



IJEASED

INTERNATIONAL JOURNAL OF EASTERN ANATOLIA  
SCIENCE ENGINEERING AND DESIGN

*Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*  
ISSN: 2667-8764 , 3(1), 117-128, 2021  
<https://dergipark.org.tr/pub/ijeased>




Araştırma Makalesi / Research Article

Doi: [10.47898/ijeased.834338](https://doi.org/10.47898/ijeased.834338)

## Çeşitli Bitki Taksonlarında Bazı DNA İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Analizi

Pelin YILMAZ SANCAR \*

Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, 23200, Türkiye.

Yazar Kimliği / Author ID (ORCID Number)	Makale Süreci / Article Process
*Sorumlu Yazar / Corresponding author : <a href="mailto:peyilmaz@firat.edu.tr">peyilmaz@firat.edu.tr</a>  <a href="https://orcid.org/0000-0002-6134-622X">https://orcid.org/0000-0002-6134-622X</a> , P. Yılmaz Sancar	Geliş Tarihi / Received Date : 01.12.2020 Revizyon Tarihi / Revision Date : 15.12.2020 Kabul Tarihi / Accepted Date : 09.01.2021 Yayın Tarihi / Published Date : 15.07.2021

**Alıntı / Cite :** Sancar Yılmaz, P. (2021). Çeşitli Bitki Taksonlarında Bazı DNA İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Analizi, Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi, 3(1), 117-128.

### Özet

Bitkilerde moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, incelenen taksonlardan maksimum kalitede DNA eldesi gerektirmektedir. Bu nedenle, çalışılacak bitkilerden yüksek konsantrasyonlu ve mümkün olduğunca saf DNA eldesi son derece önemlidir. Bitkilerden genomik DNA izolasyonu için farklı protokoller bulunmaktadır. Bu çalışmada tıbbi ve aromatik bitkilerden Asteraceae, Apiaceae ve Lamiaceae familyalarına ait bazı taksonlar kullanılmıştır. Taksonların hem herbaryum materyali haline getirilmiş kuru yaprak dokularından, hemde taze yaprak dokularından örnekler alınarak denenecek yöntemlerin hangi tip dokularda daha etkin olduğu araştırılmaya çalışılmıştır. Kullanılan yöntemlerde ekstraksiyon tampon çözeltileri içinde yalnızca CTAB ile CTAB+PVP beraber olacak şekilde hazırlanmış, buna ilave olarak hazır izolasyon kiti kullanılmıştır. Genel olarak tüm yöntemlerden yüksek konsantrasyonda DNA elde edilirken, bu yöntemlerle elde edilen gDNA'da, proteinler, RNA, polisakkaritler, uçucu yağlar, fenoller ve diğer kirleticilerin miktarı minimal düzeye indirilmeye çalışılmıştır. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodrop spektrofotometrede ölçülürken, yoğunluğu agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Ayrıca elde edilen DNA'ların PCR çalışmalarına uygunluğu da çeşitli primerler kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen DNA'ların miktarı ve kalitesi taksonlar arasında farklılık gösterse de en kaliteli izolasyon her zaman taze bitki materyali kullanılarak yapılan izolasyonlardan elde edilmiştir. Bununla birlikte yalnızca CTAB çözeltisi kullanılan ekstraksiyon yöntemi en yüksek saflık ve yoğunlukta olan DNA'yı sağlamıştır. Bunu takiben CTAB+PVP yöntemlerinin benzer sonuçlar verdiği görülürken, hazır kit kullanımının ise bitkilerden DNA izolasyonunda çok da kullanışlı olmadığı saptanmıştır. Hazır kit kullanımı her ne kadar daha temiz görünümlü DNA verse de elde edilen DNA'ların yetersiz olduğu görülmüş ve PCR çalışmalarında müspet sonuç vermemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** DNA izolasyonu, Bitki, CTAB, PCR.

## ***The Comparative Analysis of Some DNA Isolation Methods in Various Plant Taxa***

### **Abstract**

*Molecular biology studies in plants require high quality DNA isolation from the taxa studied. Therefore, DNA isolation with high concentration and as pure as possible from plants to be used in studies is extremely important. There are different protocols for genomic DNA isolation from plants. In this study, some taxa belonging to Asteraceae, Apiaceae and Lamiaceae families of medicinal and aromatic plants were used. It has been tried to investigate which types of tissues are more effective by taking samples from both dry leaf tissues of taxa that have been turned into herbarium material and fresh leaf tissues. In the methods used, only CTAB and CTAB + PVP were prepared together in extraction buffer solutions, in addition to this, a ready-made isolation kit was used. In general, high concentrations of DNA were obtained from all methods, while the amount of proteins, RNA, polysaccharides, essential oils, phenols and other contaminants in the gDNA obtained by these methods were tried to be minimized. While the concentration and purity of the isolated DNA was measured in a nanodrop spectrophotometer, its density was visualized in agarose gel electrophoresis. In addition, the suitability of the obtained DNAs for PCR studies was tested using various primers. Although the amount and quality of the obtained DNA varies between taxa, the best quality isolation has always been obtained from isolations using fresh plant material. However, the extraction method using only CTAB solution provided DNA with the highest purity and density. Following this, it was observed that CTAB + PVP methods gave similar results, while the use of ready-made kits was not very useful in DNA isolation from plants. Although the use of ready-made kits gives clearer looking DNA, the obtained DNA was found to be insufficient and did not give positive results in PCR studies.*

