kontrol grubu ile liken ekstraktı uygulanan konsantrasyonlar arasındaki benzerlik oranının düşük olduğu ve sonuçların anlamlı olduğunu ortaya çıkmaktadır.

RAPD D11 primeri ve *Usnea florida* total aseton ekstraktının 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında çimlenen buğday fidelerine ait DNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda 13 bant elde edilmiştir. Bant büyüklükleri 650 bp ile 3000 bp arasında değişmektedir (Şekil 4.53.). Kontrol grubunda toplam 10 adet bant oluşurken 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında sırasıyla 7, 5, 6 ve 4 adet bant oluşmuştur. Bu bantlardan 3 tanesi kontrol grubunda olmayıp yeni oluşurken, 21 tanesi ise kontrol grubunda olup dozlarda kaybolmuştur.

Kontrol grubunda olmayıp yeni oluşan bantlardan 720 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan 100 µg/ml konsantrasyonda ve 650 ve 1400 bp büyüklüğündeki bantlar ise 25 µg/ml konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Diğer yandan kontrol grubunda var olan 1700 bp büyüklüğündeki bant 50 µg/ml konsantrasyonda; 810 bp büyüklüğündeki bant 100 µg/ml konsantrasyonda; 1000, 1300, 2000 ve 3000 bp büyüklüğündeki bant 25 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 850 ve 2400 bp büyüklüğündeki bantlar liken ekstraktı uygulanan 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda; 1200 bp büyüklüğündeki bant 50 ve 75 µg/ml konsantrasyonlarda ve son olarak 930 bp büyüklüğündeki bant 25, 50 ve 75 µg/ml konsantrasyonlarda kaybolmuştur.



Şekil 4.55. RAPD-PCR D11 primerinden oluşan dendogram

Jaccard benzerlik değerleriyle oluşturulan UPGMA dendogramına (Şekil 4.55.) göre kontrol grubu ile 50 ve 75 µg/ml konsantrasyonun bir arada alt küme oluşturduğu ve 25 µg/ml konsantrasyonundan ayrıldığı gözlemlenmektedir. Uygulanan en yüksek konsantrasyonun (100 µg/ml) ayrı bir grupta bulunmaktadır ve kontrol grubu ile diğer konsantrasyonlardan benzerlik açısından ayrılmaktadır.

Yapılan ISSR ve RAPD PCR analizleri sonrasında her primer için örneklerin bant profilleri kontrolün bant profilleriyle karşılaştırılarak polimorfizm hesaplamaları yapılmıştır. Kontrolde var olup dozlarda bulunmayan ve/veya kontrole göre dozlarda yeni oluşan bantlar polimorfik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.13.).

Tablo 4.13. *T. aestivum* bitkisi PCR analizleri polimorfik bant sayısı ve GKS değerleri

Primer ISSR RAPD	Kontrol Toplam Bant Sayısı	25 µg		50 µg		75 µg		100 µg	
		a	b	a	b	a	b	a	b
812	3	1	2	2	2	2	1	2	2
815	13	1	4	1	1	2	6	0	7
813	5	3	2	2	1	2	0	3	1
814	12	1	1	2	1	1	1	2	1
PM3	9	0	1	0	2	0	3	0	3
OPA2	3	0	0	0	1	0	1	2	1
PM10	11	0	4	0	5	0	5	0	5
D11	10	2	5	0	5	0	4	1	7
a+b	66	27		25		28		37	
GKS		%59,1		%62,2		%57,6		%43,9	

a: Kontrole göre yeni oluşan bant sayısı, b: Kontrole göre kaybolan bant sayısı,

a+b: Polimorfik bant sayısı

ISSR ve RAPD analizi sonuçlarına göre genomik kalıp stabilitesi hesaplanmıştır. Elde edilen değerlere göre *Usnea florida* total aseton ekstraktı uygulanan buğday bitki türünde en yüksek GKS değeri 50 µg/ml konsantrasyonda %62,2 ve en düşük GKS değeri 100 µg/ml konsantrasyonda %43,9 olarak hesaplanmıştır. GKS değerleri 25 µg/ml konsantrasyon için %59,1 ve 75 µg/ml konsantrasyon için %57,6 olarak bulunmuştur (Tablo 4.13.).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Likenlerin savunma, hayatta kalma, adaptasyon gibi süreçlerde ürettikleri sekonder bileşiklerin oldukça önemli etkileri yapılan çalışmalarla kanıtlanmaya devam etmektedir. Bu etkilere örnek olarak; antimikrobiyal, antifungal, antiproliferatif, allelopatik vb. etkiler verilebilir. Allelopatik etkinin daha çok bitkiler arasında etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Tarımda verimi düşüren yabancı otların sınırlandırılması için allelopatiden yararlanılarak günümüzde kullanılan sentetik herbisitlere alternatif olarak biyoherbisit araştırmaları hız kazanmıştır. Liken ekstraktının biyoherbisit olma potansiyelini araştırdığımız bu çalışmada *Usnea florida* liken aseton ekstraktı, yabancı otlar *Amaranthus retroflexus* (Horoziği), *Portulaca oleracea* (Semizotu) ve *Setaria verticillata* (Yapışkan Ot) ve kültür bitkisi *Triticum aestivum* (Buğday) üzerindeki allelopatik ve genotoksik etkisi incelenmiştir. Genotoksisite etkisini belirlemek için çalışmamızda sekiz adet ISSR ve RAPD primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. Elde edilen bantlar Total Lab CLIQS 1D Programı ile analiz edilmiştir. Her bir primer için kontrol grubu ile liken ekstraktı uygulanan konsantrasyonların karşılaştırılmasıyla polimorfik bantlar tespit edilerek değerlendirilmiştir. ISSR ve RAPD PCR sonucunda oluşan polimorfik bant sayılarına göre genomik kalıp stabilitesi (GKS) hesaplanmıştır.

Çalışmamızda *Usnea florida* liken aseton ekstraktını uyguladığımız yabancı ot türleri ve kültür bitkisi türü tohum çimlenmeleri üzerinde kontrol grubu ile farklı konsantrasyonları karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

U. florida liken aseton ekstraktının, yabancı ot türlerinden horozibiği (*A. retroflexus*) tohum çimlenmesi üzerinde çimlenmeyi teşvik edici etkisi tespit edilmiştir. Karşılaştırmalı veri analizi ile kontrol grubundaki tohum çimlenme ortalamasının; 50, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlardaki çimlenme ortalamalarından daha düşük olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile en fazla anlamlı farkı oluşturan konsantrasyonun 100 µg/ml olduğu ortaya çıkmıştır (p:0,009). Kontrol grubu ile diğer konsantrasyonlar arasındaki farklılık anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen veriler, horozibiği tohumları üzerinde *Usnea florida* total aseton ekstraktının biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli taşımadığını ortaya çıkarmıştır. Yaptığımız çalışmaya benzer nitelikte olan bir araştırmada, Tigre vd. 2015 yılında *Cladonia verticillaris* liken türünden elde edilen aseton, metanol ve kloroform ekstraktları marul fidelerine uygulamıştır. Çalışmanın sonucunda ekstrakt uygulanan marul fide köklerinin ekstrakt uygulanmayan köklere göre daha hızlı büyüdüğü gözlemlenmiştir. Liken ekstraktlarının fide kök gelişimini teşvik ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak gelişen köklerden büyüyen fide yapraklarında ciddi

