

## Farklı genomik dna izolasyon yöntemlerinin *satureja (labiatae)* türlerinde uygulanması

**Serap ÖZ AYDIN, Feray KÖÇKAR**

*Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğrt.ABD, Balıkesir  
Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ABD, Balıkesir*

### Özet

*Bitkilerden genomik DNA izolasyonu için farklı protokoller bulunmaktadır. Ancak farklı bitkilerin kimyasal içerikleri de farklı olduğundan birbirine yakın türler için bile özel genomik DNA izolasyon yöntemi gerekli olabilmektedir. Bu çalışmada tıbbi ve aromatik bitkilerden, uçucu yağ ve fenolik bileşiklerce zengin Satureja (Labiatae) cinsi kullanılmıştır. Bu çalışmada üç farklı DNA izolasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemler karşılaştırıldığında bazı değişiklikler yapılarak oluşturulan yöntemin en uygun yöntem olduğuna karar verilmiştir. Bu yöntemle elde edilen gDNA' da, proteinler, RNA, polisakkaritler, uçucu yağlar, fenoller ve diğer kirleticiler minimal düzeydedir. Bu elde edilen DNA'ların saflığı ve miktarı jel elektroforezi ve UV ( $A_{260}/A_{280}$  ve  $A_{260}/A_{230}$ ) spektroskopik ölçümlerle belirlenmiştir. Ayrıca Rasgele Arttırılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniğiyle DNA'nın PZR tekniklerine uygunluğu gösterilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** DNA izolasyonu, Satureja, RAPD-PZR

### Abstract

*There are several methods available for isolation of genomic DNA for plants. However, since different plants have different chemical composition, even close species need specific genomic DNA isolation protocol. In this study, Satureja (Labiatae) genus that is very rich in essential oils and phenolic compounds and one of the aromatic plants has been used. Two different DNA isolation procedures have been tried. A modified procedure was developed after a comparison of two different procedures. Main contaminants for genomic DNA, RNA, polysaccharides, essential oils, phenolic compounds were at minimal level in the genomic DNA. The concentration and purity of the obtained DNA was determined by agarose gel electrophoresis and UV spectroscopy ( $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$ ). In addition, the suitability of genomic DNA obtained from different procedure were also checked by RAPD-PCR reactions*

**Key Words:** DNA extraction, Satureja, RAPD-PCR

## 1. Giriş

Sekonder metabolitlerce zengin olan bitkiler ilaç, kozmetik, yiyecek ve pestisid endüstrisinde değeri olan bitkilerdir. Bu aromatik ve tıbbi bitkilerin çoğu pek çok ülkede ve ülkemizde yetişmekte, ayrıca yıllardır halk ilacı ve çay olarak kullanılmaktadır (1,2). Labiatae familyasına dahil olan *Satureja* cinsine ait türler de zengin karvakrol ve timol içerdiği ile bilinmektedir (3,4). *Satureja* cinsinin ürettiği bu önemli kimyasal bileşiklerden dolayı uçucu yağ içerikleri, diğer kimyasal içerikleri, etnomedikal etkileri üzerine yapılan çalışmalar yanında farmakolojik aktivitelerini ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için yapılan pek çok çalışmalar bulunmaktadır (5,6).

*Satureja* cinsinin, bu önemli özelliklerine rağmen halen sistematik problemleri bulunmaktadır. Özellikle bazı türler deniz seviyesinden 2500 m yüksekliğe ve çok geniş yayılış alanına sahip olduğundan yüksek bir varyasyon göstermektedir. Ayrıca bazı hibritler bulunmaktadır. Bu nedenlerle bazı türlerin sınırlarının belirlenmesi oldukça güç olabilmektedir. Bu sistematik problemler bitkilerin morfolojik karakterlerinin kullanılmasıyla çözümlenememektedir. Bu sebeple farklı karakterlerle türlerin teşhisinin yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır. Moleküler sistematik yöntemlerin kullanılması gerekliliği belirmiştir.