**Keywords:** DNA isolation, Plant, CTAB, PCR.

### **1. Giriş**

Türkiye, gerek bitki çeşitliliği gerekse bitkilerin yaşam alanları bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir. Ülkemiz florasının zengin damarlı bitkilerden oluşmasında birçok faktör rol oynamaktadır. Bunlar; 3 farklı fitocoğrafik bölgenin kesiştiği yerde bulunması, Asya ve Avrupa kıtaları arasında köprü konumunda olması, bitkilerin yayılışı bakımından önemli bir fiziksel ve iklimsel bariyer fonksiyonu gören Anadolu Diyagonalinin varlığı, çok farklı iklim tiplerinin etkisi altında kalması, 0-4500 metre arasında değişen yükselti farklarının bulunması, deniz, ırmak, göl, nehir, bataklık gibi çok farklı ekosistemleri bir arada barındırması gibi etmenler rol oynamaktadır (Davis ve Hedge, 1975; Ekim ve Güner, 1986; Avcı, 1993 Ekim, 1997).

Türk botanikçilerinin katkılarıyla, son yıllarda yazılmış olan “Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)” (Güner ve ark., 2012) kitabında, önceleri yalnızca ülkemizde yayılış gösterdiği bilinen bazı türlerin komşu ülkelerde de yayılış gösterdiğinin saptanmasıyla, Türkiye’nin sahip olduğu tür sayıları değişerek, toplam tür sayısı 9753, endemik tür sayısı 3035, endemizm oranı ise % 31.12 olarak belirtilmiştir. Türaltı taksonlarla birlikte ülkemizdeki doğal yayılış gösteren damarlı bitkilerin toplam takson sayısı 11466, endemik takson sayısı 3649 ve türaltı taksonlarla birlikte endemizm oranı da % 31.82 olarak belirtilmiştir (Güner ve ark., 2012; Sancar, 2017).

Türkiye Florası'nı oluşturan taksonların yaklaşık üçte birinin (% 31.82'nin) endemik olması, Türkiye'yi bitki genetik kaynakları açısından çok değerli yapmaktadır (Delipoyraz, 2018).

Bu çalışmaya materyal teşkil eden her üç familya da içerdikleri yoğun kimyasal bileşenler ve sekonder metabolitler bakımından oldukça zengin bitkilerdir. Örneğin; Asteraceae Familyası çok zengin bir kimyasal içeriğe sahip olup, bu maddelerin miktarı ve çeşidi cinsler arası oldukça farklılık göstermektedir. İçerdikleri kimyasalların bir kısmı zehirlidir. Bu durum Asteraceae familyasının birkaç istisna (*Helianthus annuus* L., *Helianthus tuberosus* L., *Lactuca sp.*) dışında insanlar tarafından neden az tüketildiğinin de bir açıklamasıdır. Bunun yanında zengin uçucu yağ ve terpenoid içeriğine sahip türler de vardır. Terpenoidler ve belirli fenolik içerikler aynı zamanda bu familya üyelerinin tıp ve eczacılıkta kullanılma sebepleridir (Kursat, 2010). Yine Lamiaceae familyasının birçok türü, çoğunlukla uçucu yağ içeren annual veya perennial otsu bitkiler ile çalılardır. Bu familyaya ait bitkilerin birçoğunda eterik yağlar ve sekonder metabolitlerin bulunuşu sözkonusu familyanın en önemli özelliği olup, tıp, eczacılık ve kozmetik sanayinde kullanılması bakımından önem taşımaktadır. Familya üyeleri arasında tıbbi bitki ve baharat bitkisi olarak kullanılanların sayısı çoktur. Sahip oldukları uçucu yağ ve sekonder metabolitler yaprak epiderması üzerinde, epidermis hücrelerinden farklılaşarak oluşmuş salgı tüylerinde bulunur (Kaya, 1997). Apiaceae familyası ise içerdikleri biyolojik aktiviteye sahip sekonder metabolitleri sebebiyle bilim insanlarının ilgisini çekmekte ve halk arasında kullanımları oldukça yaygın hale gelmektedir (Duke, 1987). Başta gastrointestinal sistem olmak üzere, dolaşım, solunum ve ürogenital sistemler üzerinde'de tıbbi olarak etki gösterdiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra sedatif, uyarıcı ve antispazmodik etkileride bilinmektedir. Gıda olarak tüketilen kereviz, havuç, maydanoz gibi bazı türler üzerinde yapılan çalışmalarda, bu bitkilerde bulunan bazı alifatik poliasetlenlerin etkisiyle, antifungal, antibakteriyel ve antitümör etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (Christensen ve Brandt, 2006; Demirpolat, 2017).