bozulmalar olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak liken ekstraktlarının biyoherbisit potansiyelinin olduğu ortaya çıkmıştır. Karaaltın vd. 2004 yılında zakkum bitkisinin kök, gövde, yaprak ve tomurcuk ekstraktların fasulye ve buğday tohumlarının çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, zakkumun allelopatik maddeleri taşıyan kısımları özellikle fasulyede çimlenmeye ve fide büyümesine engelleyici etkide bulunmasına karşın buğday tohumunun çimlenmesine olumlu etkide bulunduğu ortaya çıkmıştır. Fasulyede en fazla negatif yönde allelopatik etki zakkumun tomurcuk ekstraktlarında görülmüştür. Buğday tohumunda en fazla pozitif yönde allelopatik etki zakkumun kök ekstraktında görülmüştür. Ayrıca zakkum bitkisinin allelopatik bileşenlerine karşı fasulyenin buğday bitkisinden daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Buğday tohumlarında oluşan olumlu allelopatik etkinin nedeni tohumların içindeki besin maddelerinin farklı olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Buna göre araştırmamızda liken ekstraktının horozibiğı tohumları çimlenme üzerinde teşvik edici etkisinin nedeni tohum besin içeriğinin farklı olmasından kaynaklanabileceğı yorumunu yapmamızı sağlamaktadır.

Girase vd. 2019 yılında, bamya tohumlarını farklı bitki yaprak ekstreleri ile 12 saat astarlayarak çimlenmesini incelemiştir. Araştırma sonucunda, bitki ekstraktlarının bamya tohumlarının çimlenmesinde ve fide gelişiminde büyümeyi teşvik ettiğı sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmamızdaki horozibiğı tohumlarının liken ekstraktı ile bir gece boyunca muamele edilmesi tohum çimlenmesine olumlu yönde etki göstermesine neden olabilir. Bitki büyümesi ile ilgili başka bir araştırmada ise biber ve kişnişin tohum astarlama işlemlerinden etkilenen çimlenme performansına bakıldığında, astar uygulamalarının kullanılan biber ve kişnişin tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerinde belirgin bir etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca astarlama işleminde uygulanan sürenin de bitkilerin çimlenmeleri üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Debbarma vd., 2018: 2648).

Öte yandan Pizňak ve Bakor' un (2018) yaptıkları 'Sulu liken ekstraktının kozalak ağaçlarının çimlenmesine etkisi' çalışmasında *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata*, *Physcia adscendens*, *Pseudevernia furfuracea* liken türlerinin su ekstraktları ile *Picea abies*, *Pinus sylvestris* ve *Pinus mugo* ağaç türlerinin üzerindeki çimlenme oranları incelenmiştir. Sonuç olarak; denenen türler içinde *P. sylvestris*'in liken özütlerine en duyarlı olduğu görülmüştür. Ayrıca, liken ekstraktının suda az çözünür olduğu ve allelopati etkisinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır. 2018 yılında yapılan bu araştırma liken ekstraktlarının çeşidine göre de sonucun değişiklik gsterebileceğı yorumunu yapmamızı sağlamaktadır.

Yabani otlarla yapılan bir diğer çalışmada ise Efil ve Üremiş 2019 yılında *Origanum syriacum* (dağ kekiği) ve *O. majorana* (mercanköşk)'dan elde edilen hidrosollerin (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 10 ml/petri dozlarında) *Amaranthus retroflexus* L. (kırmızı köklü tilki kuyruğu), *Portulaca oleracea* L. (semizotu), *Physalis angulata* L. (fener otu), *Echinochloa colonum* (L.) Link. (benekli darıcan) ve *Solanum nigrum* L. (köpek üzümü) tohumlarının çimlenmesine olan etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda ise, iki bitkiden de elde edilen hidrosollerin düşük dozlarda bile tohum çimlenmesini negatif yönde allelopatik olarak etkilediği ortaya çıkmıştır. Hidrosollerin herbisitlere alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Usnea florida liken aseton ekstraktının, yabani ot türlerinden semizotu (*P. oleracea*) tohum çimlenmesi üzerinde konsantrasyona bağlı olarak geriletilici yönde etki ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Ortalamalardan en yüksek çimlenme yüzdesinin kontrol grubunda (%59) olduğu ortaya çıkmıştır ancak uygulanan 50, 100, 150 µg/ml konsantrasyonlarındaki çimlenme değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (p:0,001). Sonuçların birbirine yakın olması uygulanan konsantrasyonların miktar olarak tohum çimlenmesinde olumlu veya olumsuz etki taşımadığını göstermektedir. Tohum çimlenmesini önemli miktarda düşüren konsantrasyonun kontrole kıyaslandığında 200 µg/ml olduğu ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, *Usnea florida* total aseton ekstraktı yüksek konsantrasyonlarının semizotu tohumlarında biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli taşıdığı söylenebilir. Bizim çalışmamıza destekler nitelikte olan bir araştırmada ise Bingöl ve Battal (2017) herbisitlere alternatif olarak, *Verbascum cheiranthifolium* ve *Salvia limbata* bitkilerinin su ve metanol ekstraktlarının mısır ve semizotu tohumlarının çimlenmesi üzerine allelopatik etkisini araştırmışlardır. Bu bitkilerinin su ve metanol ekstraktlarının mısır ve semizotu tohumlarına uygulamasında, artan ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak radikula-plumula uzunlukları ile çimlenme yüzdelerinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, bu bitkilere ait ekstraktların doğal mücadele amaçlı kullanılabilmesinin mümkün olacağı ortaya çıkmıştır. Yapılan bu araştırmada semizotu tohum çimlenmesini artan konsantrasyonlara bağlı olarak negatif yönde etkileyebileceği sonucuna ulaşmamızı sağlamaktadır. Semizotu yabani otu ile yapılan başka bir çalışmada ise Özdemir ve Üremiş (2019) beyaz turp, Antep turpu, siyah turp, fındık turpu ve şalgam bitkilerinin; yabani ot türü olan horozibiği ve semizotuna karşı allelopatik etkinliğini tarla koşullarında araştırmışlardır. Sonuç olarak, toprağa karıştırılan şalgam ve turp kalıntılarının kontrol grubuna göre, horozibiği ve semizotu bitki tohumlarının çimlenmelerini ve gelişimini engellediğini veya geciktirdiğini gözlemlemişlerdir.

Ma vd. (2020) yapılan allelopati çalışmalarında bitki ekstraktlarının konsantrasyonunun belirli bir eşiğe ulaştığında metabolik olayların düzensiz olduğunu bildirmiştir. İncelemiş oldukları *Chrysanthemum coronarium* bitkisinin yüksek *Ipomoea cairica* konsantrasyonlarına karşı daha duyarlı olduğu bu durumun bitkilerin tolerans mekanizması ile ilişkili olabileceği çıkarımına varmıştır.