Türlerin belirlenmesi için yapılacak DNA temelli bu çalışmalar RAPD (7,8), RFLP (9), genom haritası, DNA parmakizi çalışmaları gibi moleküler genetik çalışmalarıdır. Bu teknikler için yüksek saflıkta DNA'ya ihtiyaç vardır (10). Pek çok bitki türünde başarıyla uygulanan değişik DNA izolasyon yöntemleri mevcuttur (12,13,14,15). Ancak bitkiler arasında da biyokimyasal açıdan oldukça farklı kompozisyonlar bulunmaktadır. DNA izolasyonu, yapılarında yüksek oranda fenoller, ketonlar, aldehitler, polisakkaritler gibi sekonder metabolitleri içeren bitkilerde problemler olabilir. Aynı tür içerisinde ana bileşik değişebilmektedir. *Satureja hortensis*'in kültüre alınmış formlarında karvakrol, doğal formlarında ise timol ana bileşik olarak belirlenmiştir. Türkiye'nin doğusunda yetişen bitki örnekleri yağlarında timol'ü ana bileşen olarak tespit edilmesine karşın batısında yetişenlerde ana bileşiğin karvakrol olduğu saptanmıştır (16). Değişik türler arasındaki kemotipik heterojenlik, bir izolasyon protokolünden optimal DNA izolasyonuna izin vermeyebilir ve belki de yakın ilişkili türler arasında bile farklı izolasyon yöntemleri gerekebilir (17).

Bu çalışmada kullanılan *Satureja* cinsi içerdiği bileşikler sebebiyle tıbbi ve ekonomik açıdan önemli bir bitki grubudur. Aynı zamanda bu bitki, sistematik açılarından oldukça problemler olduğundan moleküler yöntemler uygulanması amaçlanmaktadır. Modifiye ettiğimiz DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen gDNA örneklerine RAPD tekniği uygulanmıştır.

## 2. Materyal-yöntem

### 2.1. DNA izolasyonu için bitki örneklerinin toplanması

DNA İzolasyonu için 2000-2002 tarihleri arasında *Satureja* cinsine ait 7 farklı lokaliteden farklı vejetasyon dönemlerinde toplanmış türler kullanılmıştır. Bunlar, *S. wiedemanniana* (Tokat-Turhal), *S. cuneifolia* (Denizli-Babadağ), *S. pilosa* (Balıkesir-Kazdağ), *S. icarica* (Çanakkale-Gökçeada), *Satureja* sp.1 (Bursa-Mezitler), *Satureja* sp.2 (Balıkesir-Zeytinli), *Satureja* sp.3 (Çanakkale-Küçükkuyu).

Bu bitkilerin araziden toplanan taze yaprakları genomik DNA izolasyonuna kadar –80 °C derin dondurucuda saklanmışlardır.

## 2.2. *Genomik DNA izolasyonu*

2XCTAB yöntemi: *Satureja* bitkilerinden genomik DNA izolasyonu için Saghai-Marooif ve ark.yönteminden modifiye edilmiş 2XCTAB yöntemi kullanılmıştır (13).

1 g taze yaprak dokusu sıvı azotla toz haline getirilir. Ependorfa 750 µl 2XCTAB (Sigma) solüsyonu eklenir. Ependorf parafilmle sarılır, 30 dk. 65 °C de su banyosunda bekletilir ve parafilm açılır. Ependorfa 750 µl kloroform : izoamilalkol (24:1) (Sigma) eklenir. Tüp iyice çalkalanır üst fazı ( 650 µl ) 1.5 ml lik tüpe transfer edilir. Eğer faz temiz değilse 550 µl alınır ve üzerine 300 µl 2XCTAB ve 750 µl kloroform eklenir ve 15000 rpm de 5 dk.santrifüj edilir. Diğer ependorfa 650 µl alıp üzerine absolü izopropanol (Sigma) eklenir (oda sıcaklığında) 25000 rpm ve 25 °C de 5 dk. santrifüj edilir. İzopropil alkolü dikkatle dökülür. Kurutma kağıdına kapatılır. 1 ml % 70 etanol (Sigma) eklenir ve 15000 rpm de 25 °C de 5 dk.santrifüj edilir. Daha sonra etanolü uzaklaştırılır ve 30 dk. beklenecek kuruması sağlanır. Pellet 500 µl TE pH 8 içinde çözülür.

## 2.3. *Dellaporta ve ark. yöntemi*

Daha sonra Dellaporta ve ark. (14) yöntemi izolasyon işlemi için kullanılmıştır.