Morfolojik karakterlere dayalı klasik (ortodoks) sistematik çalışmaların, bitkilerin sistematik kategorilerini tanımlamak ve taksonomik problemlerini çözmek için tek başına yeterli olmadığı görüşü taksonomistler arasında oldukça kabul görmektedir. Bu durum taksonomi çalışmalarında daha çok moleküler yöntemlere ağırlık verilmesiyle sonuçlanmıştır (Kabaoğlu, 2007). Günümüzde bitki sistematigi alanında nükleer genom, kloroplast genomu ve mitokondrial genom üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Kloroplast genomunun bitkilerin taksonomik sorunlarının çözümünde tür, cins ve familya seviyelerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Sistematikçiler, bu çalışmalar sırasında öncelikle taksonomik problemleri olan ve farklı

seviyelerdeki taksonomik kategorilere giren temel canlı gruplarını tespit eder, daha sonra da bu gruplar arasındaki evrimsel ilişkileri tespit etmek amacıyla DNA sekans çalışmalarına yönelirler (Doğan, 2007).

Bitkilerde moleküler seviyedeki araştırmaların ilk adımı bitkinin sahip olduğu genomik DNA'nın temiz, kaliteli ve yoğun bir şekilde izole edilmesidir. Genomik DNA'nın eldesi hücre zarı ve duvarının eritilmesi, proteinlerden arındırılması, bitkinin sahip olduğu pigment maddeleri ile sekonder metabolitlerin yıkanması ve DNA'nın çöktürülerek saflaştırılması gibi temel prensipleri içerir (Bozkaya, 2012). Bitki taksonlarının büyük kısmında kullanılan birbirinden farklı çok sayıda izolasyon protokolleri mevcuttur. Bu protokollerin neredeyse hepsi kullanışlı DNA eldesi vermektedir. Ancak her bitkinin sahip olduğu biyokimyasal yapı birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu nedenle bir bitki grubunda başarılı olan bir izolasyon protokolü, bir diğer bitki grubunda aynı başarı oranı ile sonuç vermeyebilir. Genomik DNA izolasyonu, yapılarında yüksek oranda alkaloidler, glikozitler, bazı azotlu bileşikler ve polipeptitler gibi sekonder metabolitler ile yoğun pigment maddesi barındıran bitkilerde her zaman kolay olmayabilir (Aydın ve Köçkar, 2008; Sevindik ve ark., 2013). Böyle durumlarda farklı protokoller uygulayarak ya da mevcut protokolda modifikasyonlar yaparak söz konusu problemler ortadan kaldırılmaya çalışılır.

Bu araştırmada üç farklı familyaya ait bazı taksonlar kullanılarak farklı genomik DNA izolasyon protokolleri denenmiştir. Çalışmaya materyal oluşturan taksonlar, içerdiği zengin sekonder metabolitler sebebiyle tıp, eczacılık ve kozmetik sanayinde kullanımı yaygın olan önemli familyalardandır. Bu araştırma ile; morfolojik karakterlerle tür sınırları tam netleştirilemeyen sorunlu sistematik grupların moleküler yapılarına dayalı filogenetik sistematik konumunun belirlenebilmesi açısından gerekli olan uygun metodların belirlenmesi amaçlanmış ve gelecekte bu ve benzeri cinslerle yapılacak DNA temelli çalışmalara fikir sunarak katkı sağlaması amaçlanmıştır.

## **2. Materyal ve Metot**

### **2.1. Bitki Örnekleri**

Çalışılan tüm taksonlar 2020 yılının Nisan ayında Pelin Yılmaz Sancar tarafından Elazığ-Hankendi civarından toplanmış olup, her taksondan bir grup bitki preslenerek kurutulmuş ve herbaryum materyali haline getirilmiş, bir diğer grup ise örnek saklama poşeti içerisine alınarak -20°C'de çalışılana kadar muhafaza edilmiştir. Herbaryum materyali kullanarak yapılacak olan izolasyonda canlı yeşil renkli kurumuş yapraklar seçilerek cam bir havan içerisinde toz hale getirilmiş ve 1gr olacak şekilde ependorf tüplere aktarılmıştır. -20 °C'de saklanan taze örnekler ise

sıvı azot kullanılarak cam bir havan içerisinde ezilerek toz hale getirilmiş ve yine 1gr olacak şekilde ependorf tüplere aktarılmıştır. DNA izolasyonu için toplanan örnekler ve detaylı lokalite bilgileri Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** DNA izolasyonu için kullanılan taksonların lokalite bilgileri