Usnea florida liken aseton ekstraktının, yabani ot türlerinden yapışkan ot (*S. verticillata*) tohum çimlenmesi üzerinde yüksek konsantrasyonda inhibe edici yönde etki ettiği sonucuna ulaşılmıştır. En yüksek çimlenme yüzdesinin (%69) 50 µg/ml konsantrasyonunda olduğu ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (p:0,000). Çimlenme ortalamalarında konsantrasyon artışına göre kontrol grubu ile; 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark vardır (p:0,000). Çimlenme yüzdesi konsantrasyon arttıkça düşüş göstermektedir. En yüksek etkinin 200 µg/ml konsantrasyonda olduğu ortaya çıkmıştır. Konsantrasyon miktarına göre çimlenme yüzdesinde düşüş gösteren yapışkan ot tohumlarında kullanılan liken ekstraktının inhibe edici yönde etkisi olduğu ve dolayısıyla *Usnea florida* liken aseton ekstraktının yapışkan ot tohumları üzerinde biyoherbisit olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Literatürde yapışkan ot yabani otu ile yapılan bir çalışmada; lavantada bulunan uçucu yağların yapışkan ot tohumları üzerindeki herbisit potansiyelini incelenmiştir (Koiou vd. 2020: 223). İzole edilen yağlar yapışkan ot tohumlarına uygulanmış ve tohum çimlenmesi incelenmiştir. Uygulanan uçucu yağların yüksek konsantrasyonlarının yapışkan ot tohumlarını inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Öte yandan Kitis vd. (2021), kabuklu buğday hatlarının horozibiği ve çavdar tohumlarının çimlenmesine allelopatik etkilerini incelemişlerdir. Gernik ve siyez buğday türlerinin ekstraktlarını, horozibiği ve çavdar tohumlarına uyguladıklarında bu iki buğday hattının iki önemli yabancı ot türünün çimlenmesi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Usnea florida liken aseton ekstraktının, kültür bitkisi buğdayın (*T. aestivum*) tohum çimlenmesi üzerinde düşük konsantrasyonda stimüle edici, yüksek konsantrasyonda geriletici yönde etki ettiği sonucuna ulaşılmıştır. En fazla tohum çimlenme yüzdesi (%85) 25 µg/ml konsantrasyonunda mevcuttur. 75 µg/ml konsantrasyonu ile kontrol grubu arasındaki fark birbirine yakın olduğu için istatistiksel olarak anlamlı değildir (p:0,000). Karşılaştırmalı veri analizi sonuçlarına göre tohum çimlenme ortalamasının yüksek olduğu 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklar bulunmuştur (p:0,000). 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarının tohum çimlenme ortalamasını arttırarak tohumlar üzerinde uyarıcı bir etkiye neden olduğu görülmüştür. Çimlenme ortalaması en düşük 100 µg/ml

konsantrasyonda bulunmuştur ve kontrol grubu ile 100 µg/ml konsantrasyonu arasında oldukça anlamlı fark mevcuttur (p:0,000). Dolayısıyla *Usnea florida* liken aseton ekstraktının buğday tohumları çimlenmesi üzerinde yüksek konsantrasyonlarda geriletici yönde etki ettiği sonucuna ulaşılmaktadır. Yaptığımız araştırmaya benzer bir çalışmada ise Uzunkaya 2015 yılında ekmeklik buğdaya (*Triticum aestivum*) uyguladığı farklı liken ekstrakt türlerinin (*Umbilicaria decussata*, *Parmelina tiliacea*, *Bryoria fuscescens*) buğdayın çimlenmesini inhibe ettiğini göstermiştir. Yapılan çalışmada, ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren bazı liken türlerinin etanolik ekstraktlarının buğday tohumlarının çimlenme ve büyümesi üzerindeki allelopatik etkileri belirlemek amacıyla *U. decussata*, *P. tiliacea* ve *B. fuscescens* likenlerinin etanolik ekstraktlarının farklı derişimleri ekmeklik buğday tohumlarının çimlenme ve gelişmesi üzerine allelopatik etkileri 7 gün süresince incelenmiştir. Deney sonlandırıldığında liken ekstraktlarının düşük derişimlerinin stimülatör etki gösterdiği, yüksek derişimlerinde ise yetiştirilen tohumların çimlenmediği gözlemlenmiştir. Araştırmanın sonuçları yaptığımız çalışmayı destekler niteliktedir.

Ayrıca Wang vd. (2016) yaptıkları araştırma sonuçları çalışmamızdaki liken ekstraktının buğday tohumları üzerindeki etkisiyle doğru orantılıdır. *Abietinella abietina* yosununun suda çözünür ekstraktlarının *Picea crassifolia* tohumlarının mantar enfeksiyonu riskini azalttığı sonucuna varılmıştır. Düşük konsantrasyonlarda ekstraktın çimlenme oranını uyardığı ve yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe ettiği ortaya çıkmıştır.

Bitkilerin birbirleriyle olan allelopatik etkileşimi ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, Yarnia vd. (2011), yabancı ot türü olan horozibiği (*Amaranthus retroflexus* L.) üzerine çavdar kalıntılarının tohum miktarı ve bitki gelişimine etkilerini incelediklerinde çavdar bitki kalıntılarının horozibiği tohum verimi ve bitki gelişimini engellediği saptanmıştır. Çavdar bitkisinin allelopatik etkisi sonucunda; horozibiğinin fotosentez, protein, pigment yapısında negatif yönde değişim gözlenmiştir. Başka bir allelopati çalışmasında Ghiyasi vd. 2016 yılında kolza tohumlarında çimlenme ve anormal çim oranı üzerine sirken bitkisinin etkisini incelemişlerdir. Araştırmada; sirken bitkisi sulu ekstraktının farklı konsantrasyonları, kolza tohumu ekimi yapılmış petrilere düzenli olarak sulama amaçlı muamele edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlarda, %100 sirken özünü kullanıldığında kolza tohumlarında en düşük çimlenme ve maksimum anormal fide yüzdesi saptanmıştır.

Yine Akgün vd. (2018), buğday (*Triticum aestivum* L.) çim suyunun tohum çimlenmesi üzerine etkisini inceleyerek buğdayın allelopatik etkisini araştırmışlardır. Yapılan deneyde çeşitli tohumlar (arpa, mısır, buğday, fasulye, yonca, çok yıllık çim, koyun yumağı ve şeker pancarı) kullanılmışlardır. Buğday çim suyu, kontrol grubu hariç diğer tohumların üzerine sulama amaçlı verilmiştir. Araştırma sonucunda, buğday çim suyu uygulaması çimlenme indeksi, çimlendirme oranı ile kök ve gövde uzunluğunu azalttığı ortaya çıkmıştır. Çimlenme oranı, kök ve gövde uzunluğundaki azalma arpa, çok yıllık çim, koyun yumağı, yonca ve şeker pancarında anlamlı derecede önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Allelopati ile ilgili yapılan bir araştırmada, juglon ve ceviz yaprağı ekstraktının turpta bazı gelişme özellikleri ve verim üzerine etkisini incelenmiştir (Kaymak 2018: 1). Cevizin sulu ekstraktının ve juglon çözeltisinin deneme parsellerine ekimini yaparak deneyini gerçekleştirmiştir. Juglon ve ceviz yaprağı ekstraktının turpta, incelenen parametrelerin (kökte kuru ağırlık madde miktarı, yaprak sayısı) tamamını olumsuz etkilediğini tespit etmiştir. Sebze üretiminde; sadece cevizin değil, bu tip olumsuz allelopatik etkiye sahip türlerin tamamının başarılı bir üretim için dikkate alınması gerektiği sonucuna varmıştır. Öte yandan Özbay 2018 yılında yaptığı araştırmada ise bazı tıbbi bitki ve yabancı ot ekstraktlarının biberin çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkisini gözlemlemiştir. Çalışmada; rezene, ebegümece, kırmızı yonca, hardal, dereotu, sedef otu, kimyon ve meyan bitkilerinin su ekstraktlarının biberde çimlenme ve fide gelişimi üzerine olan allelopatik etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, allelopatik etkileri incelenen bitki ekstraktlarının biberde çimlenmeyi azalttığını ve fide gelişimini engellediğini ortaya konmuştur. Çalışmada allelopatik etkileri test edilen bitkiler ve biber gibi kültür bitkilerinin mümkün olduğu kadar birbirine yakın olarak yetiştirilmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Allelopati çalışmalarında sıkça kullanılan marul bitkisiyle yapılan bir diğer araştırmada ise Akın vd. 2019 yılında kırmızı hevhulma bitki ekstraktlarının farklı sıcaklık ve konsantrasyonlarının marul tohumları üzerindeki allelopatik etkisini araştırmışlardır. Yüksek sıcaklığın, düşük sıcaklığa göre marul tohum gelişimini daha fazla olumsuz yönde etkilediği ortaya çıkmıştır. Kök, gövde, yaprak ekstraktlarının ayrı ayrı değerlendirilmesinde ise, yaprak ekstraktlarının, kök ve gövde ekstraktlarına göre büyümeyi engelleyici etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda; kırmızı hevhulma ekstraktlarının marulda çimlenme ve fide gelişimine etkisinin konsantrasyona ve sıcaklığa bağlı olarak değiştiği ortaya çıkmıştır.