1 g taze yaprak dokusu sıvı azot ile ezilir. 15 ml ayrıştırma tamponu (100 mM Tris (Sigma), 50 mM EDTA (pH: 8, Sigma), 500 mM NaCl (Fluka), 10 mM mercaptoethanol (Merk) ve distile su ) üzerine ezilmiş bitki dokusu eklenir. Bu tüp içine 1 ml %20 SDS (Sigma) eklenip 1 dk hızlıca çalkalanıp 10 dk 65 °C’ de inkübe edilir. Daha sonra üzerine 5 ml, 5 M Potasyum asetat (Merk), eklenip tüp yavaşça çalkalanır ve buzda 20 dk. bekletilir. Tüpler 15000 rpm’ de oda sıcaklığında 20 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant dikkatlice bir ependorf tüpe aktarılır bunun üzerine soğuk 10 ml izopropanol eklenir ve daha sonra -20 °C’de 30 dk. bekletilir. -20 °C’den alınan tüp 14000 rpm’ de oda sıcaklığında 5 dk santrifüjlenir. Süpernatant yavaşça dökülür ve pellet kurutulur. Bunun üzerine 400 TE-I (50 mM Tris, 10 mM EDTA ) eklenir ve 30 dk. çözünmesi için beklenir. Çözündükten sonra 75 µl 3M NaOAc (Merk), ve 500 µl izopropanol eklenerek 30 sn satrifüjlenir. Süpernatant boşaltılıp 1ml % 80 Etanol eklenip yine 30 saniye santrifüjlendikten sonra ependorf ters çevrilip 1 saat kurumasını beklenir. Son aşama olarak DNA 500 µl TE-II (10mM Tris, 1mM EDTA) içinde çözülür.

## 2.4. *Modifiye DNA izolasyon yöntemi*

Bu yöntemde Dellaporta ve ark.(14) İle Pich. ve ark.(15) yöntemlerine benzer olan bir yöntem modifiye edilmiş ve Do ve arkadaşlarının(18) kullandığı yöntemdeki gibi 2.5 M NaCl konsantrasyonu ile polisakkaritler uzaklaştırılmıştır. Bu yöntem aşağıdaki gibidir:

1 gram taze yaprak dokusu havanda sıvı azot yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezilir. 1 ml ekstraksiyon tamponu (100mM Tris-HCl (pH=8.0), 50 mM EDTA (pH=8.0), 500mM NaCl, 0.007% 2-mercaptoetanol) ve 130 µl %10’luk SDS mikrosantrifüj tüpüne eklenir ve karıştır. 15 dk. 65 °C ‘de inkübasyona bırakılır. 300 µl 5M potasyum asetat eklenip 30 dk. buzda bekletilir. 15000 rpm 10 dk. Santrifüj edilir. Süpernatant iki tüpe aktarılır yaklaşık 300 µl kadar. Her bir tüpe 300 µl fenol (pH 8,

Sigma) ve 200 µl dH<sub>2</sub>O eklenir. 15000 rpm de 10 dk. Santrifüj edilir. Supernatantı alınıp (≈ 800µl) üzerine eşit hacimde kloroform-izoamilalkol eklenir. 10 dk. 15000 rpm de 4°C de santrifüj edilir. Süpernatantı yeni bir tüpe aktarılır gerekirse koroform-izomilalkol tekrarlanabilir. 2 hacim absolu etanol eklenip 30 dk. buzda bekletilir. 5 dk. 15000 rpm de sanrifüj edilip süpernatantı dökülür. Pelet 70% lik alkolle yıkanıp TE' de çözülür. gDNA 'dan 5µg alınır bu miktar 500 µl' ye TE ile tamamlanır. 2,5 M NaCl eklenir üzerine 2 hacim etanol konduktan sonra 20-30 dk. beklenir. 10 dk. Satrifüjden sonra etanol dökülüp yerine % 70 'lik 500 (1 etanol eklenir 3 dk spin ettikten sonra TE içinde çözülür.