Taksonlar	Lokaliteleri
<i>Achillea schischkinii</i>	B7 Elazığ-Hankendi civarı yol kenarları, 1120 m
<i>Centaurea solstitialis</i> subsp. <i>solstitialis</i>	B7 Elazığ-Hankendi civarı yol kenarları, 1114 m
<i>Biforia radians</i>	B7 Elazığ-Hankendi civarı yol kenarları, 1009 m
<i>Lisaea strigosa</i>	B7 Elazığ-Hankendi civarı yol kenarları, 994 m
<i>Salvia aethiopsis</i> ,	B7 Elazığ-Hankendi civarı yol kenarları, 1200 m
<i>Mentha spicata</i>	B7 Elazığ-Hankendi civarı yol kenarları, 1139 m

## 2.2. DNA İzolasyon Metodları

### 2.2.1. CTAB Protokolü

Bitkilerden genomik DNA izolasyonu için ilk olarak CTAB yöntemi denenmiştir (Doyle ve Doyle, 1987).

Kullanılan CTAB ekstraksiyon tamponunun hazırlanışı şu şekildedir; 2 gr %2’lik CTAB, 28 ml 5M NaCl, 40 ml 0,5M EDTA (pH 8,0), 10 ml 0,1M Tris-HCl (pH 8,0) ve 20 ml dH<sub>2</sub>O karıştırılarak otoklavda steril edilir.

DNA’ yı çözdüreceğimiz TE tamponu ise, 1ml 1M Tris-HCl (pH 8,0) ve 0,2 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) karıştırılarak dH<sub>2</sub>O ile 100 ml’ye tamamlanır ve otoklavda steril edilir.

Sterilizasyon sonrası CTAB ekstraksiyon tamponu ve çözücü TE tamponu kullanıma hazırdır.

**Bu yöntemin uygulama şekli şöyledir;** 1 gr bitki örneği havanda toz haline getirilir ve 200 µl’lik ependorf tüplere alınır. Üzerine 500 µl CTAB tamponu eklenir ve vorteksle karıştırılır. Ardından 5 µl β-Merkaptoetanol eklenir ve tekrar vortekslenerek bir saat süreyle 65°C’de inkübe edilir. Bu esnada örnekler 10 dakikada bir alt üst edilmek suretiyle karıştırılır. İnkübasyon sonunda örnekler 14.000 rpm’de 20°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant yeni temiz bir ependorfa aktarılıp pellet atılır. Süpernatantın üzerine 750 µl 24:1 oranında karıştırılmış kloroform:izoamil alkol eklenerek alt üst edilir ve tekrar 14.000 rpm’de 20°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüplerde 3 faz gözlenir. Bunlar; en altta kalan fenolik bileşenlerle pigment maddelerini içinde barındıran yeşil renkli faz, arada kalan bitki partiküllerini içeren ince hareketli bir tabaka ve en üstte DNA yı içeren renksiz sulu faz. En üstte kalan sulu faz yeni ependorf tüpe aktarılır ve üzerine 450 µl isopropanol eklenerek 24 saat boyunca

-20°C’de bekletilir. İsoopropanol, çözeltideki DNA molekülünü çöktürecektir. 24 saatin sonunda -20°C’den çıkarılan tüpler 14.000 rpm’de +4°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüplerin en dip kısmında nokta halinde DNA gözle görülecektir. Üstte kalan sıvı isopropanol fazı dökülerek tüplere 500 µl %70’lik etil alkol eklenir ve 14.000 rpm’de +4°C’de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek DNA yıkanır. Gerek görülürse bu yıkama işlemi 2-3 defa daha tekrarlanabilir. En son olarak tüpler kurutma kağıtlarına yan yatırılır ve etil alkolün iyice uçması sağlanır. Tamamen kuruyan pellet üzerine 50 µl TE (Tris-EDTA) tamponu eklenir ve pellet çözülerek kullanıma hazır hale getirilir. İzole edilen DNA’lar 24 saat +4 °C’de bekletilerek iyice çözülmesi sağlanır.

### **2.2.2. CTAB+PVP Protokolü**

Bu protokolde, izolasyon yöntemi modifiye edilmiş şekilde kullanılmıştır (Porebski ve ark., 1997). Bu yöntemde daha önceki metotta hazırlanan CTAB ekstraksiyon tamponuna PVP ilave edilerek kullanılmıştır (20 ml CTAB ekstraksiyon tamponuna 0.8 gr PVP eklenerek hazırlanmıştır). Burada dikkat edilmesi gereken önemli nokta CTAB+PVP karışımının taze hazırlanmış olmasıdır.