Yabani otlarla mücadele etmek için yapılan bir diğer araştırmada ise Karaman vd. 2021 yılında yulaf çim suyunun bazı yabancı ot ve kültür bitkisi tohumlarının çimlenme ile fide özellikleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kültür bitkileri; arpa, buğday, yulaf, fasulye, mercimek, şeker pancarı, ayçiçeği, İtalyan çimi, kırmızı üçgül ve yonca tohumlarıdır. Yabancı ot tohumu olarak ise, horozibiği ve yabancı hardal tohumları kullanmışlardır. Yulaf çim suyunun farklı konsantrasyonları hem kültür hem de yabancı ot tohumlarına uygulanmıştır. Sonuç olarak; yulaf çim suyunun mineral bakımından zengin olması kültür bitkilerinde çimlenmeyi olumlu yönde etkilememiştir. Aksine hem kültür bitkilerinde hem de yabancı otlarda negatif yönde allelopatik etki göstermiştir. Dolayısıyla biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli taşımadığı sonucuna varılmıştır.

Bitkisel ekstraktların genotoksik etkilerinin belirlenmesine yönelik literatürde çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genelde mitotik indeks testleri (Akinboro ve Bakare, 2007: 470), mikronükleus testleri (MN) (Zrnzević vd., 2017: 679), kardeş kromatit değişimi testleri (SCE) (Ağar vd., 2011: 1043) gibi teknikler kullanılmaktadır. Bu testlerin yanında PCR tekniği de oldukça etkili bir şekilde genotoksisite çalışmalarında uygulanmaktadır. Özellikle son yıllarda RAPD PCR tekniği genom seviyesinde değişkenliğin gösterilmesi, çok sayıda örneğin hızlı analizi gibi özellikleri bakımından kullanımı artmıştır (Bozari vd., 2012: 346). ISSR PCR tekniği ile genotoksisite çalışmaları da mevcuttur. Örneğin, Bakry vd. (2015) ve Eröz Poyraz vd. (2018) araştırmalarında ISSR PCR tekniğini kullanmışlardır. Çalışmamızda *Usnea florida* liken aseton ekstraktını uyguladığımız yabancı ot türleri ve kültür bitkisi türlerinden elde edilen DNA'larda PCR ile oluşan ve kaybolan farklı bant sayılarının hesaplanması ile GKS sonuçları tablo şeklinde hazırlanmıştır. GKS yüzdeleri kontrol grubu ile farklı konsantrasyonların karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Konsantrasyonlardaki bant sayılarında kontrol grubuna göre artma ya da azalma genomik DNA'da değişimlerin olduğunu göstermektedir.

Usnea florida liken aseton ekstraktının horozibiği (*A. retroflexus*) DNA'sı üzerindeki genotoksik etkisini incelemek amacıyla ISSR ve RAPD primerleri ile yapılan PCR analizleri sonucunda; kontrol grubunda toplam 58 bant ortaya çıkmıştır. Kontrolle karşılaştırıldığında polimorfik bant sayıları 50 µg/ml konsantrasyonda toplam 25'tir. GKS değeri ise %56,9 olarak hesaplanmıştır. 100 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 35'tir. GKS değeri ise %39,7 olarak hesaplanmıştır. 150 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 28'dir. GKS değeri %51,7 olarak hesaplanmıştır. 200 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 32 ve GKS değeri %44,9 olarak bulunmuştur (Tablo 4.10.).

Sonuçlara göre en yüksek GKS değeri 50 µg/ml konsantrasyonda (%56,9), en düşük GKS değeri ise 100 µg/ml konsantrasyonda (%39,7) ortaya çıkmıştır. *Usnea florida* liken aseton ekstraktının horozibiğinde oluşturduğu genotoksik etkinin en fazla 100 µg/ml konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Buna göre liken ekstraktının horozibiği DNA'sı üzerinde GKS oranında konsantrasyondan bağımsız değişimlere neden olduğu gözlenmiştir.

Usnea florida liken aseton ekstraktının semizotu (*P. oleracea*) DNA'sı üzerindeki genotoksik etkisini incelemek amacıyla ISSR ve RAPD primerleri ile yapılan PCR analizleri sonucunda; kontrol grubunda toplam 61 bant ortaya çıkmıştır. Kontrolle karşılaştırma yapılarak oluşturulan polimorfik bant sayıları 50 µg/ml konsantrasyonda toplam 32'dir. GKS değeri ise %47,5 olarak hesaplanmıştır. 100 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 26'dır. GKS değeri ise %57,4 olarak hesaplanmıştır. 150 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 28'dir. GKS değeri %54,1 olarak hesaplanmıştır. 200 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 38 ve GKS değeri %44,2 olarak bulunmuştur (Tablo 4.11.). Sonuçlara göre en yüksek GKS değeri 100 µg/ml konsantrasyonda (%57,4), en düşük GKS değeri ise 200 µg/ml konsantrasyonda (%44,2) ortaya çıkmıştır. *Usnea florida* liken aseton ekstraktının semizotu tohum çimlenmesinde oluşturduğu genotoksik etkinin en fazla 200 µg/ml konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Buna göre liken ekstraktının semizotu DNA'sı üzerinde 100 µg/ml konsantrasyondan itibaren artan konsantrasyonlara bağlı olarak GKS oranında düşme olduğu gözlenmiştir.

