



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDEN TOPLANAN BAZI
KEKİK TÜRLERİNİN GENETİK
FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

ŞEYMA ALĖAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2017

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDEN TOPLANAN BAZI
KEKİK TÜRLERİNİN GENETİK
FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

ŞEYMA ALĞAÇ

Bu tez,
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2017

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Şeyma ALĞAÇ tarafından hazırlanan “DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDEN TOPLANAN BAZI KEKİK TÜRLERİNİN GENETİK FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ” adlı bu tez, jürimiz tarafından 24/01/2017 tarihinde oy birliği ile Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Adem BARDAK (DANIŞMAN)

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. İsmail AKYOL (ÜYE)

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Kağan KÖKTEN (ÜYE)

Bingöl Üniversitesi

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKEİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksizsiz atıf yapıldığını bildiririm.

Şeyma ALĞAÇ



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2016/3-36 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDEN TOPLANAN BAZI KEKİK TÜRLERİNİN
GENETİK FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

Şeyma ALĞAÇ

ÖZET

Kekik (*Origanum* spp), ticari ve tıbbi öneminden dolayı ön plana çıkan endemik bitkilerden bir tanesidir. Ülkemizde bu türler genellikle doğadan toplanarak pazara ulaşmaktadır. Fakat bilinçsiz toplamadan dolayı bu türler yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Dolayısıyla bu türlerin doğadan yok olmadan toplanarak koruma altına alınması gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda Doğu Akdeniz Bölgesinden toplanan farklı 28 adet kekik genotipi 15 adet SRAP ve 10 adet ISSR primeriyle taranarak genotipler arasındaki genetik farklılıkları belirlenerek yerli gen kaynaklarının genetik özellikleri ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda toplam da 138 bant elde edilirken elde edilen bu bantlardan 131 tanesinin polimorfik bant olduğu gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan markörlerin hepsi polimorfik özellik göstermekle beraber ortalama polimorfizm değeri % 94.93 bulunurken, en fazla allel üreten primer kombinasyonu 14 bant ile EM17-ME11 olup, ortalama allel sayısı 4.93 olarak bulunmuştur. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) 0.04 ile 0.99 arasında değişmiş olup, ortalama PIC değeri 0.53 olarak belirlenmiştir. Tüm genotipler arasında en fazla genetik farklılık % 74 ile OV V2 (*O. vulgare* sbp. *hirtum*) ve OVV5 (*O. vulgare* sbp *hirtum*) türleri arasında, en az genetik farklılık ise % 13 ile (*Origanum. syriacum*) genotipleri arasında gözlenmiştir. Kekik genotipleri arasındaki ortalama genetik farklılık değeri % 48 olarak bulunmuştur. Ayrıca kullanılan SRAP ve ISSR markör tekniği doğadan toplanacak materyallerin genetik karakterizasyonunda güvenli bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Kekik,*Origanum* spp., SRAP, ISSR, Markör, Genetik farklılık

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı,Ocak/2017

Danışman: Yrd.Doç. Dr. Adem BARDAK

Sayfa sayısı: 33

**DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY OF SAME THYME SPECIES
COLLECTED FROM EASTERN MEDITERRANEAN REGION
(M.Sc. THESIS)**

Şeyma ALĞAÇ

ABSTRACT

Oreganum (*Origanum spp*) is one of the most prominent endemic plants because of its commercial and medical importance. In our country, these species are reached to the market directly after being picked from the wild. However, since these collections are usually performed without care and knowledge, the species face the danger of becoming extinct. Therefore, in order to avoid their disappearance from the nature, local thyme species need to be compiled and be taken under the protection. For this purpose, in our study, we determined genetic characteristics of native gene sources of the plant through detecting the genetic variations between 28 different thyme genotypes collected from Eastern Mediterranean Region by scanning them with 15 SRAP and 10 ISSR primers. A total of 138 bands were obtained at the end of the study. 131 of these bands were found to be polymorphic bands. In addition to the fact that all markers used in the study showed a polymorphism, thereby presenting the mean polymorphic value as 94.93%, the most allele-producing primer combination was determined as EM17-ME11 with 14 bands, whose average allele number was 4.9 . The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.04 to 0.99, with a mean PIC value of 0.53. The highest genetic variation among all genotypes (74%) was observed between the species of (*Origanum vulgare* sbp. *hirtum*) and OVV2 (*O. vulgare* sbp. *hirtum*) ve OVV5 (*O. vulgare* sbp *hirtum*) the least genetic variation (13%) was detected between *Origanum. syriacum* genotypes. The average genetic difference value of the thyme genotypes was found to be 48%. Moreover, it has been demonstrated that the SRAP and ISSR marker techniques can be used safely in the genetic characterization of the materials collected from nature.

Key words: Thyme,*Origanum spp.*, SRAP, ISSR, Marker, Genetic diversity

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam
Institute For Graduate Studies in Science and Technology
Department of Agricultural Biotechnology, January/2017

Supervisor: Asist.Prof.Dr.Adem BARDAK

Page Numbers: 33

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başlangıcından bitimine kadar, her konuda yardımlarını, bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Adem BARDAK'a çok teşekkür ederim.

Çalışma da kullanılan örneklerin yetiştirilmesinde katkıda bulunan Sayın Muzaffer ÖZDEMİR'e, çalışmalarım da yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım, Halil TEKEREK'e, Ebru ÇARDAKLI'ya, Döne PARLAK'a, Sadettin ÇELİK'e, Seçil TAŞDEMİR'e Alican SEVER'e, Gülşen GÜVENÇ'e ve Akide ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her zaman maddi ve manevi destek vererek varlığını her zaman yanımda hissettiren canım annem Sevinç ALĞAÇ'a, varlığıyla mutluluk duyduğum biricik kardeşim Furkan ALĞAÇ'a ve her koşulda yanımda olup desteğini esirgemeyen sevgili nişanlım Burak SÜTÇÜ'ye çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL ve METOT	10
3.1. Materyal	10
3.1.1. Bitki materyali.....	10
3.2. Metod.....	10
3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması	10
3.2.2. DNA izolasyonu ve konsantrasyonun belirlenmesi	12
3.2.3. Markör taramaları.....	14
3.2.3.1. SRAP analizleri	15
3.2.3.2. ISSR analizleri	15
3.2.4. PCR ürünlerinin elektroforez işlemi ve DNA bantlarının elde edilmesi	15
3.2.4.1. DNA bantlarının skorlanması	16
3.2.5. Veri analizi	16
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	18
4.1. Kullanılan Markörlerin Polimorfizm Bilgi İçerikleri (PIC) ve Allel Sayıları	18
4.2. Genotipler Arasındaki Genetik Benzerliklerin Değerlendirilmesi	19
4.3. Genotiplere göre oluşturulmuş filogenetik ağaç	22
4.4. Popülasyonun genetik yapı analizi	23
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	25
KAYNAKLAR.....	26
ÖZGEÇMİŞ.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Kekik genotiplerinin araziden görünümüleri	11
Şekil 3.2. Kekik genotiplerinin toplanıp yıkanması	11
Şekil 3.3. Kekik genotiplerinin araziden toplanarak laboratuara getirilmesi	12
Şekil 3.4. Kekik genotipinin havanda sıvı azotla ezilmesi	13
Şekil 3.5. DNA izolasyonu sonucu pelet oluşumu	13
Şekil 3.6. Genomik DNA görüntüleri.....	14
Şekil 4.1.Genotiplere göre oluşturulmuş Filogenetik ağaç.....	22
Şekil 4.2. STRUCTURE Programından elde edilen ideal K değeri hesaplama grafiği	23
Şekil 4.3. Kekik genotiplerinin STRUCTURE programı ile kümeleme analizi	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kekik türlerine dahil genotipler ve toplandıkları yerler..	10
Çizelge 3.2. PCR’da kullanılan SRAP primer kombinasyonları ve Nükleotit dizilimler....	14
Çizelge 4.1.Kullanılan SRAP ve ISSR primerlerinin allel sayıları ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerleri.....	19
Çizelge 4.2. Genotipler arasındaki genetik farklılık.....	27



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA)
AFLP	: Amplifiye Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
SSR	: Basit Dizi Tekrarı (Simple Sequence Repeat)
ISSR	: Kısa Dizi Tekrarları Arası (Inter Simple Sequence Repeat)
SRAP	: Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (Sequence-Related Amplified Polymorphism)
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
ng	: Nanogram
mM	: Milimolar
PCA	: Temel Bileşenler Analizi
PIC	: Polimorfik Bilgi İçeriği (Polimorphic Information Content)
UPGMA	: Aritmetik Ortalama ile Ağırlıksız Çifti Grubu metodu (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
pmol	: pikomol
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
dNTP	: Deoxynucleotide trifosfat
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit

1.GİRİŞ

Bitkiler çok uzun yıllardan bugüne kadar gıda ve tedavi amaçlı kullanılan dünya nüfusu için oldukça önemli olup yaşam kaynağının birincil üreticilerdir (Benli ve Yiğit, 2005).Türkiye bulunduğu önemli coğrafi konum itibariyle % 31,82'sinin endemik olduğu çok zengin ve önemli bitki örtüsüne sahiptir (Sadıkoğlu., 2005). Bitkiler temel ihtiyaçlarımızı karşılayan birçok hammaddenin orjinini oluştururken bitkilerden elde edilen maddeler yüzyıllar boyunca tıbbi ilaçların tek kaynağı olmuştur (Raski ve Ripoll, 2004). Ülkemizde yetişen birçok bitkinin farklı kısımları gıda, tıbbi veya diğer amaçlarla toplanmakta, yurtiçi ve yurtdışı talepleri karşılanmaya çalışılmaktadır. Türkiyede 45 cins, 546 tür ve 730 takson ile temsil edilen Lamiaceae familyasında, 38 Thymus türü (% 52'si endemik), 23 Origanum türü (% 65'i endemik) dir. 14 Satureja türü (% 28'i endemik), 2 Thymbra türü ve 1 Coridothymus türü bulunmaktadır(Başer, 1993;1994).Yaygın olarak ticareti yapılan konu olan kekik türü Origanum türleridir(Başer, 2001; Davis, 1988; Biskup ve Saez, 2002; Kintzios, 2002).

Origanum türlerinin gen merkezi konumundaki Ülkemizde Halk arasında “kekik” olarak adlandırılmakta ve bu türler çok güçlü antimikrobiyal ve antioksidan etkileri olduğu, önemli fenolik bileşenlerince zengin uçucu yağlar içermesinden dolayı gıda, parfüm, kozmetik ve ilaç gibi sanayi kollarında hammadde olarak kullanılmaktadır (Baydar ve Erdal., 2004; Özkan ve ark., 2009).

Origanum cinsi, *Lamiaceae* ailesinin bir üyesidir ve karmaşık bir taksonomiye sahiptir. Bu cins, çok sayıda tür, alttür, çeşit ve melez içeren (Azizi ve ark., 2009), 10 bölüme ayrılmış ve 42 tür veya 49 alttürden oluşmaktadır. Origanum taksonunun 49 alt türünden 46'sı Akdeniz bölgesine yerel olarak dağılmış olup, bunlardan 21 takson Türkiye ye özgü ve endemiktir (Ietswaart 1980; Kokkini 1997). Günümüzde dünyada ticarete konu olan origanumların çoğu belirli bir alt türe odaklanmadan Türkiye ve Yunanistan'dan toplanmaktadır (Oliver, 1997). Son zamanlarda, esansiyel yağ ve ekstraktlarının antimikrobiyal, antifungal, böcek öldürücü ve antioksidatif etkileri nedeniyle kekik büyük ilaç endüstrilerinin hedefi olmuştur (Kulisic ve ark., 2004; Bakkali ve ark., 2008). Kekik uçucu yağ asidi ana bileşenleri karvakrol ve timolden oluşmakta ve ardından γ -terpinene, *p*-simen, linalol, terpinen-4-ol ve sabinen hidrat gibi bileşenler gelmektedir (D'Antuono ve ark. 2000; Skoula ve Harborne 2002).