**Bu yöntemin uygulama şekli şöyledir;** 1 gr yaprak dokusu ezilir. Ezilen örnekler eppendorf tüplere alınır ve üzerine hazırlanan CTAB+PVP (60°C ısıtılmış olmalıdır) karışımından 600 µl eklenir ve vortekslenir. Ardından 6 µl β-Merkaptoetanol eklenir ve tekrar vortekslenerek 2 saat 60 °C’de inkübe edilir. Bu esnada örnekler 10 dakikada bir alt üst edilmek suretiyle karıştırılır. İnkübasyon sonunda örnekler 14.000 rpm’de 20°C’de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant yeni temiz bir eppendorfa aktarılıp pellet atılır. Üzerine 600 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenir ve tekrar santrifüj yapılır. Böylece proteinler ve sekonder metabolitler çöker, pigmentler yıkanır ve DNA üstte kalır. Oluşan süpernatant yeni tüpe aktarılır ve üzerine 600 µl izopropanol eklenir ve -80 °C’de 3-4 saat bekletilir. Daha sonra santrifüj yaptırılarak DNA çöktürülür ve dipte pellet oluşur. Bu aşamada DNA çıplak gözle görülebilir. Üstteki çözelti dökülerek oluşan pellete 1 ml %70 lık etanol eklenip alt üst edilir. -20 °C’de 30 dk bekletilir ve bekleme süresi sona erince santrifüj yapılarak çökeltme sağlanır. Üstteki süpernatant çöpe atılır, altta pellet kalır. Kalan çökelti %70’lik etanol ile tekrar santrifüjlenir. Santrifüjden sonra üstteki etanol atılır ve dipte pellet kalır. Dipte kalan pellet kurutma kağıdına yatırılarak etanolün iyice uçurulması sağlanır. Son olarak pellet 50 µl TE eklenerek iyice çözülür. İzole edilen DNA’lar 24 saat +4 °C’de bekletilerek iyice çözülmesi sağlanır.

### **2.2.3. Hazır DNA İzolasyon Kiti Protokolü**

Bu protokolde izolasyon, ticari amaçla satılan hazır DNA izolasyon kiti ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda kullanılan solüsyonlar ve tüpler hazır bir şekilde kit içeriğinde bulunmaktadır.

**Bu yöntemin uygulama şekli şöyledir;** Toz hale getirilmiş bitkilerden uygun miktarlarda örnek alınarak steril eppendorflara bırakılır. Her bir örneğe Buffer - AP1'den 400 µl ve RNase A'dan 4 µl eklenerek vorteks ile karıştırılır. 65°C su banyosunda 2 dakikada bir karıştırmak suretiyle 10 dakika bekletilir. Süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüplere Buffer – P3 ten 170 µl eklenerek 1 dakika boyunca vortekslenir. Ardından buzun içerisine alınarak 5 dakika bekletilir. Buzdan çıkarılan örnekler 14.000 rpm'de 25°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı faz mor renkli (QIAshredder mini spin columns) tüplere aktarılır. Tüpler 20.000 rpm'de 25°C'de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüplerin üstte kalan mor kapaklı kısmı çıkartılıp atılır. Altta kalan süzüntünün içerisine Buffer – AW1'den 400 µl eklenir ve birkaç kez pipetaj yaparak karıştırılır. Oluşan karışım beyaz renkli (DNeasy mini spin columns) tüplere aktarılır ve 5.000 rpm'de 25°C'de 1 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası beyaz kolonlar temiz toplama tüplerine oturtulur. Üzerine Buffer – AW2'den 500 µl eklenerek 5.000 rpm'de 25°C'de 1 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası alttaki sıvı kısım dökülerek kolonlara tekrar Buffer – AW2'den 500 µl eklenerek 10.000 rpm'de 25°C'de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası kolonlar temiz toplama tüplerine oturtulur, kapakları açılarak Buffer – AE çözeltisinden 50 µl eklenir. 10 dakika bekletilerek 5.000 rpm'de 25°C'de 1 dk santrifüj edilir. Bu işlem 2 kez tekrar edildikten sonra kolonlar atılır ve DNA'lar kullanıma hazır hale gelir. Bu protokoldede izole edilen DNA'lar 24 saat +4 °C'de bekletilerek iyice çözülmesi sağlanır.

### **2.3. DNA Örneklerinin Safılık ve Miktar Tayini**

Tüm yöntemlerle izole edilen DNA örneklerinin yoğunluğu jel elektroforezinde koşturularak gözlenmiştir. İzole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde 80 W' da 45 dakika süre ile koşturuldu. Süre sonunda agaroz jel, alttan aydınlatma yapabilen bir UV translimunator vasıtası ile görüntülendi. Ayrıca örneklerdeki DNA konsantrasyonu, Nanodrop Spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Bu cihazda 260/280 nm'deki absorbe değerleri DNA-protein saflık derecesini, 260/230 nm'deki absorbe değerleri ise DNA-RNA saflık derecesini belirtmektedir. DNA'lar saflık ve kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda

saflığın 260/280 nm, absorpsiyon oranının 1,8-2,0 dolayında olması beklenmektedir. Elde edilen değerlerin 2,0'den daha yüksek olması; DNA örneğinin RNA, kloroform veya fenol ile kirli olduğunu; 1,8 değerinden daha düşük olması ise DNA örneğinin içerisinde proteinler veya polifenol bileşikler bulunduğunu ifade eder (Hoisington, 1992; Doğan, 2013). DNA ölçümleri yapılmadan önce DNA'nın yükleneceği kısım bir bezle silinip, temizlendikten sonra ince uçlu bir pipet yardımıyla her bir DNA örneğinden 1 µL kadar yüklendi. DNA'ların kalite ve miktar tayini bu cihazla tespit edildi. DNA örneklerinin okunması içinde kör (blank) olarak DNA yı içinde çözdürdüğümüz Tris-EDTA (TE) çözeltisi kullanıldı. Kalite ve miktar açısından en iyi olan DNA'lar PCR'da çoğaltma işlemi için seçildi.