Usnea florida liken aseton ekstraktının yapışkan ot (*S. verticillata*) DNA'sı üzerindeki genotoksik etkisini incelemek amacıyla ISSR ve RAPD primerleri ile yapılan PCR analizleri sonucunda; kontrol grubunda toplam 71 bant ortaya çıkmıştır. Kontrolle karşılaştırma yapılarak oluşturulan polimorfik bant sayıları 50 µg/ml konsantrasyonda toplam 28'dir. GKS değeri ise %60,57 olarak hesaplanmıştır. 100 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 36'dır. GKS değeri ise %49,3 olarak hesaplanmıştır. 150 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 42 ve GKS değeri %40,85 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.12.). Sonuçlara göre en yüksek GKS değeri 50 µg/ml konsantrasyonda (%60,57), en düşük GKS değeri ise 150 µg/ml konsantrasyonda (%40,85) ortaya çıkmıştır. *Usnea florida* liken aseton ekstraktının yapışkan ot tohum çimlenmesinde oluşturduğu genotoksik etkinin en fazla 150 µg/ml konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Buna göre liken ekstraktının yapışkan ot DNA'sı üzerinde artan konsantrasyona bağlı olarak GKS oranında düşme olduğu belirlenmiştir.

Usnea florida liken aseton ekstraktının buğday (*T. aestivum*) DNA'sı üzerindeki genotoksik etkisini incelemek amacıyla toplam sekiz adet ISSR ve RAPD primerleri ile yapılan PCR analizleri sonucunda; kontrol grubunda toplam 66 bant ortaya çıkmıştır. Kontrolle karşılaştırma yapılarak oluşturulan polimorfik bant sayıları 25 µg/ml konsantrasyonda toplam 27'dir. GKS değeri ise %59,1 olarak hesaplanmıştır. 50 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 25'dir. GKS değeri ise %62,2 olarak hesaplanmıştır. 75 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 28'dir. GKS değeri %57,6 olarak hesaplanmıştır. 100 µg/ml konsantrasyon için toplam polimorfik bant sayısı 37 ve GKS değeri %43,9 olarak bulunmuştur (Tablo 4.13.). Sonuçlara göre en yüksek GKS değeri 50 µg/ml konsantrasyonda (%62,2), en düşük GKS değeri ise 100 µg/ml konsantrasyonda (%43,9) ortaya çıkmıştır. *Usnea florida* liken aseton ekstraktının buğday tohum çimlenmesinde oluşturduğu genotoksik etkinin en fazla 100 µg/ml konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Buna göre liken ekstraktının buğday DNA'sı üzerinde 50 µg/ml konsantrasyondan itibaren artan konsantrasyonlara bağlı olarak GKS oranında düşme olduğu gözlenmiştir.

Bitkilerde yapılan genotoksisite çalışmalarına örnek olarak, Sunar vd. 2009 yılında PCR tabanlı RAPD yöntemi ile *Verbascum spessiosum* metanolik ekstraktının mısır tohumu üzerindeki genotoksik etkisini incelemiştir. Kontrole kıyasla düşük RAPD bant profillerindeki değişiklikler, mutasyonlar, yeniden düzenlemeler, yapısal modifikasyonlar gibi DNA değişikliklerinin allelokimyasallar tarafından kaynaklandığını bildirmektedir.

Bazı yabani otlar üzerinde yapılan bir araştırmada Kekeç vd. 2012 yılında kedi nanesi (*Nepeta meyeri*) uçucu yağlarının bazı yabancı ot ve kültür bitkileri tohum çimlenmesi üzerindeki genotoksik etkilerini RAPD PCR ile incelemiştir. Çalışmada kontrol grubu ile uygulanan dozların RAPD sonuçlarını karşılaştırmıştır. Sonuçlar, yağların güçlü bir inhibitör aktiviteye sahip olduğunu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bant yoğunluğu, bant kaybı ve yeni bantların görünümündeki değişim açısından RAPD profillerinde değişikliğe neden olduğunu gösterdiğini belirtmiştir.

Genotoksik etkinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise Aksakal vd. 2013 yılında 2,4-diklorofenoksiasetik asidin mısır üzerindeki genotoksik etkilerini RAPD PCR tekniği ile incelemiştir. Sonuç olarak RAPD profillerindeki değişikliklerin değerlendirmesi için gerçekleştirilen genomik şablon stabilitesi (GTS), artan 2,4-D konsantrasyonlarından da önemli ölçüde etkilendiğini bildirilmiştir.

Bozari ve Aksakal 2013 yılında, trifluralin herbisitinin mısır üzerindeki genotoksik etkisini saptamak için RAPD PCR tekniğini kullanmıştır. Trifluralin herbisidine farklı dozlarda maruz bırakılan mısır fidelerinin RAPD PCR tekniği sonucunda GTS ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir. Sonucunda RAPD tekniğinin, herbisitlerin bitkiler üzerindeki genotoksik etkilerini değerlendirmek için yararlı bir biyobelirteç olduğunu belirtmiştir.

Altwaty vd. 2016 yılında *Dipterygium glaucum* bitkisinin su, etanol ve etil asetat ekstraktlarının *Vicia faba* köklerinde olası genotoksik etkisini RAPD PCR tekniği ile araştırmıştır. Üç ekstrakt ile muamele edilmiş *V. faba*'nın RAPD analizleri yeni oluşan ve kontrol göre kaybolan DNA bantlarını ortaya çıkardığını bildirmiştir.

Silprasit vd. 2016 yılında herbisit türleri olan glifosat ve butaklorun su bitkileri üzerindeki etkisi gözlemlmek amacıyla RAPD PCR tekniğini kullanmıştır. Sonuç olarak, herbisitlerin anormal morfoloji ve DNA kararsızlığı üzerindeki etkileri ortaya çıkmıştır. Ek olarak, bazı su bitkileri üzerindeki glifosat genotoksitesinin sonuçları, RAPD-PCR yönteminin bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini doğrulamıştır.

Sonuç olarak, *Usnea florida* total aseton ekstraktının allelopatik etkileri çalışılan türe göre değişiklik göstermektedir. Buna göre; *A. retroflexus* (horozibiği) tohum çimlenmesi üzerinde teşvik edici, *P. oleracea* (semizotu) tohum çimlenmesi üzerinde konsantrasyona bağlı olarak geriletici, *S. verticillata* (yapışkan ot) tohum çimlenmesini inhibe edici ve *T. aestivum* (buğday) tohum çimlenmesini konsantrasyona bağlı olarak geriletici yönde etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla *Usnea florida* aseton ekstraktının biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli yabani ot türlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yaptığımız çalışmada *Usnea florida* total aseton ekstraktının semizotu ve yapışkan ot yabani ot türleri üzerinde biyoherbisit olarak kullanım potansiyeli taşıdığı sonucuna ulaşılmaktadır. Ayrıca liken ekstraktının uygulanan tüm bitki türleri üzerinde genotoksik etkisi olduğu görülmüştür. *Usnea florida* liken aseton ekstraktı ile yabani otların sınırlandırılması için biyoherbisit potansiyelini araştırdığımız bu çalışma literatürde ilk kez yapılmıştır. Liken türlerinin ve ekstraktlarının değiştirilerek yeni çalışmalar yapılması sentetik herbisitlere karşı oldukça etkili sonuçlar doğurabilir.