Türkiye'de kekik türleri arasında hem ekonomik hem de tarımsal kalite olarak en değerlileri Origanum cinsine ait olup, Ege, Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde

yayılış gösteren İzmir kekiği (*Origanum. onites*), İstanbul kekiği (*Origanum. vulgare ssp. hirtum*), Sütçüler kekiği (*Origanum. minutiflorum*), Alanya kekiği (*Origanum. majorana, syn. Origanum. dubium*) ve Suriye kekiği (*Origanum. syriacum var. bevanii*)’dir. Özellikle “İzmir kekiği” veya “Bilyeli kekik” olarak isimlendirilen *Origanum onites* L., Ülkemizde doğadan en fazla toplanan, yaygın kültürü yapılan ve en fazla ihracatı yapılan kekik türüdür (Başer, 1994). Özellikle doğadan toplanmak suretiyle pazara ulaşan bu bitkilerin büyük çoğunluğunun ülkemize özgü olduğu görülmektedir. Bu endemik türlerin toplama yoluyla doğadan yok olmadan önce, koruma altına alınması ve ıslah programlarının oluşturulması önem taşımaktadır.

Klasik bitki ıslahı çalışmaları, birçok kültür bitkisinin üretilmesinde yıllardır kullanılmaktadır (Ulukan, 2007). Klasik bitki ıslahı, yapılan melezlemeler sonucu üstün özellik gösteren genotiplerin fenotipik olarak seçilmesine dayanmaktadır (Eserkaya ve ark., 2010). Dolayısıyla morfolojik özellikler çoğunlukla çevre şartlarının etkisi altındadır. Bu yüzden seleksiyon başarısı düşük kalmaktadır. DNA markörlerinin bulunup geliştirilmesiyle seleksiyon başarısını arttırmak için uzak akrabaların belirlenip ıslah programlarında kullanılması gerekmektedir (Eserkaya ve ark., 2010)

Bitki ıslahı programına başlamadan önce kullanılacak genotiplerin genetik potansiyellerinin belirlenmesi ıslah çalışmalarındaki başarıyı artıracak etkiye sahiptir (Taşpınar ve ark., 2002). Islah çalışmalarında gerekli varyasyon tescil edilmiş çeşitler, yerel çeşitler ve yabani popülasyonlardan sağlanmaktadır. Özellikle yabani popülasyonlar sahip oldukları biyotik ve abiyotik stres şartlarına dayanıklılık genlerini taşımalarından dolayı, çeşit geliştirme çalışmalarında vazgeçilmez gen kaynaklarıdır. Bu yüzden bitki materyallerin morfolojik ve genetik karakterizasyonlarının yapılarak, bu karakterlerin kültür çeşitlerine aktarılması gerekmektedir (Eserkaya ve ark., 2010).

Genetik kaynaklar origanum türlerinin potansiyellerini araştırmak için bir anahtar rolü oynayabilirler (Putievsky ve ark.1997; Mastro1997). Bu nedenle ıslah programlarının oluşturulabilmesi için genetik kaynakların yok olmadan toplanarak, biyoçeşitliliğin korunması ve türler arasındaki genetik çeşitliliğin bilinmesi vazgeçilmezdir (Karp ve ark.1997; Joshi ve ark., 2004; Baydar ve ark., 2009). Şu ana kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla morfolojik ve esansiyel yağ asitleri bileşimi üzerine yoğunlaşırken (Günüz ve Özürgücü 1999; Azcan ve ark. 2000; Ceylan ve ark., 2003), türler içerisindeki genetik çeşitliliği belirleme sınırlı kalmıştır (Tonk ve ark., 2010).

DNA markörlerinin kullanılması, hızlı sonuç vermeleri, çevre şartlarından etkilenmemelerinden dolayı genetik çeşitliliği belirleme çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Manjarrez-Sandoval ve ark., 1997; Wendel ve ark., 1992). Ayrıca, ıslahçı haklarının korunmasında (Smith ve Smith, 1992), heterotik grupların sınıflandırılmasında (Dudley ve ark., 1991; Senior ve ark., 1998), bitkiler ve onların yabani akrabaları arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemede (Liu ve ark., 2000), pedigrî analizlerinde (Smith ve ark., 1997) ve istenilen bitkisel özelliklerin seçiminde (Young, 1996) kullanılmaktadır.

Kekik bitkisinde genetik farklılık RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Ayanoglu ve ark.2006), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams ve ark.1990), SSR (Simple Sequence Repeat), SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) gibi çeşitli markör teknikleri kullanılarak belirlenebilmektedir (Gounaris ve ark.2002; Katsiotis et al.2009).

Özellikle genomu hakkında yeterli bilgi sahibi olunmayan türlerin genetik karakterizasyon çalışmalarında ISSR ve SRAP markörleri en kullanışlı markörlerin başında gelmektedir. ISSR markörü genom ve primerin dizilimi hakkında ön bir bilgiye ihtiyaç duymadan mikrosatelitlerden elde edilen bir markör tekniğidir (Zietkiewicz ve ark., 1994; Hilooğlu, 2012). SSR protokolü iki spesifik primerlerden oluşurken, ISSR markörü SSR marköründeki mikrosatelitlerin çoğaltılmasıyla DNA'nın 3' → 5' doğru tek bir primer kullanılarak çoğaltılmasıdır. Allelik polimorfizmler, genomda tekrarlanan bölgelerin eksik olması, silinmesi veya eklenmesi durumunda ortaya çıkan polimorfizmdir. 5' ucunu bağlayıcı primerlerdeki polimorfizmler mikrosatelitlerin uzunluğundaki farklılıklardan dolayı ortaya çıkmaktadır. ISSR markörleri tekrarlı bölgelerden rastgele seçilerek oluşturulur ve tek bir analiz ile birden çok lokusu analiz etmeleri gibi avantajlara sahiptir.

SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) markörleri Li ve Quiros (2001) tarafından geliştirilen, PCR tabanlı, polimorfizm oranı yüksek, tekrar edilebilir ve radyoaktif etiketlemeye ihtiyaç duyulmamasından dolayı çok fazla kullanım alanı bulmaktadır (Powell ve ark., 1996; Russel ve ark., 1997; Pejic ve ark., 1998). SRAP marköründe 2 primer bulunmakta ve ileri primer 17 nükleotitten oluşurken, geri primerler 18 nükleotitten oluşmaktadır. SRAP marköründe 5' ucunda 14 nükleotitten oluşan çekirdek dizinin (core sequence) spesifik olmayan 10–11 bazlık bölümüne doldurma

diziler (filler sequence), ve bu diziyi takip eden primerler için CCGG dizisi, sonraki primerler için AATT dizisi gelmektedir. Çekirdek diziyi takip ederek çeşitlenmeyi sağlayan 3' ucunda üç seçici nükleotidden meydana gelen dizilerin bulunduğu primerler tasarlanmıştır. CCGG dizisi bakımından zengin olan ön primerler genelde ekzonları, AATT dizisi yönünden zengin olan ters primerler genelde intron ve promotorları hedef almaktadır. SRAP tekniği, kolay, maliyeti az olan , polimorfizm oranı yüksek, gen etiketleme ve cDNA parmak izi çalışmalarına uygun, seçilen bantların dizilenmesi açısından kolaylıklar barındırmakta (Li ve Quiros, 2001) ve çok çeşitli bitki türlerinde, genetik haritalama çalışmaları , gen etiketleme ve genetik çeşitlilik araştırmalarında kullanılmaktadır (Budak ve ark., 2004; Filiz ve ark., 2009).



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gounaris ve ark. (2002), rastgele toplanan kekikler, hibrit ve ana genotipler olarak çiçeklenme kontrollerine göre gruplandırmışlardır. Daha sonra uçucu yağ analizi ve RAPD markörlerini kullanarak parmak izi analizi yapmışlardır. RAPD markörleri ile ana kekikler ve hibrit kekikler tespit edilerek aralarındaki genetik farklılıkları belirtmişlerdir.

Gengaihi ve ark. (2006), tarafından yapılan bu çalışmayla farklı kekik genotiplerini doku kültürü ortamında MS, B5 ve LS besin ortamlarındaki 2,4-D , NAA , BAP ve Kin hormonlarının farklı konsantrasyonlarında kekik genotiplerine ait gelişimleri incelenmiş ve en iyi ortamın MS olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra uçucu yağ analizi yapmışlar ve hepsinde carvocrol bulunurken timol'un ise sadece *O.vulgare* de bulunduğunu tespit etmişlerdir. SDS-PAGE protein ve RAPD markörüyle yapılan moleküler tarama sonucunda hücre kültürleri arasında bir varyasyon olduğunu gözlemişlerdir.

Ayanoğlu ve ark. (2006), Origanum Türkiye de oldukça fazla satılan bir mutfak bitkisi olduğunu, kekik bitkisinin genetik farklılıkları hakkında sınırlı bir bilginin bulunmasına rağmen ıslah programlarında kullanılan bir bitki olduğunu bildirmiştir. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünde bulunan kekiklerde genetik farklılığı belirlemek amacıyla AFLP markörü ile 44 kekik genotipini taramıştır. Analiz sonucunda toplam 365 bant elde edilirken elde edilen bantlardan 294'ünün polimorfik olduğunu tespit etmiştir. Jaccardın benzerlik katsayısı kullanılarak benzerlik katsayısı oranı % 0.396 -% 0.725 arasında bulunmuş ve kekikler arasındaki genetik çeşitliliğin oldukça fazla olduğu tespit edilirken genetik çeşitlilik çalışmalarında AFLP markörünün ıslah programları için kullanılabileceğini belirtmiştir.

Dababneh (2007), tarafından farklı kekik genotipindeki antimikrobiyal ve genetik varyasyonu belirlemek için 3 adet RAPD markörü kullanılarak yapılan çalışma ile genotipler arasındaki genetik farklılıkları belirlemiştir. Belirlenen genetik farklılığa göre UPGMA yöntemine göre kümeleme yapmıştır.

Sunar ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada 15 kekik arasındaki fenotipik ve genetik varyasyonu incelemişlerdir. Genetik varyasyonu belirlemek için 20 adet RAPD markörü ile genotipler taranmış ve 7 adet primerin polimorfik bant gösterdiğini tespit etmişlerdir. Jaccardın benzerlik katsayısı kullanılarak kekikler arasındaki benzerlik oranını % 0.077 - % 0.867 arasında bulmuşlardır.

Klocke ve ark. (2008), bazı kekik çeşitlerini RAPD primeriyle taramışlardır. RAPD primerinin basit olması, çok sayıda tarama yapabilmesi ve rastgale olması da göz önünde bulundurarak genetik farklılık çalışmalarında rahatlıkla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Novak ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada *Origanum vulgare* ve *Origanum majorana* kekiklerinde basit dizi tekrarı (SSR) markörlerini *O. vulgare* uçucu yağ bezlerini ifade eden diziler (EST) den geliştirmişlerdir. *Origanum vulgare* ve 19 *Origanum majorana* bitkileri 13 SSR –EST markörü kullanılarak analiz etmişlerdir.