Çalışılan taksonlara ait DNA'ların nanodrop spektrofotometre ile alınmış ölçümleri, saflık değerleri ve DNA'ların miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Elde Edilen DNA'ların Ölçümleri (C=CTAB, P=CTAB+PVP K=Hazır İzolasyon Kiti)

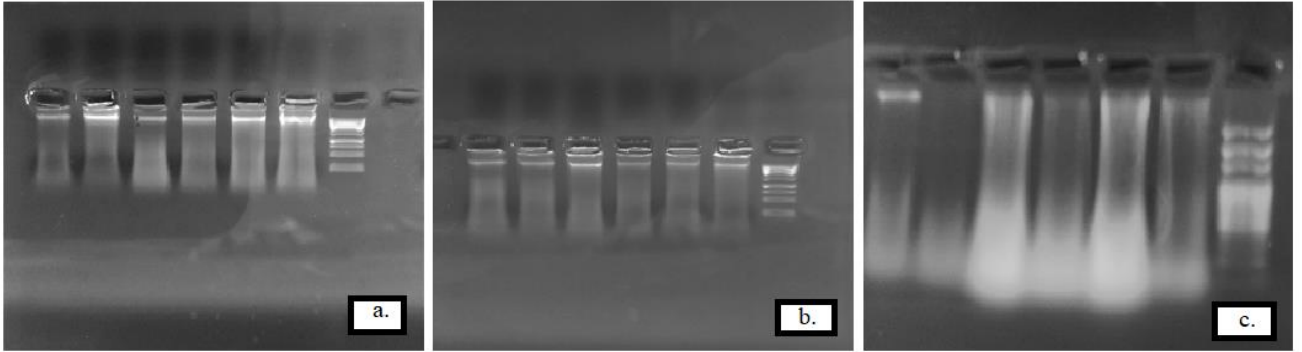
Taksonlar	A260 / A280	DNA miktarı
<i>Achillea schischkinii</i> (Taze doku)	1.82(C)	924ng (C)
	1.17(P)	464ng (P)
	1.01(K)	102ng (K)
<i>Achillea schischkinii</i> (Herbayum materyali)	1,87 (C)	564 ng (C)
	1,55 (P)	352 ng (P)
	1,34 (K)	50 ng (K)
<i>Centaurea solstitialis</i> subsp. <i>solstitialis</i> (Taze doku)	1,76 (C)	1256 ng (C)
	1,15 (P)	398 ng (P)
	1,24 (K)	38 ng (K)
<i>Centaurea solstitialis</i> subsp. <i>solstitialis</i> (Herbayum materyali)	1,84 (C)	850 ng (C)
	1,61 (P)	184 ng (P)
	1,17 (K)	20 ng (K)
<i>Biforia radians</i> (Taze doku)	1,90 (C)	1539ng (C)
	1,65 (P)	550 ng (P)
	1,04 (K)	120 ng (K)
<i>Biforia radians</i> (Herbayum materyali)	1,92 (C)	1106 ng (C)
	1,52 (P)	298 ng (P)
	1,22 (K)	85 ng (K)
<i>Lisaea strigosa</i> (Taze doku)	1,90 (C)	1345 ng (C)
	1,65 (P)	482 ng (P)
	1,18 (K)	55 ng (K)
<i>Lisaea strigosa</i> (Herbayum materyali)	2,00 (C)	934 ng (C)
	1,15 (P)	278 ng (P)
	1,36 (K)	32 ng (K)
<i>Salvia aethiopsis</i> (Taze doku)	2,19 (C)	1280 ng (C)
	1,65 (P)	556 ng (P)
	1,77 (K)	64 ng (K)
<i>Salvia aethiopsis</i> (Herbayum materyali)	1,99 (C)	765 ng (C)