KAYNAKÇA

- Ağar, G., vd.** (2010). Mutation Preventive and Antigenotoxic Potential of Methanol Extracts of Two Natural Lichen. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20), 2132-2137.
- Ağar, G., vd.** (2011). Protective Activity of The Methanol Extract of Usnea Longissima Against Oxidative Damage and Genotoxicity Caused by Aflatoxin B₁ in Vitro. *Turk J Med Sci*, 41(6), 1043-1049.
- Akarsu, E. M.** (2019). *In Vitro Şartlarda Mitomycin-C'nin Oluşturduğu Genetik Hasara Karşı Bir Liken Türü Olan Xanthoparmelia Somloensis (Gyeln.) Hale Etkisinin Mikronükleus Test Yöntemi ile Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Akgün, İ., Ayata, R., & Karaman, R.** (2018). Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çim Suyunun Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi. *Akademia Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 1(4), 19-24.
- Akın, B., vd.** (2019). Kırmızı Hevhulma (*Lythrum salicaria* L.) Ekstraktlarının Farklı Sıcaklık ve Konsantrasyonlarının Marul Tohumları Üzerindeki Allelopatik Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* 17, 290-296.
- Akinboro, A., Bakare, A. A.** (2007). Cytotoxic and Genotoxic Effects of Aqueous Extracts of Five Medicinal Plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 470-475.
- Aksakal, Ö., vd.** (2013). Assessment of Genotoxic Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Maize by Using RAPD Analysis. *Industrial Crops and Products* 42, 552-557.
- Altwyty, N. H., vd.** (2016). Molecular and Cytogenetic Assessment of *Dipterygium glaucum* Genotoxicity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88(1), 623-634.
- Ambika, S. R.** (2013). Allelopathy. *Multifaceted Attributes of Allelochemicals and Mechanism of Allelopathy*. Springer, Berlin, 389-405.
- Arıkan, N., Elibüyük, İ. Ö.** (2015). Yabancı Otlarla Mücadelede Allelopatinin Kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(1), 46-50.
- Bačkor, M., Klemová, K., Bačkorová, M., & Ivanova, V.** (2010). Comparison of the Phytotoxic Effects of Usnic Acid on Cultures Of Free-Living Alga *Scenedesmus quadricauda* and Aposymbiotically Grown Lichen Photobiont *Trebouxia erici*. *Journal of Chemical Ecology* 405-411.

Bajpai, R., Upreti, D. K. (2020). Lichen Allelopathy: An Agricultural Prospect. *International Journal of Plant and Environment*, 6(1), 1-8.

Bakry, F. A., vd. (2015). Glyphosate Herbicide İnduces Genotoxic Effect and Physiological Disturbances in *Bulinus Truncatus* Snails. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 123, 24-30.

Bhattacharyya, S., vd. (2016). Lichen Secondary Metabolites and Its Biological Activity. *American Journal Of Pharmatech Research*, 6(6), 28-44.

Bingöl, Ö., Battal, P. (2017). *Verbascum cheiranthifolium* Boiss. var. *asperulum* (Boiss.) Murb. ve *Salvia limbata* C. A. Mey. Ekstraktlarının *Zea mays* L.ve *Portulaca oleraceae* L. Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Allelopatik Etkisinin Araştırılması. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 4(2), 176-185.

Boustie, J., Grube, M. (2005). Lichens- A Promising Source of Bioactive Secondary Metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273–287.

Bozari, S., vd. (2012). Determination of Chemical Composition and Genotoxic Effects of Essential Oil Obtained from *Nepeta Nuda* on *Zea Mays* Seedlings. *Toxicology and Industrial Health*, 29(4), 339-348.

Bozari, S., Aksakal, Ö. (2013). Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to Detect Genotoxic Effect of Trifluralin on Maize (*Zea mays*). *Drug and Chemical Toxicology*, 36(2), 163-169.

Campos, J.M.S., vd. (2008). Mitodepressive and Clastogenic Effects of Aqueous Extracts of the Lichens *Myelochroa lindmanii* and *Canoparmelia texana* (Lecanorales, Parmeliaceae) on Meristematic Cells in Plant Bioassays. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 141-145.

Cankılıç Yılmaz, M., Sariözlü Yılmaz, N., Candan, M., & Tay, F. (2017). Screening of Antibacterial, Antituberculosis and Antifungal Effects of Lichen *Usnea florida* and Its Thamnolic Acid Constituent. *Biomedical Research*, 28(7), 3108-3113.

Cansaran, D., Kâhya, D., Yurdakulol, E., & Atakol, O. (2006). Identification and Quantitation of Usnic Acid from the Lichen *Usnea* Species of Anatolia and Antimicrobial Activity. *Z. Naturforsch*, 61 c, 773-776.

Cansaran Duman, D. (2007). Farklı Liken Örneklerindeki Usnik Asit Miktarlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Belirlenmesi ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Türk Hijyen Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 64(3), 17-21.

- Cansaran Duman, D.** (2008). Likenler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65(1), 43-50.
- Chou, C. H.** (2006). Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. *Introduction to Allelopathy*. Springer, Netherlands, 1-10.
- Clerc, P.** (1998). Species Concepts In The Genus *Usnea* (Lichenized Ascomycetes). *Lichenologist*, 30(4-5), 321-340.
- Crawford, S. D.** (2019). Lichen Secondary Metabolites. *Lichens Used in Traditional Medicine*. Springer Nature, Switzerland, 30-98.
- Çobanoğlu Özyiğitoğlu, G., Açıkgöz, B., & Sesal, C.** (2016). Lichen Secondary Metabolites: Synthesis Pathways and Biological Activities. *Acta Biologica Turcica*, 29(4), 150-163.
- Dayan, F. E., Romagni, J. G.** (2001). Lichens As A Potential Source of Pesticides. *Pesticide Outlook*, (6), 229-232.
- Debbarma, A., vd.** (2018). Germination Performance of Chilli (*Capsicum annum* L.) and Coriander (*Coriandrum sativum* L.) As Affected by Seed Priming Treatments. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 2648-2652.
- Devran, Z.** (2003). Moleküler İşaretleyicilerin Dayanıklılık Islahında Kullanılması. *Derim*, 20(1), 1-6.
- Dieu, A., vd.** (2018). Antibacterial Activity of the Lichens *Usnea florida* and *Flavoparmelia caperata* (Parmeliaceae). *Natural Product Research*, 1-5.
- Efil, F., Üremiş, İ.** (2019). *Origanum syriacum* L. ve *Origanum majorana* L.' dan Elde Edilen Hidrosollerin Bazı Yabancı Ot Tohumlarına Biyoherbisidal Potansiyellerinin Belirlenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3), 1226-1233.
- Elix, J. A., Stocker Wörgötter, E.** (2008). Lichen Biology. *Biochemistry and Secondary Metabolites*. Cambridge University Press, UK, 104-133.
- Einhellig, F. A.** (2004). Allelopathy. *Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds*. CRC Press, America, 217-238.
- Eröz Poyraz, İ., vd.** (2018). Detection of the Genotoxicity of *Gentiana* L. Extracts by Using RAPD-PCR and ISSR-PCR Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52(4), 133-139.

Filiz, E., Koç, İ. (2011). Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler. *GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 207-214.

Fritz, D., vd. (2007). Germination and Growth Inhibitory Effects of *Hypericum Myrianthum* and *H. Polyanthemum* Extracts on *Lactuca sativa* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(1), 44-48.

Gawronska, H., Golisz, A. (2006). Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. *Allelopathy and Biotic Stresses*. Springer, Netherlands, 210-228.

Ghiyasi, M., vd. (2016). Kolza (*Brassica napus* L.) Tohumlarında Çimlenme ve Anormal Çim Oranı Üzerine, *Chenopodium album* L. 'un Allelopatik Etkisi. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 5(2), 225-228.

Girase, P. I., vd. (2019). Effect of Plant Extracts on Seed Germination Behaviour and Vigour of Okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 8(8), 830-835.