Sözen ve ark. (2008), tıbbi önemi olan *Origanum onites* bitkisini hekzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB) metoduna göre genomik DNA izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Değiştirilmiş CTAB yöntemiyle (yüksek tuz konsantrasyonu, polivinil piroldon ve ardından izoamil alkol / kloroform) DNA izolasyonu yapıldıktan basit dizi tekrarları (ISSR) ve (RAPD) markörlerini kullanarak moleküler yönden analiz etmişlerdir.

Quan ve ark.(2008), farklı ekolojik bölgelerden toplanan 20 farklı kekik türüne ait genotipler ITS ve ISSR primeriyle analiz edilmiştir.ITS dizisi ve primerlerinin analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağacı inceleyip kekikler arasındaki benzerlikleri belirlemişlerdir. Huiyuan (*T .quinquecostatus*) popülasyonunu ve Xingkai popülasyonu (*T. quinquecostatus* var. *przewalskii*) yüksek bir genetik benzerlik gösterdiği tespit edilirken, ISSR markörünün farklı ekolojik bölgelerde yetişen bitkiler arasındaki benzerlikleri belirlemede oldukça iyi olduğunu bildirip başka çalışmalarda da kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Akeel ve ark. (2009), yaptıkları çalışmayla *O. syriacum* ve *O. majorana* popülasyonundaki 14 yabancı kekik genotiplerini 48 adet RAPD primeriyle taramışlardır. Analiz sonucunda 1359 adet skorlanabilir bant elde edilirken bunlardan sadece 136 tanesinin polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Kekik genotipleri arasındaki benzerlik katsayısı 0.85 ile 0.000 arasında olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra yapılan dendrogram analiziyle *O.syriacum* ve *O.majorana* kekikleri arasında genetik olarak bir farklılık olduğunu bildirmişlerdir.

Trindade ve ark. (2009), yaptıkları bu çalışmayla yağ analizi ve genetik karakterizasyonu RAPD primeriyle incelemişlerdir. 17 tane RAPD primeri kullanılmış ve 187 adet skorlanabilir polimorfik bant elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda RAPD primeri ve uçucu yağ kompozisyonlarının aynı şekilde kümelenme göstermediğini tespit

etmişlerdir. Toplama bölgesi, kimyasal analizler ve moleküler değerlendirmeler arasında düz bir korelasyon tespit edilememiştir.

Rahimmelek ve ark. (2009), İranda farklı coğrafi bölgelerden toplanan farklı 17 adet kekik genotipleriyle , 15 ISSR markörü kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda, 256 tane bant elde etmişler ve elde edilen bantların 228 tanesinin polimorfik olduğu saptamışlardır. Daha sonra Jaccard'ın UPGMA metoduna göre dendogramlar oluşturup ve farklılıkları belirlemişlerdir.

Azizi ve ark. (2009), yaptıkları çalışmayla kekik *Origanum* çeşitlerindeki genetik farklılığı AFLP ve SAMPL analizleri ile değerlendirmişlerdir. 42 kekik DNA'sını, 7 AFLP ve 7 SAMPL primeri ile taramışlar, tarama sonucunda buldukları bantları UPGMA yöntemi uyarınca analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda her iki primerinde sonuç verdiğini fakat SAMPL primerinin daha ayırt edici bant verdiğini fark etmişlerdir.

Looy ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada 21 adet kekik genotipi arasındaki genetik farklılığı AFLP markörüyle analiz etmişlerdir. Kekikler arasındaki ortalama genetik benzerlik oranını % 0.24 bulmuşlardır.

Katsiotis ve ark. (2009), kekik (*Origanum*) genotiplerindeki genetik varyasyonu değerlendirmek için RAPD markörünü kullanmışlar ve seçilen 10 adet RAPD primerden 133 adet bant elde etmişler , elde edilen bu bantların 27 tanesinin polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda farklı coğrafik bölgeler arasında önemli farklılıklar saptamışlar ve *O. vulgare subsp.* arasında dikkat çekici bir genetik farklılaşmanın olduğunu bildirmişlerdir.

Tonk ve ark. (2010), 14 adet kekik genotipini kimyasal ve genetik olarak analiz etmişlerdir. Kekik genotiplerindeki genetik farklılığı RAPD markörleriyle belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda genetik benzerlik oranını 0.49 ve 0.73 arasında olduğunu ve genetik varyasyonun düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Khalil ve Li. (2012), Suriyeden toplanan bazı kekik genotiplerini 27 adet RAPD markörü kullanarak taramış ve tarama sonucunda toplam 198 bant elde etmişlerdir. Polimorfizm oranını % 90.91 olarak belirlerken bantlardaki toplam polimorfizm oranını % 78.73 bulmuşlardır. Bu sonuçlar popülasyonlar arasında benzerlik ve yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Azizi ve ark (2012), 42 adet *Origanum vulgare* genotipini moleküler ve morfolojik yönden incelemişlerdir. Uçucu yağların bileşenleri ise GC/MS analizi yaparak

belirlemişlerdir. 214 AFLP (amplifiye fragman boyu polimorfizmi) ve 263 SAMPL (seçici olarak amplifiye mikro polimorfik loci) de dahil olmak üzere 477 polimorfik bant elde etmişlerdir.

Helsen ve ark. (2013), yaptıkları bu çalışmayla bazı kekik (*Origanum*) genotiplerini 10 mikrosatelit markörüyle analiz etmişler. Genetik karakterizasyon sonucunda benzerlik oranını 0.040 bulmuşlardır.

Lukas ve ark. (2013), *Origanum* bitkisi yüzyıllardan beridir insanlar tarafından kullanılan uçucu yağ açısından oldukça zengin bir yapıya sahip bir bitkidir. Günümüzde *O. majorana* (*O.onites*, *O.dubium*, *O.majorana* ve *O.syriacum*) türü en fazla kullanılan türlerden biridir. Kekik çok önemli bir bitki olmasına rağmen bu türler arasındaki genetik farklılıklar bilinmemektedir. Bu türlerin genetik olarak farklılıklarını belirlemek için 5 adet mikrosatelit kullanılarak türler arasındaki taksonomiye belirlemişlerdir. Sonuç olarak *O.onites* ve *O.syriacum* bitkileri arasında daha uzak bir ilişki olduğu tespit edilirken *O.dubium* ve *O.onites* arasında yakın bir ilişki bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Rustaei ve ark. (2013), *Thymus* türlerinin arasındaki genetik ilişkileri RAPD markörü ile incelenmişlerdir. 27 kekik genotipi ve 16 RAPD markörü kullanılarak analiz yapmışlar ve 264 polimorfik skorlanabilir bant elde etmişlerdir. Bu Çalışmayla önemli tıbbi bir bitki olan kekiğin RAPD markörleriyle genetik çeşitliğin belirlenmesiyle genetik materyal elde edilmesi ve yetiştiricilerin daha sonraki ıslah programlarında bunları kullanmasına olanak sağlamıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar haritalama popülasyonlarında ebeveyn olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Nateren ve ark. (2013), Meksika *origanumu* genellikle yabani popülasyonlardan hasat edilen aromatik bir bitkidir. *Origanum* hakkında yapılan genetik çalışmalar oldukça azdır. Uçucu yağ bileşimi çevre koşulları ve genetik yapıya göre değişiklik göstermektedir. Yapılan bu çalışmayla farklı bölgelerden toplanan 14 farklı kekik genotipi AFLP markörü kullanılarak analiz etmişlerdir. Tarama sonucunda popülasyon polimorfizm oranını % 60.9 olarak bulurken, genetik çeşitliliğin orta derecede olduğu, farklı çevre koşullarının genetik yapıyı çok fazla etkilemediğini, korelasyon analizi sonucuna göre genetik markörler ile uçucu yağ bileşimi arasında bir bağlantı olduğunu tespit etmişlerdir.

Ince ve ark. (2014), kekik ilaç ve kozmetikte oldukça fazla kullanılan önemli bir bitki olduğu bilinmektedir. Basit sekans tekrarları olarakta bilinen mikrosatelitler birçok bitki türünde oldukça fazla bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmayla farklı *origanum*

türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi incelemek amacıyla mikrosatelit ve CAPS-mikrosatelit markörünü kullanarak taramışlardır. Tarama sonucunda bu markörlerin moleküler çalışmalarda özellikle taksonomi araştırmalarında rahatlıkla kullanılabilir markörler olduğunu belirleyerek bir sonraki ıslah çalışmalarında yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Birçok endemik bitki türüne gen merkezi konumundaki Ülkemizde bu türlerin doğadan yok olmadan toplanıp, karakterize edilerek ıslah programlarının oluşturulması önem arz etmektedir. Bu çalışmada Doğu Akdeniz bölgesinden toplanan bazı kekik (*Origanum spp.*) türleri ve bu türlere ait farklı genotipleri genetik olarak karakterize etmek amacıyla, türlerin ve bu türlere ait farklı lokasyonlardan toplanan genotiplerin genetik farklılıkları belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Kahramanmaraş Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma enstitüsünden daha önceden Kahramanmaraş, Osmaniye, Hatay, Mersin ve Adana illerinden toplanmış yabani kekik türleri ve genotipler bitki materyalini oluşturmaktadır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kekik türlerine dahil genotipler ve toplandıkları yerler

Kekik.NO	TÜR ADI	BULUNDUĞU YER
OS1	<i>Origanum syriacum</i>	Yayladağ/Hatay
OS2	<i>Origanum syriacum</i>	Hatay
OS3	<i>Origanum syriacum</i>	Arsuz/Hatay
OS4	<i>Origanum syriacum</i>	Erzin/Hatay
OS5	<i>Origanum syriacum</i>	Zorkun/Osmaniye
OS6	<i>Origanum syriacum</i>	Zorkun/Osmaniye
OS7	<i>Origanum syriacum</i>	Andırın/Kahramanmaraş
OS8	<i>Origanum syriacum</i>	Onikişubat/Kahramanmaraş
OS9	<i>Origanum syriacum</i>	Tarsus/Mersin
OVH1	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Mersin-Tarsus- Gülek Yolu Çamlık alan
OVH2	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Mersin-Tarsus- Gülek Yolu Çamlık alan
OVH3	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Mersin-Tarsus- Gülek Yolu Çamlık alan
OVH4	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Adana Feke Bahçecik
OVH5	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Adana Feke Bahçecik
OVH6	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Adana Feke Bahçecik
OVH7	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Kahramanmaraş - Ahırdağ- Bulanık köyü
OVH8	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Kahramanmaraş- Onikişubat- Kertmen köyü
OVH9	<i>Origanum vulgare sbp. hirtum</i>	Kahramanmaraş- Onikişubat- Kertmen köyü
OVV1	<i>Origanum vulgare sbp. vulgare</i>	Kahramanmaraş- Göksun- Gücüksu
OVV2	<i>Origanum vulgare sbp. vulgare</i>	Kahramanmaraş- Göksun- Gücüksu
OVV3	<i>Origanum vulgare sbp. vulgare</i>	Kahramanmaraş Göksun- Ericek Haytalar
OVV4	<i>Origanum vulgare sbp. vulgare</i>	Kahramanmaraş Göksun- Ericek Haytalar
OVV5	<i>Origanum vulgare sbp. vulgare</i>	Kahramanmaraş Göksun- Büyükkızılcık kasabası
OVV6	<i>Origanum vulgare sbp. vulgare</i>	Kahramanmaraş Göksun- Büyükkızılcık kasabası
OVV7	<i>Origanum vulgare sbp. vulgare</i>	Kahramanmaraş Göksun- Büyükkızılcık kasabası
OM1	<i>Origanum majorana</i>	Mersin-Erdemli-Tömük kasabası kırsalı
OM2	<i>Origanum majorana</i>	Mersin - Silifke -İmamlı köyü yolu üzeri
OM3	<i>Origanum majorana</i>	Mersin- Silifke - Göksu vadisi