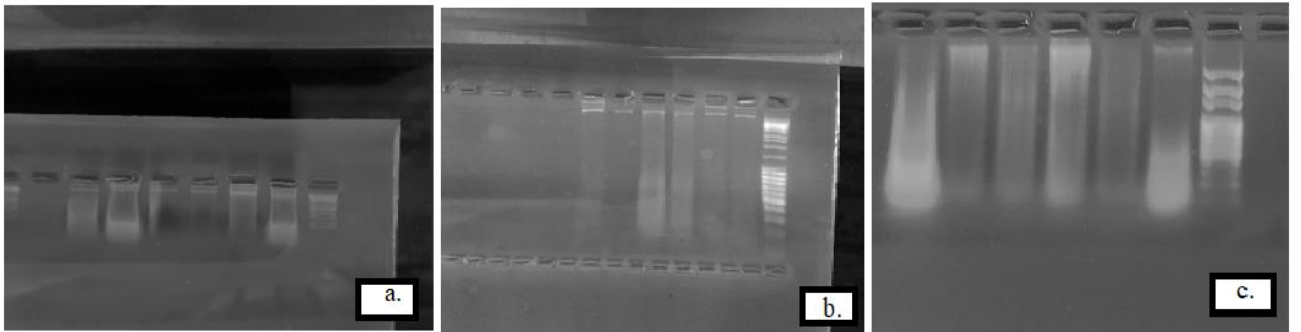
	2,15 (P)	287 ng (P)
	1,15 (K)	20 ng (K)
<i>Mentha spicata</i> (Taze doku)	1,70 (C)	1756 ng (C)
	1,35 (P)	598 ng (P)
	1,50 (K)	92 ng (K)
	2,10 (C)	987 ng (C)
<i>Mentha spicata</i> (Herbayum materyali)	1,76 (P)	224 ng (P)
	1,36 (K)	42 ng (K)

### 3. Bulgular ve Tartışma

İzole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde 80 W'da 45 dakika süre ile koşturuldu. Süre sonunda agaroz jel, alttan aydınlatma yapabilen bir UV translimunator vasıtası ile görüntülendi. Dondurulmuş taze bitki dokuları kullanılarak izole edilen gDNA'ların jel fotoğrafı Şekil 1'de, Herbayum örnekleri kullanılarak izole edilen gDNA'ların jel fotoğrafı ise Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Dondurulmuş taze bitki yaprak dokusu kullanılarak izole edilen gDNA'ların jel fotoğrafları (a. CTAB yöntemi b. CTAB+PVP yöntemi c. Hazır izolasyon kiti)



Şekil 2. Herbayum materyali haline getirilmiş bitki dokuları kullanılarak izole edilen gDNA'ların jel fotoğrafları (a. CTAB yöntemi b. CTAB+PVP yöntemi c. Hazır izolasyon kiti)

Yapılan çalışmada 3 farklı familyaya ait 6 bitki örneği, 3 farklı DNA izolasyon metodu açısından hem herbaryum materyali üzerinde (kuru), hem de dondurulmuş taze bitki materyali üzerinde (taze) denenerek karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre her üç yöntemdede en güzel sonuçlar dondurulmuş taze bitki materyali kullanılarak çalışılan gruplarda gözlenmiştir. Her ne kadar herbaryum materyali haline getirilmiş örneklerden gDNA elde edilse'de, bu DNA taze materyalden elde edilen kadar temiz değildir. Bununla birlikte, araştırma sonuçlarımıza göre, 1 µl örnekte miktar olarak en fazla DNA eldesini sağlayan yöntem her iki grupta da (kuru ve taze) CTAB yöntemidir. 1 µl örnekteki DNA miktarlarını kıyasladığımız zaman, CTAB yöntemini CTAB+PVP yöntemi ve hazır izolasyon kiti takip etmektedir. Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen DNA örneklerinin agaroz jele yüklenerek koşturulması sonucu elde edilen fotoğraflar değerlendirildiği zaman CTAB yöntemi ile elde edilen gDNA'ların en parlak bantları verdiği görülmüştür. Buna paralel olarak nanodrop spektrofotometre ile miktar ölçümü yapıldığı zamanda yine ng cinsinden DNA miktarı en fazla olan yöntemin CTAB yöntemi olduğu görülmüştür.

Genel olarak bir değerlendirme yapmak gerekirse; her tür veya her cins için birbirinden değişik izolasyon protokolleri ya da mevcut izolasyon protokolünde modifikasyonlar gerekebilir. Hatta bazen aynı cinse ait farklı türlerde bile mevcut izolasyon protokolünde modifikasyonlar yapmak gerekebilir. Çünkü her bitkinin içeriği birbirinden farklıdır. CTAB yöntemi zor ve fazla çalışma saatleri gerektiren ve yoğun zararlı kimyasal maddelerin kullanımını içeren bir yöntem olsa da, kaliteli ve temiz DNA elde etmek açısından en başarılı yöntemdir. Hazır izolasyon kiti ile yapılan DNA izolasyonu ise, kullanılması basit, zamandan tasarruf sağlayan, ancak oldukça pahalı bir methodur. Ayrıca elde edilen genomik DNA'nın miktarına bağlı olarak jel fotoğraflarında ki bantlar parlak olmayıp elde edilen DNA'ların PCR çalışmalarında müspet sonuç vermediğide görülmüştür.