### **3. DNA örneklerinin saflık, miktar tayini ve pzs tekniklerine uygunluğunun belirlenmesi**

Tüm yöntemlerle izole edilen DNA örnekleri jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. Bunun için % 0.7 agaroz (Sigma), jel elektroforezi kullanılmıştır. Genomik DNA 'nın saflığını daha kesin sayısal ifadelerle belirlemek için spektrofotometre (Unicam-Hexios α ) ile absorbans ( $A_{260}/A_{280}$  ve  $A_{260}/A_{230}$ ) değerleri ölçülmüş, saflığı ve miktarı hesaplanmıştır (19).

### **4. RAPD-PZR uygulaması:**

İzole edilen DNA'nın PZR reaksiyonlarına uygunluğunu göstermek için de elde edilen genomik DNA RAPD reaksiyonlarında test edilmiştir.

Her bir reaksiyon (25 µl) , 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0.2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (Fermentas), 1 µM Primer (Sigma) , 1 U Taq Polymerase (Fermentas), 2,5 µl 10XPCR tampon (Fermentas), 10 ng genomik DNA içermektedir. Amplifikasyon işlemi PZR cihazı (Techne-Progene) ile şu basamaklarda gerçekleşmiştir :1. döngü 94 °C'de 2dk., bunu izleyen 42 döngü, denaturasyon aşaması 94 °C'de 30 s ,primer bağlanma aşaması 35°C' de 30 s, uzama aşaması ise 72°C' de 60 s ve son basamak 1 döngü 72°C' de 4 dk.'dır (20).

RAPD-PZR sonucu oluşan ürünler 80 V, 1.2% agaroz jelde yürütülmüştür. Daha sonra UV transilluminator kullanılarak jeller değerlendirilmiştir. Jellerin fotoğrafları polaroid 667 tip film kullanılarak polaroid kamera ile çekilmiştir.

### **5. Sonuç ve tartışma**

*Labiatae* familyasına ait tıbbi ve aromatik bitkilerin ürettiği sekonder metabolitler ve uçucu yağlar pek çok alanda bu bitkilerin değerini arttırmaktadır. Ancak bu bitkiler ile DNA temelli bir çalışma yapılması düşünüldüğünde, DNA izolasyonunda, sekonder metabolitler, uçucu yağlar, fenolik bileşikler gibi bitki etken maddeleri çeşitli sorunlar ortaya çıkabilmektedir. DNA'da bu maddelerin varolması DNA temelli çalışmalarda engelleyici etkiler göstermektedirler. Bu sorunlar, izolasyon yöntemlerinde bazı değişikliklerin yapılmasıyla ortadan kaldırılabilir.

*Satureja* cinsindeki akrabalık ilişkilerini belirlemek için yapılacak olan RAPD çalışmalarında kullanılmak üzere saf DNA gereklidir. Bu amaçla ilk olarak Dellaporta ve ark.'a (14) göre izolasyon yapılmıştır. Spektro ölçümlerinden  $A_{260}/A_{280}$  oranı

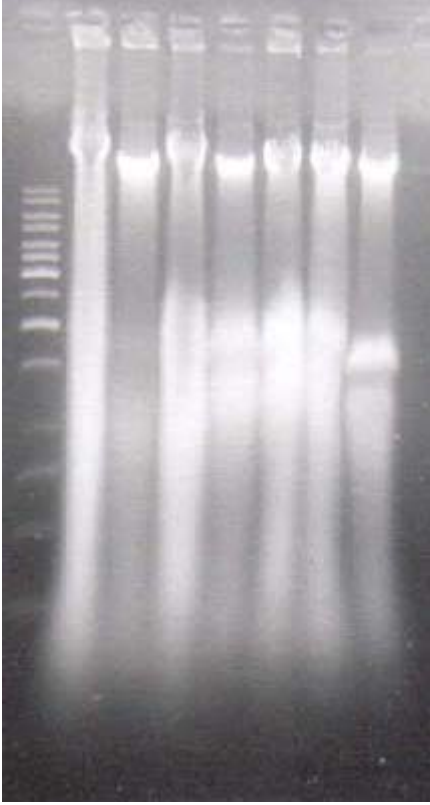
ortalama 1.3 değerini geçmemiştir. Bu yöntemle elde edilen gDNA örnekleri % 0.7 'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bu jelin fotoğrafı Şekil 1 'de verilmiştir.