3.2. Metod

3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması

Arazide bulunan (Şekil 3.1) kekik bitkilerine ait yaprak örnekleri alınarak iki defa saf su ile yıkanarak (Şekil 3.2) kuru buz içerisinde (Şekil 3.3) laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonu yapılana kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1.Kekik genotiplerinin araziden görünümüleri



Şekil 3.2. Kekik genotiplerinin toplanması ve yıkanması



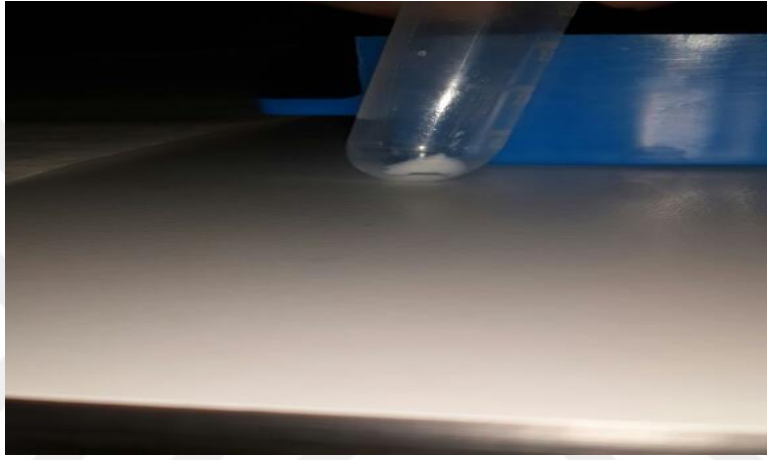
Şekil 3.3. Kekik genotiplerinin araziden toplanarak,soğuk zincir takip edilerek laboratuvara getirilmesi

3.2.2. DNA izolasyonu ve konsantrasyonun belirlenmesi

Çalışmada kekik yaprağı için DNA izolasyon protokolü Bardak (2007) göre aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır. İlk olarak her bir bitkiden alınan 4-5 adet genç yaprak havanlara koyulup, sıvı azot ile iyice öğütülmüştür. Öğütülen yaprak parçaları 2 ml'lik eppendorf tüplere konulmuştur (Şekil 3.4). Daha sonra tüplerin içerisine 0.5 ml izolasyon solüsyonu {0.1 M Tris-HCl (pH:8), 1 M NaCl, 0.02 M EDTA(pH:8), % 2 w/v CTAB, % 2 Polyvinyl-pyrrolidone-40, 1 mM 1,10-Phenanthroline monohydrate, % 0.2 P-mercaptoethanol} ilave edilmiştir. Tüpler yavaşça çalkalanarak 65 °C sıcaklıktaki su banyosunda 1 saat kadar bekletilmiş ve su banyosundan alınan örneklerin üzerine 0.5 ml chloroform:isoamyl alkol (24:1) eklenerek 12000 (rpm) devirde, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmındaki sıvı, yaprak parçalarıyla karıştırılmadan dikkatli bir şekilde yeni tüplere alınmıştır. Yeni tüplerin üzerine 0.5 ml isopropanol eklendikten sonra 1 saat, -20 °C'de bekletilmiştir. -20 °C'den alınan örnekler, 12000 devirde, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve DNA'ların tüplerin dibine çökmesi sağlanarak sıvı kısım uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.5). Uzaklaştırma işleminden sonra, 0.5 ml % 70 etanol eklenerek 13000 devir de, +4 °C'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. %70'lik etanol işleminden sonra, 0.5 ml % 96 'lık etanol eklenerek 13000 devirde, +4 °C'de 2 dakika santrifüj yapılarak DNA'lar temizlenmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, kuruyan DNA'lara, 300 µl Tris-EDTA solüsyonu {10 mM Tris (pH:8), 1 mM EDTA (pH:8), 1 M NaCl} eklenerek DNA izolasyonu tamamlanmıştır.

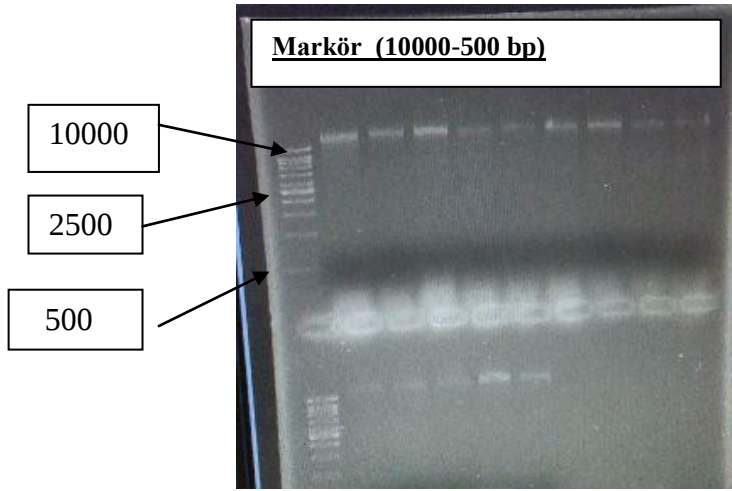


Şekil 3.4. Kekik genotipinin havanda sıvı azotla ezilmesi



Şekil 3.5. DNA izolasyonu sonucu pelet oluşumu

İzole edilen DNA'lar % 1'lik agaroz jel ile görüntülenmiştir (Şekil 3.6). Daha sonra örnekler, Nanodrop spektrofotometre (Thermo Nanadrop 2000 spektrofotometre) ile DNA konsantrasyonları ve izolasyon saflıkları belirlenmiştir. Sonraki uygulayacağımız markör çalışmaları için DNA konsantrasyonları 25 ng/μl olacak şekilde seyreltme yapılmıştır. Seyreltilen DNA'lar ile markör taramasına geçilmiştir.



Şekil 3.6. Genomik DNA görüntüleri Markör taramaları

Çalışmada ISSR ve SRAP markörleri kullanılmış olup, markör taramalarında 10 adet ISSR ve 15 adet SRAP markörü olmak üzere toplam 25 adet markör kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Çalışılan SRAP primer kombinasyonları Saebnazar ve Rahmani. (2013)'den yararlanılarak ve rastgele seçilerek oluşturulmuştur. ISSR primerleri , Zietkiewicz ve ark. (1994)'e göre yapılmıştır.

Çizelge 3.2. PCR'da kullanılan SRAP ve ISSR primerleri ve Nükleotit dizilimler

	No	Primerler	Nükleotit Dizilimi (EM/ME- 3'-5')
SRAP	1	EM1/ME11	GACTGCGTACGAATTAAT/TGAGTCCAAACCGGGTA'
	2	EM15/ME11	GACTGCGTACGAATTGA-TGAGTCCAAACCGGGTA'
	3	EM3/ME11	GACTGCGTACGAATTGAC / TGAGTCCAAACCGGGTA
	4	EM17/ME11	GACTGCGTACGAATTATG / TGAGTCCAAACCGGGTA
	5	EM2/ME11	GACTGCGTACGAATTTGC / TGAGTCCAAACCGGGTA
	6	EM3/ME2	GACTGCGTACGAATTGAC / TGAGTCCAAACCGGAGC
	7	EM15/ME2	GACTGCGTACGAATTGAT / TGAGTCCAAACCGGAGC
	8	EM5/ME2	GACTGCGTACGAATTAAC / TGAGTCCAAACCGGAGC
	9	EM7/ME2	GACTGCGTACGAATTCAA / TGAGTCCAAACCGGAGC
	10	EM8/ME2	GACTGCGTACGAATTAC / TGAGTCCAAACCGGAGC
	11	EM12/ME2	GACTGCGTACGAATTCTC / TGAGTCCAAACCGGAGC
	12	EM13/ME2	GACTGCGTACGAATTCTG / TGAGTCCAAACCGGAGC
	13	EM13/ME11	GACTGCGTACGAATTCTG / TGAGTCCAAACCGGGTA
	14	EM3/ME1	GACTGCGTACGAATTGAC / TGAGTCCAAACCGGATA
	15	EM5/ME1	GACTGCGTACGAATTAAC / TGAGTCCAAACCGGATA
ISSR	16	ISSR6	ACACACACACACACGT
	17	ISSR8	ACACACACACACACCCC
	18	ISSR12	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC
	19	ISSR13	ACACACACACACACACC
	20	ISSR11	GAGAGAGAGAGAGAGATC
	21	ISSR1	CACACACACACAA
	22	ISSR2	CTCTCTCTCTCTCTG
	23	ISSR14	ATGATGATGATGATGATG
	24	ISSR4	CACACACACACAGC
	25	ISSR7	ACACACACACACACCCG

3.2.2.1. SRAP analizleri

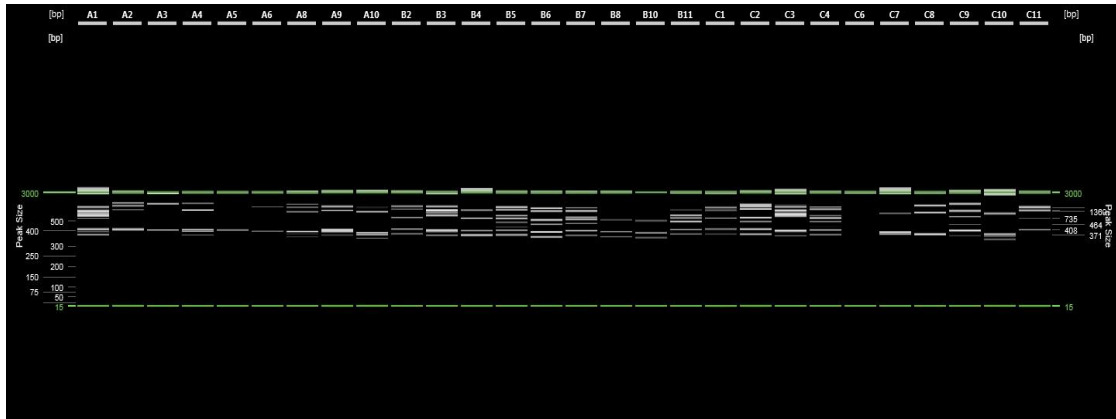
PCR reaksiyonu için, 200 µl hacminde 96'lık PCR tüplerine; 1 µl dNTP (5mM) (Vivantis), 2 µl 10x PCR solüsyonu, 1.5µl MgCl₂ (25mM), SRAP marker (1 µl (10 pmol) F ve 1 µl (10 pmol) R), 2 µl genomik DNA (25 ng), 11 µl dH₂O, 0.5 µl DNA Taq polimeraz (vivantis) olacak şekilde toplam 20 µl solüsyon hazırlanmıştır. PCR cihazı 94°C'de 5 dak., 1 döngü, 35 döngü (94 °C'de 1 dk., 50 °C'de 30 sn. ve 72 °C'de 1 dk.), 72 °C'de 10 da. ve 4 °C'de ∞ şeklinde programlanarak markör çoğaltmaları yapılmıştır.