#### **4. Sonuçlar ve Öneriler**

Moleküler bitki biyolojisi çalışmalarında DNA izolasyon aşaması oldukça önemlidir. PCR aşamasında ise DNA'nın miktarı, kalitesi ve saflığı reaksiyonun doğru çalışması açısından daha da önem kazanmaktadır (Ergül, 2000). DNA temelli çalışmalarda iyi bir izolasyon başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. İzolasyonlar sonucu elde edilen DNA'ların agaroz jel görüntüleri incelendiğinde DNA'ların tek bant oluşturdukları görülmektedir. Tek bant oluşturmuş olmaları onların RNA ve hücre sekonder ürünlerinden saf, sarmal yapılarını koruyarak parçalanmamış olduklarını göstermektedir (Karataş ve Ağaoğlu, 2006; Şimşek ve ark., 2008). DNA izolasyonu için

uygulanan üç farklı yöntem karşılaştırıldığı zaman en kullanışlı DNA, CTAB yöntemi ile izole edilen DNA olmuştur. CTAB+PVP ve hazır DNA izolasyon kiti ise daha az miktarlarda ve daha kirli DNA'lar vermiştir.

Elde edilen DNA'lar çeşitli universal primerler ile PCR açısından uygunluğu değerlendirilmiş ve CTAB yöntemi ile CTAB+PVP yönteminden elde edilen DNA'lar PCR da bant vermiştir. Bununla birlikte, farklı marka enzimlerle bile hazır kit kullanımı sonucu elde edilen DNA'lardan bant elde edilememiştir.

Sonuç olarak bizim kullandığımız bitki taksonlarında her üç yöntemlede temiz görünümü DNA elde edilse de manuel yolla elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarına uygunluk açısından daha kullanışlı olduğu görülmüştür. Hazır kit kullanımının her ne kadar uygulaması kolay olsa da, bizim çalıştığımız bitki taksonları için kullanışlı olmadığı görülmüştür.

### Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada, araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

### Kaynaklar

- Aydın, S. Ö., Köçkar, F. (2008). Farklı genomik dna izolasyon yöntemlerinin *Satureja* (Labiatae) türlerinde uygulanması. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1:52-60.
- Bozkaya, F. (2012). DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktarı ve Kalitesi Üzerine Etkisi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1/2:92-96.
- Christensen, L. P., Brandt, K. (2006). Bioactive Polyacetylenes in Food Plants of the Apiaceae Family Occurrence. *Bioactivity and Analysis*, 41, 683-689.
- Demirpolat, A. (2017). *Türkiye'de Yetişen Bazı Scandix L. (Apiaceae) Türleri Üzerinde Biyosistemik Araştırmalar*. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Doğan, B., (2007). *Türkiye Jurinea Cass. (Asteraceae) cinsinin revizyonu*. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya.
- Doğan, G. (2013). *Hypericum L. (Hypericaceae) Cinsine Ait Drosanthe (Spach) Endl. Eksiyonunun Kloroplast Genomunun Kodlanmayan "Trn" Bölgelerine Göre Karşılaştırmalı Filogenetik Analizi*. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., (1987). A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bull*, 19, 11-15.
- Duke, J. A. (1987). *Handbook of Medicinal Plants*. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Ergül, A. (2000). *Asmalarda (Vitis vinifera L. cvs.) genomik DNA Parmak İzi Analizi ile Moleküler Karakterizasyon*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. (edtr), (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. *Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları derneği Yayını*, İstanbul.
- Hoisington, D. (1992). Laboratory protocols, CIMMYT. *Applied Molecular Genetics Laboratory*, Mexico DF.
- Kabaoğlu, A. (2007). *Türkiye'de bulunan Hypogymnia (Nyl.) Nyl. Türlerinde rDNA ITS Bölgesi Dizi Analizi ile Çeşitliliğin Tanımlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Karataş, A., Ağaoğlu, Y. S. (2006). Güneydoğu Anadolu Bölgesi üzüm çeşitlerine ait DNA'ların miktar ve saflıkları üzerine bir araştırma. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi dergisi*, 10:83-90.
- Kaya, A. (1997). *Türkiye'de Yetişen Acinos Miller Türleri Üzerinde Morfolojik Anotomik Ve Kimyasal Araştırmalar*. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kurşat, M. (2010). *Türkiye'de Yetişen Artemisia L. (Asteraceae) Taksonlarının Taksonomik Revizyonu*. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Porebski, S., Bailey, L. G., Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Report*, 15, 8–15.
- Sancar, P. Y. (2017). *Türkiye'de yetişen Anthriscus Pers. (Apiaceae) Türlerinin Genetik Yapısının ve Filogenetik Akrabalık İlişkilerinin Kloroplast Genomunun Kodlanmayan "trn" Bölgelerine Göre Araştırılması*. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Sevindik, E., Coşkun, F., Çetiner, N. G., Selvi, S., Şahin, N. (2013). The genomic DNA isolation methods comparative analysis upon some Sideritis (Labiatae) and Serratula (Asteraceae) taxa. *Biological Diversity and Conservation*, 6/2, 16-21.