Goel, M., vd. (2014). Investigation of Allelopathic Potentiality of the Himalyan Lichen *Parmelia reticulata* Tayl. against *Phalaris minor* retz. *APCBEE Procedia*, 9, 140-144.

Goga, M., Antreich, S. J., Backor, M., Weckwerth, W., & Lang, I. (2017). Lichen Secondary Metabolites Affect Growth of *Physcomitrella Patens* By Allelopathy. *Protoplasma*, 254, 1307–1315.

Goga, M., Elečko, J., Marcinčinová, M., Ručová, D., Bačkorová, M., & Bačkor, M. (2020). Co-Evolution of Secondary Metabolites. *Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential*. Springer, Switzerland, 175-209.

Grover, A., Sharma, P. C. (2016). Development and Use of Molecular Markers: Past and Present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290-302.

Guo, S., vd. (2017). Antifungal Activity of Lichen Extracts and Usnic Acid for Controlling the Saprolegniasis. *International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)*, 3(5), 43-47.

Gülşen, O., Mutlu, N. (2005). Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. *Alatarım*, 4(2), 27-37.

Işık, Y. (2021). *Pseudevernia furfuracea* L. ve *Usnea florida* L. Liken Özütləri ile Ag Katkılı Metalik Hibrit Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve SHSY5Y Nöroblastoma Sinir

Hücrelerine Karşı Toksisitesinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

Kahya, S., Büyükcangaz, E., & Carlı, K. T. (2013). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 32(1), 31-38.

Kalra, R., Conlan, A. X., & Goel, M. (2021). Lichen Allelopathy: A New Hope for Limiting Chemical Herbicide and Pesticide Use. *Biocontrol Science and Technology*, 31(8), 773–796.

Karaaltın, S., vd. (2004). Zakkum Bitkisinin Kök, Gövde, Yaprak ve Tomurcuk Ekstraktlarının Fasulye ve Buğday Tohumlarının Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 7(1), 111-115.

Karagöz, A., vd. (2009). Antibacterial Activity of Some Lichen Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12), 1034-1039.

Karaman, R., vd. (2021). Yulaf Çim Suyunun Bazı Yabancı Ot ve Kültür Bitkisi Tohumlarının Çimlenme ile Fide Özellikleri Üzerine Etkileri. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 18(2), 312-321.

Kaymak, H. Ç. (2018). Juglon (5-hydroxy-1,4-naphthalenedione) ve Ceviz Yaprığı Ekstraktının Turp (*Raphanus sativus* L.)’ta Bazı Gelişme Özellikleri ve Verim Üzerine Etkisi. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 49 (1), 1-5.

Kekeç, G., vd. (2012). Genotoxic Effects of Catmint (*Nepeta Meyeri* Benth.) Essential Oils on Some Weed and Crop Plants. *Toxicology and Industrial Health*, 1-10.

Kınalıoğlu, K., vd. (2019). Antimicrobial Potential of *Usnea longissima* Ach. Lichen Against Human Pathogens. *GUFBED*, 9(4), 710-715.

Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. (2011). Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda / Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 27(1), 62-74.

Kitis, Y. E., vd. (2021). The Allelopathic Effects of Turkish Hulled Wheat Lines on Germination of *Amaranthus retroflexus* L. and *Lolium perenne* L. Seeds. *International Journal of Agriculture and Wildlife Science (IJAWS)*, 7(1), 56 – 62.

Koïou, K., vd. (2020). Herbicidal Potential of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Essential Oil Components on Bristly Foxtail (*Setaria verticillata* (L.) P. Beauv.): Comparison With Carvacrol, Carvone, Thymol And Eugenol. *Arch Biol Sci* 72(2),223-231.

- Kolören, Z., vd.** (2017). RFLP Yönteminin Parazitolojide Uygulama Alanları. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 215-225.
- Köksal, F.** (1999). Moleküler Biyolojik Tiplendirme Yöntemlerinin Hastane Enfeksiyonlarında Kullanımı. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi* 3, 189-195.
- Kruse, M., Strandberg, M., & Strandberg, B.** (2000). Ecological Effects of Allelopathic Plants – A Review. National Environmental Research Institute, Silkeborg, Denmark. 66 pp. – NERI Technical Report No. 315.
- Lab Akademi** (2021). *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ve Real-Time PCR*. <https://labakademi.com/polimeraz-zincir-reaksiyonu-pcr-yontemi-ve-real-time-pcr/>
- Latkowska, E., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Adamski, M., & Bialezyk, J.** (2015). Allelopathic Effects of Epiphytic Lichen *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. Colonization on the Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) bark. *Allelopathy Journal*, 35(1), 129-138.
- Levent Kolukisa, A.** (2019). *Farklı Liken Ekstraktlarının İnsan Periferik Lenfosit Kültürlerinde Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi*. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.
- Lichens of Wales** (2021). <https://wales-lichens.org.uk/species-account/usnea-florida>
- Lokajová, V., vd.** (2014). Allelopathic Effects of Lichen Secondary Metabolites and Their Naturally Occurring Mixtures on Cultures of Aposymbiotically Grown Lichen Photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *South African Journal of Botany* 93, 86–91.
- Lotina-Hennsen, B., vd.** (2006). Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. *Plant Secondary Metabolites. Targets and Mechanisms Of Allelopathy*. Springer, Netherlands, 229-266.
- Ma, H., vd.** (2020). Comparison of Allelopathic Effects of Two Typical Invasive Plants: *Mikania micrantha* and *Ipomoea cairica* in Hainan Island. *Scientific Reports*, 10(11332), 1-10.
- Macias, A. F.** (2007). Allelopathy – A Natural Alternative for Weed Control. *Pest Management Science*, 63, 327–348.
- Maia, L. C., vd.** (2008). SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR Simulation. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Plant Genomics*, 2008, 1-9.
- Mengüç, Ç.** (2018). Herbisit Toksisitesi ve Yabancı Otlara Karşı Alternatif Mücadele Stratejileri. *Turkish Journal of Weed Science*, 21(1), 61-73.

- Molnar, K., Farkas, E.** (2010). Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. *Z. Naturforsch*, 65 c, 157-173.
- Narwal, S. S., Haouala, R.** (2013). Allelopathy. *Allelopathy in Pest Management and Crop Production*. Springer, Berlin, 217-250.
- Novak, M., Novak, N., & Milinović, B.** (2021). Differences in Allelopathic Effect of Tree of Heaven Root Extracts and Isolated Ailanthone on Test-Species. *Journal of Central European Agriculture*, 22(3), 611-622.
- Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit, F.** (2009). DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 7(2), 61-70.
- Öz Aydın, S.** (2004). RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. *DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6, 113-130.
- Özbay, N.** (2018). Bazı Tıbbi Bitki ve Yabancı Ot Ekstraktlarının Biberin Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(1), 81–85.
- Özdemir, Ş., Üremiş, İ.** (2019). Şalgam ve Bazı Turp Genotiplerinin *Amaranthus retroflexus* L. ve *Portulaca oleracea* L. Üzerine Allelopatik Etkileri. *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2(1), 35-45.
- Özen, F., Yıldız, G., & Çamlıca, M.** (2017). Yabancı Ot Mücadelesinde Bazı Aromatik Bitkilerinin Uçucu Yağlarının Allelopatik Etkisi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD)*, 3(1), 40-48.
- Pathak, A., vd.** (2016). Antidermatophytic Activity of the Fruticose Lichen *Usnea orientalis*. *Medicines*, 3(3), 1-6.
- Pedrol, N., vd.** (2006). Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. *Allelopathy and Abiotic Stress*. Springer, Netherlands, 171-210.
- Pereira Peres, M. T. L., vd.** (2009). Allelopathic Potential of Orsellinic Acid Derivatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), 1019-1026.
- Pereira Peres, M. T. L., vd.** (2015). Herbicidal and Plant-Growth Stimulating Effects of Phenolic Compounds Isolated from Lichens. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 7(3), 275-281.
- Pezikoğlu, F.** (2008). Allelopatinin Ekonomik Yönü. *VIII. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi*, Bursa.