3.2.2.2. ISSR analizleri

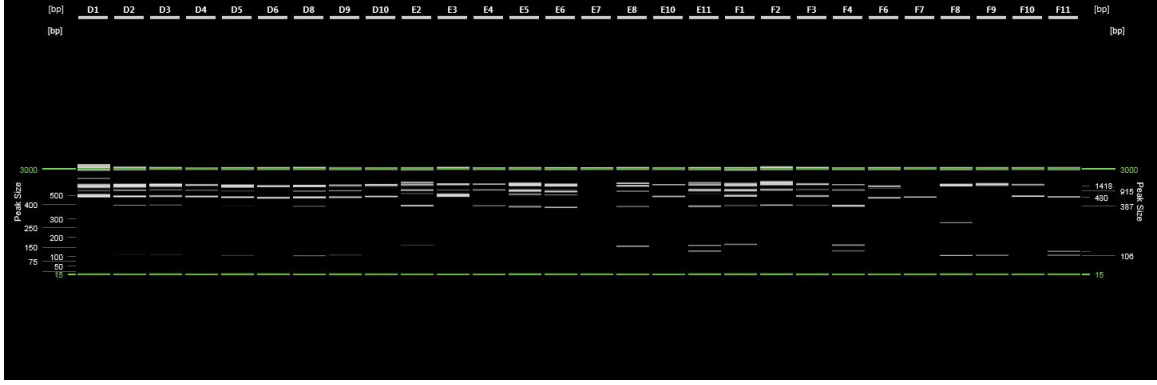
PCR reaksiyonu için, 200 µl hacminde 96'lık PCR tüplerine; 1 µl dNTP (5mM) (Vivantis), 2 µl 10x PCR solüsyonu, 1.5µl MgCl₂ (25mM), 1 µl ISSR primeri (10 pmol), 2 µl genomik DNA (25 ng), 12 µl dH₂O, 0.5 µl DNA Taq polimeraz (vivantis) olacak şekilde toplam 20 µl solüsyon hazırlanmıştır. PCR cihazı 1 döngü (94°C'de 2 dk.), 35 döngü(94 °C'de 1 dk., 50 °C'de 30 sn. ve 72 °C'de 1 dk.), 72 °C'de 7 dk. ve 4 °C'de ∞ şeklinde programlanarak markör çoğaltmaları yapılmıştır.

3.2.3. PCR ürünlerinin elektroforez işlemi ve DNA bantlarının elde edilmesi

Elde ettiğimiz PCR ürünlerinin, QIAxcel fragment analiz cihazında DNA'lar boyutlarına göre ayrıştırılarak görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.7). DNA elektroforezinde QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200) kullanılmıştır.



Şekil 3.7 ISSR 1 primerinin çoğalttığı bantlar



Şekil 3.8 SRAP EM17ME11 primer kombinasyonunun çoğalttığı bantlar

3.2.3.1. DNA bantlarının skorlanması

28 adet kekik genotipinin QIAxcel fragment analiz cihazında yapılan analiz sonucuna göre okuma aralığı 100 baz çifti ile 1500 baz çifti arasında seçilmiştir. DNA bantları genotipler arasında karşılaştırılarak aynı büyüklükte bulunan bantlar benzer lokus olarak değerlendirilip “1”, farklı büyüklükte bulunanlar 0 olarak kodlanmıştır (Iqbal ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2005; Gutierrez ve ark., 2002; Abdalla ve ark., 2001; Senior ve ark., 1998; Rahman ve ark., 2002; Rana ve Bhat, 2005; Tabar ve ark., 2004). Elde edilen bütün bantlar ikili değişken şeklinde (1 ve 0) değerlendirilmiştir.

3.2.4. Veri analizi

Çalışmada kullanılan primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PIC, Polymorphism Information Content) Laborda ve ark. (2005)’na göre aşağıdaki formülden faydalanılarak Excel’de hesaplanmıştır. Buna göre, öncelikle polimorfik bantlarda toplam var (1) ve yok (0) olan bantların sayıları hesaplanıp daha sonra bu bantların ayrı ayrı frekansları hesaplanmıştır. Formüle göre f_i , i bandının frekansıdır.

$$PIC = 1 - \sum (f_i)^2$$

POPGENE32 versiyon 1.32 (Population Genetic Analysis) paket programı kullanılarak genetik mesafe (Genetic Distance), Nei (1972) ‘e göre belirlenmiştir. Genetik mesafe verileriyle filogenetik ağaç “Unwieghted Pair Grup of Aritmetic Means” (UPGMA) yöntemine göre MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) paket programında elde edilmiştir.

Kümeleme analizi STRUCTURE 3.4 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İdeal grup sayısını belirlemek amacıyla, her bir K değeri için 15 bağımsız simülasyon ile K değerleri 1'den 15'e kadar çalıştırılmıştır. Ayrıca permütasyon modülü, 10.000-100000 aralığında seçilip, her bir K değeri için 5 tekrar yapılarak, grup sayısını belirlemede temel faktör olan uygun Delta K değeri hesaplanmıştır. Analiz sonuçları zip dosyasında arşiv oluşturulmuş ve bu dosya Structure harvester web sayfasına yüklenerek ΔK değeri belirlenmiştir.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Kullanılan Markörlerin Polimorfizm Bilgi İçerikleri (PIC) ve Allel Sayıları

Çalışmada yer alan 28 adet kekik genotipi arasındaki genetik farklılık, SRAP ve ISSR markörleri ile analiz edilmiştir. Toplam 15 adet SRAP primer çifti ve 10 adet ISSR primeri 28 kekik genotipinde taranarak, toplamda 138 bant elde edilirken elde edilen bantların 131 tanesinin polimorfik bant olduğu gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin hepsi polimorfik özellik göstermekle beraber ortalama polimorfizm değeri % 94.93' dür. En fazla allel üreten primer kombinasyonu 14 bant ile EM17-ME11 olurken, ortalama allel sayısı 4.93 olarak bulunmuştur. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) 0.04 ile 0.99 arasında değişmiş olup, ortalama PIC değeri 0.53 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Ayanoğlu (2006), AFLP markörü ile 44 kekik genotipini taramıştır. Analiz sonucunda toplam 365 bant elde ederken elde ettiği bantlardan 294 tanesinin polimorfik bant olduğunu tespit etmiştir. Sunar ve ark. (2008), 15 kekik arasındaki fenotipik ve genetik varyasyonu inceleyerek 20 adet RAPD markörü ile genotipleri taramış ve 7 adet markör polimorfizm göstermiştir. Akeel ve ark. (2009), yaptıkları çalışmayla *O.syriacum* ve *O.majorana* popülasyonundaki 14 yabancı kekik genotiplerini 48 adet RAPD primeriyle taramışlardır. Analiz sonucunda 1359 adet skorlanabilir bant elde ettiklerini bildirmiş ve bunlardan sadece 136 tanesinin polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Khalil ve Li. (2012), Suriyeden toplanan bazı kekik genotiplerini 27 adet RAPD markörüyle ile taramış ve tarama sonucunda toplam 198 bant elde etmişlerdir. Polimorfizm oranı % 90.91 olarak belirlemişlerdir. Nateren ve ark. (2013), 14 farklı kekik genotipi AFLP markörü ile yaptıkları taramada polimorfizm oranını % 60.9 olarak belirlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında yapmış olduğumuz çalışma Khalil ve Li. (2012) ile örtüşmekte, Nateren ve ark. (2013)'na göre yüksek olarak belirlenmiştir. Bizim belirlemiş olduğumuz polimorfizm oranının yüksek çıkması kullandığımız genotip sayısının fazla ve kullanılan markör tekniğinin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Çizelge 4.1. Kullanılan SRAP ve ISSR primerlerinin allel sayıları ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerleri

No	Primerler	Nükleotit Dizilimi (EM/ME- 3'-5')	Allel Sayısı	PIC
1	EM1/ME11	GACTGCGTACGAATTAAT/TGAGTCCAAACCGGGTA	4	0.7
2	EM15/ME11	GACTGCGTACGAATTGA/TGAGTCCAAACCGGGTA	9	0.91
3	EM3/ME11	GACTGCGTACGAATTGAC/TGAGTCCAAACCGGGTA	10	0.99
4	EM17/ME11	GACTGCGTACGAATTATG/TGAGTCCAAACCGGGTA	14	0.7
5	EM2/ME11	GACTGCGTACGAATTTGC/TGAGTCCAAACCGGGTA	5	0.22
6	EM3/ME2	GACTGCGTACGAATTGAC/TGAGTCCAAACCGGAGC	4	0.59
7	EM15/ME2	GACTGCGTACGAATTGAT/TGAGTCCAAACCGGAGC	6	0.85
8	EM5/ME2	GACTGCGTACGAATTAAC/TGAGTCCAAACCGGAGC	2	0.04
9	EM7/ME2	GACTGCGTACGAATTCAA/TGAGTCCAAACCGGAGC	3	0.16
10	EM8/ME2	GACTGCGTACGAATTCAC/TGAGTCCAAACCGGAGC	2	0.43
11	EM12/ME2	GACTGCGTACGAATTCTC/TGAGTCCAAACCGGAGC	13	0.9
12	EM13/ME2	GACTGCGTACGAATTCTG/TGAGTCCAAACCGGAGC	2	0.53
13	EM13/ME11	GACTGCGTACGAATTCTG/TGAGTCCAAACCGGGTA	2	0.38
14	EM3/ME1	GACTGCGTACGAATTGAC/TGAGTCCAAACCGGATA	1	0.2
15	EM3/ME1L	GACTGCGTACGAATTGAC/TGAGTCCAAACCGGATA	1	0.14
16	EM5/ME1	GACTGCGTACGAATTAAC/TGAGTCCAAACCGGATA	5	0.24
17	ISSR6	ACACACACACACACGT	5	0.57
18	ISSR8	ACACACACACACACACC	2	0.14
19	ISSR8L	ACACACACACACACACC	1	0.41
20	ISSR12	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	1	0.32
21	ISSR12L	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	4	0.11
22	ISSR13	ACACACACACACACACC	6	0.51
23	ISSR11	GAGAGAGAGAGAGAGATC	2	0.27
24	ISSR1	CACACACACACAA	11	0.98
25	ISSR2	CTCTCTCTCTCTCTG	6	0.98
26	ISSR14	ATGATGATGATGATGATG	4	0.71
27	ISSR4	CACACACACACAGC	6	0.95
28	ISSR7	ACACACACACACACCG	7	0.9

*Markörler birden fazla lokusta görüldüğünden ikinci lokusta görülen markörle 'L' ile belirtilmiştir. PIC: polimorfizm bilgi içeriği.

4.2. Genotipler Arasındaki Genetik Benzerliklerin Değerlendirilmesi

Genetik benzerlik, (Nei 1972)'ye göre belirlenmiş ve genotipler arasındaki benzerlik katsayısı yüzde (%) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Çizelge incelendiğinde, tüm genotipler arasında en fazla genetik farklılık % 74 ile OVV2 (*O. vulgare* sbp. *hirtum*) ve OVV5 (*O. vulgare* sbp. *hirtum*) türleri arasında, en az genetik farklılık ise % 13 ile OS2, OS3 ve OS4 (*O. syriacum*) genotipleri arasında gözlenmiştir. Kekik genotipleri arasındaki ortalama genetik farklılık değeri % 48 olarak bulunmuştur.

Kekik türleri arasındaki genetik benzerliği Ayanoğlu (2006) 0.396 -0.725 arasında, Sunar ve ark. (2008) 0.77 - 0.867 arasında, Tonk ve ark. (2010) 0.49 - 0.73 arasında bulmuşlardır. Bu sonuçlar ile bizim belirlediğimiz sonuçların örtüştüğü görülmektedir. Genetik benzerlik oranını, Looy ve ark. (2009) 0.24, Helsen ve ark. (2013) 0.040 olarak bulmuşlardır. Bu sonuçların bizim belirlemiş olduğumuz sonuçlardan farklı olduğu, genetik farklılığın daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu farklılığın kullanılan türlerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



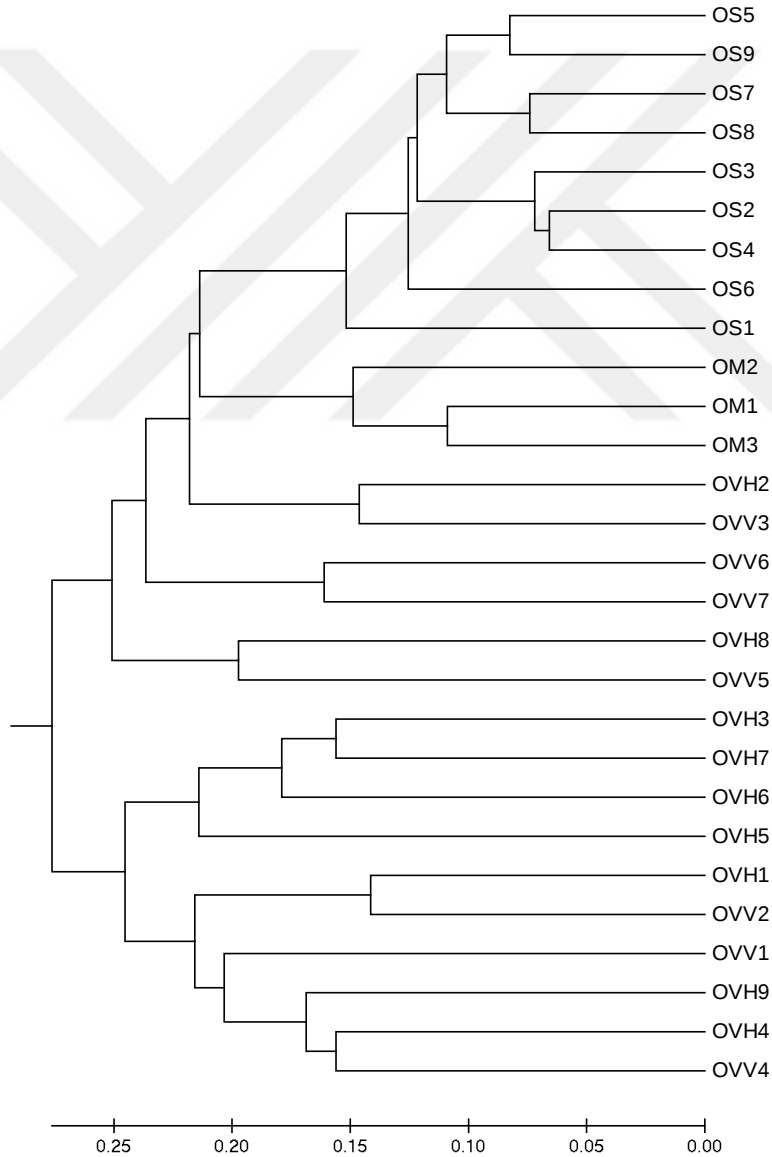
Çizelge 4.2. Genotipler arasındaki genetik farklılık

	OS1	OS2	OS3	OS4	OS5	OS6	OS7	OS8	OS9	OVH1	OVH2	OVH3	OVH4	OVH5	OVH6	OVH7	OVH8	OVH9	OVV1	OVV2	OVV3	OVV4	OVV5	OVV6	OVV7	OM1	OM2	OM3
OS1																												
OS2	0.23																											
OS3	0.31	0.13																										
OS4	0.25	0.13	0.16																									
OS5	0.31	0.24	0.21	0.16																								
OS6	0.38	0.25	0.29	0.22	0.20																							
OS7	0.28	0.23	0.27	0.18	0.18	0.23																						
OS8	0.35	0.33	0.32	0.26	0.25	0.29	0.15																					
OS9	0.30	0.23	0.24	0.25	0.17	0.28	0.17	0.27																				
OVH1	0.71	0.55	0.53	0.61	0.61	0.62	0.57	0.56	0.55																			
OVH2	0.45	0.34	0.35	0.33	0.39	0.43	0.41	0.44	0.34	0.52																		
OVH3	0.60	0.52	0.48	0.48	0.58	0.57	0.68	0.56	0.57	0.41	0.50																	
OVH4	0.65	0.62	0.56	0.66	0.56	0.57	0.65	0.58	0.55	0.41	0.57	0.45																
OVH5	0.58	0.61	0.57	0.55	0.60	0.56	0.53	0.57	0.48	0.53	0.44	0.46	0.44															
OVH6	0.68	0.60	0.58	0.51	0.51	0.55	0.62	0.56	0.52	0.43	0.52	0.38	0.50	0.44														
OVH7	0.61	0.53	0.47	0.47	0.47	0.53	0.48	0.45	0.48	0.48	0.61	0.31	0.53	0.38	0.33													
OVH8	0.61	0.53	0.47	0.52	0.41	0.44	0.48	0.55	0.37	0.64	0.56	0.58	0.44	0.47	0.39	0.45												
OVH9	0.57	0.50	0.42	0.51	0.46	0.45	0.55	0.53	0.50	0.47	0.60	0.41	0.32	0.56	0.52	0.48	0.42											
OVV1	0.53	0.61	0.55	0.62	0.57	0.56	0.69	0.68	0.53	0.48	0.53	0.51	0.37	0.47	0.58	0.52	0.43	0.37										
OVV2	0.71	0.60	0.53	0.61	0.58	0.55	0.57	0.53	0.57	0.28	0.52	0.50	0.47	0.64	0.57	0.53	0.64	0.45	0.46									
OVV3	0.64	0.46	0.45	0.47	0.45	0.48	0.48	0.50	0.46	0.56	0.29	0.48	0.58	0.52	0.51	0.55	0.57	0.61	0.71	0.56								
OVV4	0.56	0.48	0.50	0.47	0.45	0.42	0.51	0.45	0.46	0.37	0.51	0.39	0.31	0.50	0.42	0.41	0.55	0.35	0.47	0.33	0.45							
OVV5	0.62	0.57	0.53	0.56	0.46	0.36	0.55	0.46	0.47	0.87	0.50	0.62	0.60	0.46	0.52	0.69	0.39	0.57	0.58	0.74	0.53	0.58						
OVV6	0.61	0.58	0.55	0.45	0.43	0.51	0.44	0.50	0.42	0.58	0.56	0.51	0.69	0.55	0.48	0.52	0.52	0.61	0.68	0.53	0.45	0.47	0.53					
OVV7	0.51	0.46	0.50	0.41	0.50	0.39	0.39	0.47	0.48	0.64	0.61	0.48	0.66	0.52	0.61	0.41	0.57	0.58	0.65	0.72	0.45	0.52	0.56	0.32				
OM1	0.46	0.46	0.43	0.38	0.38	0.44	0.44	0.45	0.46	0.61	0.42	0.42	0.61	0.60	0.51	0.50	0.47	0.44	0.47	0.58	0.45	0.55	0.56	0.43	0.34			
OM2	0.55	0.45	0.42	0.37	0.35	0.38	0.30	0.37	0.32	0.55	0.45	0.50	0.62	0.51	0.41	0.48	0.42	0.62	0.72	0.55	0.35	0.48	0.50	0.37	0.39	0.31		
OM3	0.52	0.55	0.48	0.48	0.37	0.50	0.43	0.35	0.43	0.71	0.45	0.45	0.55	0.61	0.41	0.46	0.37	0.50	0.58	0.62	0.46	0.51	0.43	0.46	0.58	0.22	0.28	

OS:*Origanum syriacum*, OVH:*Origanum vulgare* sbp *hirtum*, OVV: *Origanum vulgare* sbp *vulgare*, OM: *Origanum majarona*

4.3. Genotiplere göre oluşturulmuş filogenetik ağaç

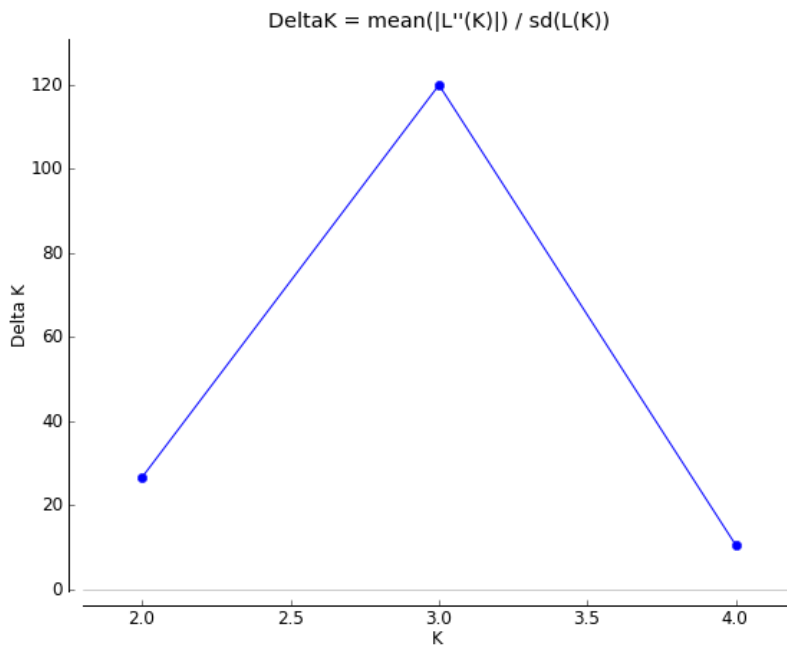
28 adet kekik genotipleri 15 adet SRAP ve 10 adet ISSR markörleri ile tarandıktan sonra elde edilen veriler UPGMA (Unweighed Pair Group Method of Aritmetic Averages) yöntemi kullanılarak Nei (1972)'nin genetik mesafe matrisine göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.1). Yapılan analiz sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç iki ana gruba ayrıldığı, *Origanum syriacum*'a dahil genotiplerin birlikte kümelendiği, yine *O. majarona* türlerine ait genotiplerin birlikte kümelendiği görülürken *O. vulgare* alt türleri karışık olarak kümeleneleşlerdir.