Pizňak, M., Bačkor, M. (2018). Allelopathy Effect of Lichen Extract on Germination of Selected Conifer Species. *Interaktívna Konferencia*, 22-23 Listopadu, Česká zemědělská univerzita, Prag.

Pizňak, M., vd. (2019). Allelopathic Effects of Lichen Metabolite Usnic Acid on Growth and Physiological Responses of Norway Spruce and Scots Pine Seedlings. *South African Journal of Botany* 124, 14–19.

Pradeep Reddy, M., vd. (2002). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Plant Breeding. *Kluwer Academic Publishers*, 128, 9-17.

Ranković, B., Kosanić, M. (2019). Lichen Secondary Metabolites. *Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites*. Springer Nature, Switzerland, 1-30.

Seigler, D. S. (2006). Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. *Basic Pathways for the Origin of Allelopathic Compounds*. Springer, Netherlands, 11-62.

Serim, A. T., Güzel, N. P., & Türkteş, İ. (2015). Allelopatik Bitki Ekstraktları ile Herbisitlerin Kullanımı. *Derim*, 32 (2), 225-236.

Shukla, V., Joshi, P. G., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens As A Potential Natural Source of Bioactive Compounds: A Review. *Phytochem Reviews*, 9, 303–314.

Shukla, V., Upreti, D.K., & Bajpai, R. (2014). Lichens to Biomonitor the Environment. *Secondary Metabolites and Its Isolation and Characterisation: Biosynthetic Pathways of Lichen Secondary Metabolites*. Springer, India, 21-42.

Silprasit, K., vd. (2015). Using Morphology and Genomic Template Stability (GTS) to Track Herbicide Effect on Some Submersed Aquatic Plants. *Applied Environmental Research*, 38(1), 75-85.

Sipahi, H., Yumurtacı, A. (2020). Retrotranspozon Temelli Moleküler Belirteçler Kullanılarak Türk Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşitlerinin Genomik Karakterizasyonu. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(2), 275-283.

Soltys, D., vd. (2013). Herbicides- Current Research and Case Studies in Use. *Allelochemicals as Bioherbicides- Present and Perspectives*. Intech Open, America, 517-542.

Sunar, S., vd. (2009). Determination of the Genotoxic Effects of *Verbascum speciosum* Schrad. Extracts on Corn (*Zea mays* L.) Seeds. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6), 4820-4826.

- Şekerli, M., Kılıç, N., & Cansaran Duman, D.** (2017). Liken Metabolitlerinin Antikanser Aktivite Etkisinin Moleküler Düzeydeki Mekanizmaları. *Türk Hijyen Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 74(1), 95-102.
- Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V.** (2011). Genetik Toksisite Testleri. *Tübv Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Şişek, D.** (2020). *Antep Turpu (Raphanus sativus L.) ve Fındık Turpunun (Raphanus sativus L. Var. Radikula) Bazı Tek Yıllık ve Çok Yıllık Yabancı Otlar Üzerinde Allelopatik Etkilerinin Belirlenmesi*. Doktora Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Temel, S., Topal, M.** (2004). Yem Bitkilerinde Allelopatik Özellikler ve Tarımsal Ekosistemler Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (I-2), 105-109.
- Thakur, M., Chander, H.** (2021). Potential of Lichens: A Review of Bioactive Compounds with Biological Activities. *Biological Forum – An International Journal*, 13(1), 39-47.
- Tigre, R.C., vd.** (2012). Allelopathic And Bioherbicidal Potential of *Cladonia Verticillaris* on the Germination and Growth of *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 125-132.
- Tigre, R.C., vd.** (2015). Potential Phenolic Bioherbicides From *Cladonia verticillaris* Produce Ultrastructural Changes in *Lactuca sativa* Seedlings. *South African Journal of Botany*, 98, 16-25.
- Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O.** (2021). Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203-215.
- Topal, S.** (2011). Allelokimyasalların Herbisit Etkileri. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25, 23-26.
- Türkyılmaz Ünal, B., vd.** (2017). *Cinclidotus pachylomoides* (Bryophyta)'ın Biber ve Mısır Bitkileri Üzerine Allelopatik Etkileri. *Anadolu Briyoloji Dergisi*, 3(2), 58-67.
- Uzunkaya, B.** (2015). *Farklı Liken Ekstraktlarının Ekmeklik Buğday (Triticum Aestivum L.) Tohumlarının Çimlenme ve Gelişmeleri Üzerine Allelopatik Etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Vardar Kanlıtepe, Ç., vd.** (2010). Bitki Islahında Moleküler Belirteçlerin Kullanımı ve Gen Aktarımı. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 67(1), 33-43.

- Vijayan, K.** (2005). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Mulberry Genome Analysis. *International Journal of Industrial Entomology*, 10(2), 79-86.
- Wang, Q., vd.** (2016). Effects of *Abietinella abietina* Extracts on the Germination and Seedling Emergence of *Picea crassifolia*: Results of Greenhouse Experiments. *Polish Journal of Ecology*, 64, 357-368.
- Wink, M.** (2004). Allelopathy. *Allelochemical Properties of Quinolizidine Alkaloids*, CRC Press, America, 183-200.
- Yano-Melo, A. M., vd.** (1999). Allelopathic Effect of the *Cladonia verticillaris* Lichen Extracts and Fumarprotocetraric Acid on the Early Growth of Germinated Seedlings in *Allium cepa* L. *Tropical Bryology*, 17, 133-139.
- Yarnia, M., vd.** (2011). Çavdar Kalıntılarının, Horoz İbiğinin (*Amaranthus retroflexus* L.) Toprakta Bulunan Tohum Miktarı ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 91-96.
- Yorgancılar, M., vd.** (2015). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. *Journal of Bahri Dagdas Crop Research*, 4(2), 1-12.
- Young, R. R.,** (2002). Genetic Toxicology: Web Resources. *Toxicology* 173, 103-121.
- Yücel, E.** (2000). Ecological Properties of *Pinus nigra* ssp. *pallasiana* var. *şeneriana*, *Silvae Genetica* 49(6), 264–277.
- Zhiyi, R., Haowen, Y.** (2004). A Method for Genotoxicity Detection Using Random Amplified Polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 96-103.
- Zhou, Y.H., Yu, J.Q.** (2006). Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. *Allelochemicals and Photosynthesis*. Springer, Netherlands, 127-139.
- Zrnzević1, I., vd.** (2017). *Ramalina Capitata* (Ach.) Nyl. Acetone Extract: Hplc Analysis, Genotoxicity, Cholinesterase, Antioxidant and Antibacterial Activity. *EXCLI Journal*, 16, 679-687.