Şekil 4.1.Genotiplere göre oluşturulmuş Filogenetik ağaç

4.4. Popülasyonun genetik yapı analizi

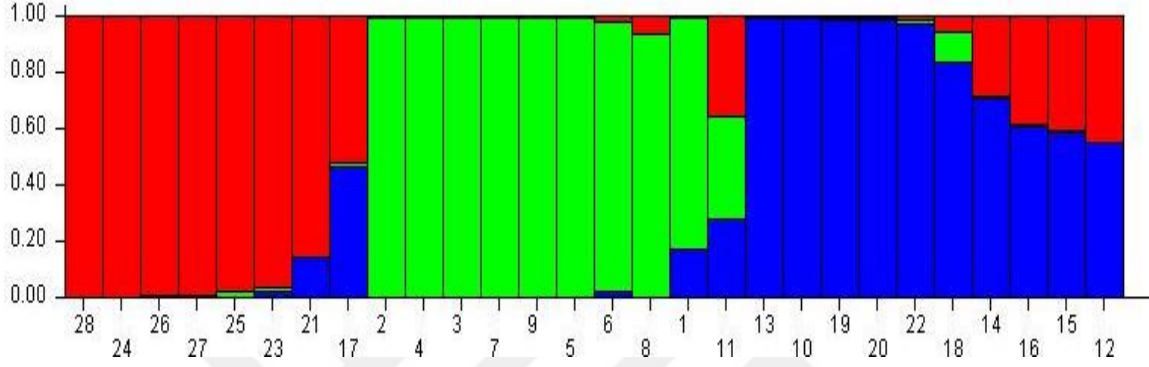
Çalışılan genotipler içerisinde optimum genetik grup sayısını belirlemek için Bayesian yöntemini model alan STRUCTURE 2.3.4 yazılımı kullanılarak, dominant genotipik verilere dayalı 28 adet kekik genotipinin kümeleme analizi yapılmıştır (Pritchard ve ark. 2000). İdeal grup sayısını belirlemek amacıyla, her bir K değeri için 15 bağımsız simülasyon ile K değerleri 1’den 15’e kadar çalıştırılmıştır. Ayrıca permütasyon modülü, 10.000-100.000 aralığında seçilip, her bir K değeri için 5 tekrar yapılarak, grup sayısını belirlemede temel faktör olan uygun Delta K değeri hesaplanmıştır. Çıkan sonuçlar, zip dosyası şeklinde depolanarak “Structure Harvester” programına yüklenmiş ve ideal K değeri 3 olarak bulunmuştur (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. STRUCTURE programından elde edilen ideal K değeri hesaplama grafiği (K=3 bulunmuştur.)

İdeal K değeri 3 olarak hesaplanan analiz sonucunda Şekil 4.2’deki yapısal diyagram elde edilmiştir. STRUCTURE 2.3.4 programında tekrardan 3 grup için analiz yapılmış ve Şekil 4.3’teki gibi genetik yapı analiz grafiği elde edilmiştir. K değerine bakıldığında kümeler arasında önemli derecede karışım meydana geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Şekil 4.3 incelendiğinde kırmızı, yeşil ve maviyle gösterilen 3 grubun elde edildiği görülmektedir. Buradan genetik olarak 3 farklı grubun oluştuğu söylenebilir. Yeşil renk alan grup *O. syriacum* türüne dahil genotiplerden oluştuğu, mavi renk alan grup ise *O. vulgare* türüne ait genotipler oluşturmaktadır. Kırmızı renk alan grup ise *O. majanora* ve *O. vulgare* türlerinden genotipler olduğu görülmektedir. Sonuç olarak oluşturulacak ıslah programlarında zıt renkte yer alan türlerin ebeveyn olarak seçilmesi ıslah başarısını arttıracakı söylenebilir.



Şekil 4.3 Kekik genotiplerinin STRUCTURE programı ile kümeleme analizi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmayla Doğu Akdeniz Bölgesinden toplanan 28 kekik genotipi materyal olarak kullanılarak, bu genotiplerin birbirine olan genetik akrabalık durumları değerlendirilmiştir. Çalışmada 15 adet SRAP markör kombinasyonu ve 10 adet ISSR primeri kullanılarak genotiplerin genetik farklılıkları değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan primerlerin hepsi polimorfik özellik göstermekle beraber ortalama polimorfizm değeri % 94.93 olurken, toplam da 138 bant elde edilmiş ve elde edilen bantlardan 131 tanesinin polimorfik bant olduğu belirlenmiştir. En fazla allel üreten primer kombinasyonu 14 bant ile EM17-ME11 olurken, ortalama allel sayısı 4.93 olarak bulunmuştur. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) 0.04 ile 0.99 arasında değişmiş olup, ortalama PIC değeri 0.53 olarak belirlenmiştir. Tüm genotipler arasında en fazla genetik farklılık % 74 ile OV V2 (*O. vulgare* sbp. *hirtum*) ve OVV5 (*O. vulgare* sbp *hirtum*) türleri arasında, en az genetik farklılık ise % 13 ile OS2, OS3 ve OS4 (*O. syriacum*) genotipleri arasında gözlenmiştir. Kekik genotipleri arasındaki ortalama genetik farklılık değeri % 48 olarak bulunmuştur.

Nei (1972)'nin genetik mesafe matrisine göre filogenetik ağaç oluşturulmuş ve yapılan analiz sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç ilk olarak 2 ana gruba ayrılmıştır. *Origanum syriacum*'a dahil genotiplerin birlikte kümелendiği, yine *O. majarona* türlerine ait genotiplerin birlikte kümелendiği görülürken *O. vulgare* sbp *hirtum* ile *O. vulgare* sbp *vulgare* türlerine ait genotipler karışık olarak kümelenmişlerdir.

Structure analizi sonucunda türler genetik olarak 3 gruba ayrılmış ve oluşturulacak ıslah programlarında yüksek genetik farklılık gösteren türlerin ebeveyn olarak seçilmesi ıslah başarısını arttıracaktır. Ayrıca kullanılan SRAP ve ISSR markör tekniği doğadan toplanacak materyallerin genetik karakterizasyonunda güvenli bir şekilde kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdalla, A.M., Reddy, O.U.K., El-Zik, K.M., Pepper, A.E. 2001. Genetic Diversity and Relationships of Diploid and Tetraploid Cottons Revealed Using AFLP. *Theor Appl Genet.*,102:222-229.
- Akeel, R. W. Rawashdeh, I. M. Haddad, N. I. Haddadin, M. 2009. Genetic variation between and among *Origanum syriacum* L. and *Origanum majorana* L. populations collected from different locations in Jordan using RAPD markers. *Crop Research (Hisar)*, 38: 1/3, 245-257.
- Ayanoglu, F., Ergul, A., Arslan, M. 2006. Assessment of genetic diversity in Turkish oregano (*Origanum onites* L.) germplasm by AFLP analysis. *J Hortic Sci Biotech* 81:45-50.
- Azcan, N., Kara, M., Asilbekova, D.T., Özek, T., Başer, K.H.C. 2000. "Lipids and Essential Oil of *Origanum onites*", *Chemistry of Natural Compounds*, 36 (2), s:132-136.
- Azizi, A., Wagner, C., Honermeier, B., Friedt, W. 2009. Intraspecific diversity and relationships among subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. *Plant Systematic and Evolution* 281: 151-160.
- Azizi, A., Hadian J, Gholami M, Friedt W, Honermeier B. Correlations. 2012. Genetic, morphological, and chemical diversities in a germplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. *Chem Biodivers* ; 9(12):2784-801.
- Bardak, A. 2007. Genetic Diversity of Diploid and Tetraploid Cottons Determined by SSR Markers and its Relationship with Fiber Quality Traits, Kahramanmaraş Sütçü İmam University *Institute of Natural and Applied Sciences*, s:144.
- Başer, K.H.C. 1993. Essential Oils of Anatolian Labiate. A Profile. *Acta Horticulturae*, Number-333 November, 271-238.
- Başer, K.H.C. 1994. Essential oils of *Lamiaceae* from Turkey: Recent results. *Lamiales Newsletter* 3:6-11.
- Başer, K.H.C. 2001, Her Derde Deva Bir Bitki Kekik, *Bilim ve Teknik*, Mayıs, s: 74-77.
- Baydar, H., İ. Erdal. 2004. Bitki büyüme düzenleyicilerinin İzmir kekiğinin (*Origanum onites* L.) yaprak kalitesine etkisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi *Tarım Bilimleri Dergisi* 10 (1): 9-13.
- Baydar, H., Karadoğan, T. H. Özçelik. 2009. Göller yöresinde yayılış gösteren kekik (*Origanum*, *Thymus*, *Satureja* ve *Thymbra* sp.) türlerinin belirlenmesi ve uçucu yağ özelliklerinin saptanması. Hatay, Türkiye .VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim 2009, Mustafa Kemal Üniversitesi.
- Benli, M., Yiğit, N. 2005. Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 3(8): 1-8.

- Biskup, S., Saez. 2002. Thyme, The Genus Thymus. Taylor-Francis. London.
- Budak, H., R.C. Shearman, I. Parmaksiz, R.E. Gaussoin, T.P. Riordan, I. Dweikat. 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor Appl Genet*, 108, 328–334.
- Ceylan, A., E. Bayram, N. Şahbaz, H. Otan ve Ş. Karaman. 2003. Yield Performance and Essential Oil Composition of Individual Plants and Improved Clonnes of *Origanum onites* L. Grown in Aegean Region of Turkey. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51(4):285-290.
- Dababneh BF. 2007. Antimicrobial activity and genetic diversity of thymus species on pathogenic microorganisms. *J. Food Agric. Environ.*, 5(3&4): 158-162.
- D'Antuono, L.F. Galletti GC., Bocchini P. 2000. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). *Ann Bot* ; 86 (3):471-8.
- Davis, P.H. 1982-1988. Flora of Turkey Vol.7 and 10. Uni.Press.Edinburg.
- Dudley, J.W., Saghai Maroof, M.A., Rufener, G.K. 1991. Molecular Markers and Grouping of Parents in Maize Breeding Programs. *Crop Sci.*, 31:718-723.
- Eserkaya Gulec , T., Yıldırım A., Ateş Sonmezoğlu O. 2010."Bitkilerde Markor Destekli Seleksiyon," *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 3(2):67-79.
- Filiz, E., B.S. Ozdemir, M. Tuna, H. Budak. 2009. Diploid *Brachypodium distachyon* of Turkey: Molecular and Morphological analysis, Molecular Breeding of Forage and Turf, ed: Yamada T. and Spangenberg G., Springer Science, s: 83.
- Gengaihi, E., H.S. Taha ve A.M. Kamel. 2006. In vivo and in vitro comparative studies of *Origanum* species Souad, *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.4 (3&4) : 127-134. 2006.
- Gounaris Y., Skoula M., Fournaraki C., Drakakaki G., and Makris A. 2002, Comparison of essential oils and genetic relationship of *Origanum intercedens* to its parental taxa in the island of Crete. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 249-258.
- Gönüz, A., Özörgücü, B. 1999. An investigation on the morphology, anatomy and ecology of *Origanum onites* L. *Tr J of Botany*, 23(1), 19-32.
- Gutierrez, O.S., Basu, S., Saha, S., Jenkins, J.N., Shoemaker, D.B., Cheatham, C.L., McCarty, J.C.Jr. 2002. Genetic Distance Among Selected Cotton Genotypes and its Relationship with F_2 Performance. *Crop Sci.*, 42:1841-1847.
- Helsen K, Jacquemyn H, Hermy M, Vandepitte K, Honnay O. 2013. Rapid buildup of genetic diversity in founder populations of the gynodioecious plant species *Origanum vulgare* after semi-natural grassland restoration. *PLoS ONE* 8:e67255.

- Hilooğlu, M. 2012 Türkiye'de Yayılış Gösteren Petrorhagia Türleri Arasındaki Genetik Akrabalığın Moleküler Belirteçlerle Tespit Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Ietswaart, J., H. 1980. A Taxonomic Revision of the Genus *Origanum* (Labiatae). Ph.D. Thesis, *Leiden Botanical Series 4*. Leiden University Press, The Hague.
- Ince, A.G., M. Karaca., S. Elmasulu. 2014. New microsatellite and CAPS-microsatellite markers for clarifying taxonomic and phylogenetic relationships within *Origanum* L., August 2014, Volume 34, Issue 2, s: 643–654.
- Iqbal, M.J., Aziz N, Saeed NA, Zafar Y, Malik KA. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 94: 139–144.
- Joshi, S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K., Brar D.S. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1311–1320.
- Joshi, B.K., Mudwari A, Bhatta M.R., Ferrara G.O. 2004. Genetic diversity in Nepalese wheat cultivars based on agromorphological traits and coefficients of parentage. *Nep Agric Res J* 5: 7-17.
- Katsiotis, A., Nikoloudakis N, Linos A, Drossou A, Constantinidis T. 2009. Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. *Sci Hortic* 121:103–108.
- Karp, A., Edwards K, Bruford M, Vosman B, Morgante M, Seberg O, Kremer A, Boursot P, Arctander P, Tautz D, Hewitt G. 1997. Newer molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotechnol* 15:625-628.
- Khalil, R., Li. 2012. Determination of genetic variation and relationship in *Thymus vulgaris* populations in Syria by random RAPD markers., s: 217-225.
- Kintzios, E.S. Ed. 2002. *Oregano, The Genus Origanum and Lippia* Taylor-Francis. London.
- Klocke, E., J. Langbehn., C. Grewe, F. Pank. 2008. DNA Fingerprinting by RAPD on *Origanum majorana* L., s: 171-176.
- Kokkini, S. 1997. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. *Oregano*. Proc. IPGRI Intl. Workshop on Oregano, Bari, Italy, 8-12 May, 1996. s:2-12.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85, 633-640.
- Laborda, P.R., Oliveira K.M., Garcia A.A., Paterniani M.E., de Souza A.P. 2005. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers *Theor Appl Genet* 111(7):1288–1299.

- Li, C.D., Rossanagel, B.G., Scoles, G.J. 2000. The Development of Oat Microsatellite Markers and Their Use in Identifying Relationships Among Avena Species and Oat Cultivars. *Theor Appl Genet.*, 101:1259-1268.
- Li, G., C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455-461.
- Liu, S., Cantrell, R.G., Mccarty, J.C.J.R., Stewart, J. Mcd. 2000. Simple Sequence Repeat Based Assessment of Genetic Diversity in Cotton Race Stock Accessions. *Crop Sci.* 40:1459-1469.
- Looy, K.V., H., Jacquemyn.,P.,Breyne.,O.,Honnayb. 2009.Effects of flood events on thegenetic structure of riparian populations of the grassland plant *Origanum vulgare.*, Available online 13 January 2009.
- Lukas, B., Samuel R., Mader E., Baser KHC., Duman H., Novak J., 2013. Complex evolutionary relationships in *Origanum* section *majorana* (Lamiaceae). *Bot J Linn Soc* 171:667–686.
- Manjarrez-Sandoval, P., Carter Jr TE, Webb DM and Burton JW. 1997. RFLP Genetic similarity and coefficient of parentage as genetic variance predictors for soybean yield. *Crop Sci* 37:698-703.
- Mastro G. 1997. Crop domestication and variability within accessions of *Origanum* genus. In: Padulosi S, ed. *Oregano*. Proceedings of the IPGRI International Workshop on *Oregano*, 8± 12 May 1996, Valenzano (Bari), Italy. Rome: IPGRI, 34±48.
- Natare'n Daniela, A., V., Tabla., M., Ortega., L. 2013. Received: Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil., 29 April 2013 / Accepted: 14 August 2013 / Published online: 28 August 2013.
- Novak, J., Lukas B, Bolzer K, Grausgruber-Groger S, Degenhardt J. 2008 Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* eexpressed sequence tag. *Mol Ecol Notes* 8:599–601.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance between Populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
- Oliver, G.W. 1997. The world market of oregano. *Oregano. Proc. IPGRI Intl. Workshop on Oregano*, Bari, Italy, 8-12 May, 1996. s:142-146.
- Ozgen, M., Ertunc F., Kınacı G., Yıldız M., Birsin M., Ulukan H., EmiroğluH., Koyuncu N., Sancak C. 2005. Tarım Teknolojisinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar: Ankara,Türkiye. Bitki Biyoteknolojisi, 6. Türkiye Ziraat Muhendisleri Teknik Kongresi.
- Özkan, G., Baydar, H., S. Erbaş. 2009. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 205-209.

- Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., Motto, M. 1998. Comparative Analysis Of Genetic Similarity Among Maize Inbred Lines Detected By Rflps, Rapds, Aflps. *Theor. Appl. Genet.* 97:1248-1255.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetic.*, 155: 945-959 .
- Putievsky, E., Dudai, N. and Ravid, U. 1997. Cultivation, selection and conservation of oregano species in Israel. Oregano. Proc. IPGRI Intl. Workshop on Oregano, Bari, Italy, 8-12 May, 1996. p.103-110.
- Rahman, M., Hussain, D. and Zafar, Y. 2002. Estimation of Genetic Divergence among Elite Cotton Cultivars-Genotypes by DNA Fingerprinting Technology. *Crop Sci.*, 42: 2137-2144.
- Rahimmalek, M., B.Bahreininejad., M.Khorrami, B.E.S. Tabatabaei. 2009. Genetic Variability and Geographic Differentiation In *thymus daenensis* Subsp. *Daenensis*, An Endangered Medicinal Plant, As Revealed By Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Biochem Genet* .
- Rana, M. K., Bhat V. 2005. RAPD markers for genetic diversity study among Indian cotton cultivars. *CURRENT SCIENCE*, VOL. 88, NO. 12, 25.
- Russell, RJ, Fuller JD, Macaulay M, Hats BG, Jahoor A, Powell W , Waugh R. 1997 Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95:714-722.
- Powell, W., G.C. Machray, J. Provan. 1996. Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215-221.
- Raskin, I., Ripoll, C. 2004. Can an Apple a Day Keep the Doctor Away *Curr. Pharmac. Design.* vol. 10:3419–3429.
- Rustaiee, A., F., Sefidkon , S.M.F., Tabatabaei , R., Mirahmadi. 2013. Chemical Polymorphism of Essential Oils from Five Populations of *Thymus daenensis* Celak. subsp. *daenensis* Endemic to Iran., *Journal of Essential Oil Research*, 23:3, 6-11.
- Sadıkoğlu, N. 2005. Kekik olarak kullanılan türler üzerinde farmasötik botanik araştırmalar. İstanbul Ü. Eczacılık Fakültesi-Doktora Tezi, İstanbul s:113..
- Saebnazar, A., Rahmani F. 2013. Genetic Variation Among *Salvia* Species Based on Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) Marker. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 3(1):71-78.
- Senior, L.M., Murphy, J.P., Goodman, M.M., Stuber, C.V. 1998. Utility Of SSRs For Determining Genetic Similarities And Relationships In Maize Using An Agarose Gel System. *Crop Sci.*, 38:1088-1098.

- Smith, J.S.C., Smith, O.S. 1992. Fingerprinting Crop Varieties. *Adv. Agron.*, 47:85-140.
- Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, H., Smith, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchell, S.E., Kresovich, S., Ziegler, J. L. 1997. An Evaluation of the Utility of SSR Loci as Molecular Markers in Maize (*Zea mays* L.) Comparisons with Data from RFLPs and Pedigree. *Theor Appl Genet.*, 95:163-173.
- Skoula, M., Harborne, J. B. 2002. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. In Kintzios S., *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles – Oregan*, The genera *Origanum* and *Lipia*, Taylor & Francis : London, s: 67-108.
- Skoula, M., Gotsiou P., Naxakis G., Johnson CB. 1999. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochem*; 52(4):649-57.
- Sözen, E., i., Poyraz. 2008. Rapid and High Quality DNA Isolation from *Origanum onites* for RAPD and ISSR Analysis., *Z. Naturforsch.* s:63.
- Sunar, S., Ö., Aksakal., N., Yıldırım., G., Agar., M., Gulluce., F., Sahin. 2008. Genetic diversity and relationships detected by FAME and RAPD analysis among *Thymus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey., *Received for publication*.
- Ulukan, H. 2007. "Klasik Bitki Islahı ve Genetik Muhendisliği ile Oluşturulan Değişimlere Genel Bakış," U. U. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, Cilt 21, Sayı 2, 27-40.
- Tabar, V.M., Chandrashekar S., Rana M. K., Bhaf K.V. 2004, RAPD Analysis of Genetic Diversity in Indian Tetraploid and Diploid Cotton (*Gossypium* spp), *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, Volume 13, Issue 1, s: 81-84.
- Taşpınar, M.S., Tosun M. 2002. "İzoenzim Elektroforez Tekniğinin Bitki Islahında Kullanımı," Atatürk Univ. *Ziraat Fak. Derg.* 33 (4), 451-456.
- Trindade, H., Monya M. Costa, Sofia B. Lima, Luis G. Pedro, Ana C. Figueiredo, Jose' G. Barroso A .2009. Combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal)., Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, IBB, *Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande*, 1749-016 Lisbon, Portugal.
- Tonk, FA., Yuce S, Bayram E, Akcali RRG, Sonmez C, Telci I, Furan MA. 2010 Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. *Plant Syst Evol* 288:157–165.
- Wendel, JF., Brubaker CL, Percival AE. 1992. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of Upland cotton. *Am J Bot* 79: 1291–1310.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey. S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.

- Quan, J.-P., He, S.-L., Peng, F., Zheng, Y.H. Xia, B. 2008. Molecular Phylogenetic Study of Genetic Relationships of Some Thymus Species. -*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* 28: 101-106
- Young, N.D. 1996. QTL Mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:479-501.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)- anchored PCR amplification. *Genomics*, 20, 176- 183.
- Zhang, J.F., Lu, Y., Adragna, H., Hughs, E. 2005. Genetic Improvement of New Mexico Acala Cotton Gerplasm and Their Genetic Diversity. *Crop Sci.*, 45:2363-2373.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : ŞEYMA ALĞAÇ
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 21.10.1994 Midyat/ MARDİN
e-posta : sseymaalgac@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ / Tarımsal Biyoteknoloji ABD	2017
Lisans	SDÜ / Tarımsal Biyoteknoloji	2014
Lise	Fatih Anadolu Lisesi	2010

Yabancı Dil

İngilizce
Arapça

Ödül ve Dereceler

SDÜ Bölüm Birinciliği ödülü
21.yy da Pamuk Çalıştayı Ar-Ge proje pazarı 3.lük ödülü

Yayınlar

Yurtiçi Bildiri

- 1.**Alğaç Ş.**, İnce M., Pamukta Beyaz Sinek Mücadelesine Karşı Doğal Mücadele, 21 yy da Pamuk Çalıştayı, Kahramanmaraş, Poster ,23.03.2016
- 2.Hayat K.,**Alğaç Ş.**, Çelik S., Uçar R., Sever A., HSI Analizi ile Pamuk Kontaminasyonunun Belirlenmesi 21 yy da Pamuk Çalıştayı, Kahramanmaraş, Poster ,23.03.2016
- 3.Gedik O., Bölek Y., Bardak A., Sever A.C., Tekerek H., Uçar R., İnce M., **Alğaç Ş.**, Parlak D., Adalı S., Çardaklı E., Çelik S., Kaya A.R., 2016 Karyological Investigation on *Gossypium hirsutum* (Stonville 453) and *Gossypium barbadense* (Askabat 100) .İnternational Conference On Natural Science And Engineering.