İlk uygulanan yöntemle izole edilen DNA'nın saflık değeri düşüktür. Bu nedenle farklı bir yöntem ile (2xCTAB) daha DNA izole edilmiştir (13). Bu örnekler içinde  $A_{260}/A_{280}$  oranı hesaplanmıştır. Değer ortalama olarak 1.5 civarındadır. Bu yöntemle elde edilen DNA miktarı Spektro ölçümleriyle belirlenebilmesine karşılık oldukça az olduğundan agaroz jelde görüntülenmesi mümkün olmamıştır. (Şekil 3 c)

Özellikle Dellaporta ve Ark. yöntemine göre izole edilen gDNA fazla miktarda RNA kirliliği içermektedir. Şekil-1' deki jelde de görülen kirliliği ortadan kaldırmak amacıyla örnekler Ribonükleaz A işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu işlemden sonra UV spektrometrede incelendiğinde düşük yoğunlukta DNA'nın varlığı tespit edilirken jelde incelendiğinde görüntülenmemiştir. Bu şekilde RNA kirliliğinden temizlenmiş olan gDNA örnekleriyle yapılan RAPD reaksiyonlarında bir amplifikasyon oluşmamıştır. Ayrıca uygulanan fenol kloroform ekstraksiyonu, sonucu değiştirmemiştir. Aynı şekilde diğer yönteme de aynı işlemler uygulanmış yine RAPD reaksiyonunda sonuç alınamamıştır.

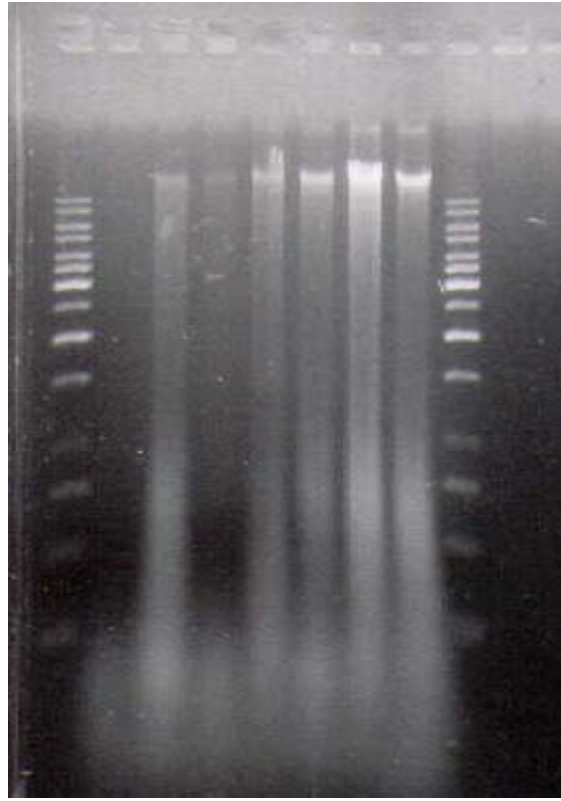
Bu durumda *Satureja* cinsine ait bitkilere uygun yeni bir gDNA yönteminin uygulanmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır. Modifiye bu metod iki temel basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta Dellaporta ve ark. ile Pich ve ark yöntemi modifiye edilerek mini izolasyon yöntemi oluşturulmuştur. Ancak bu şekliyle tüm DNA örnekleri RAPD reaksiyonu sonucu tekrarlanabilir net bantlar vermemiştir. İkinci basamakta PZR' ı inhibe ettiği tesbit edilen polisakkaritler temizlenmiştir. Bu işlem Do ve arkadaşlarının [18] uyguladığı gibi yüksek konsantrasyonda NaCl kullanımıyla çözülmüştür. Modifiye yöntemle elde edilen genomik DNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri ve UV spektrofotometre absorbans değerleri gerekli standartlara uygun bulunmuştur. Modifiye yöntemle elde edilen örneklerin absorbans değerleri ölçüldüğünde  $A_{260}/A_{280}$  oranının (ortalama 1.82) saf DNA değerinde olduğu hesaplanmıştır. Bu yönteme ait 7 farklı DNA örneğinin agaroz jelde verdikleri görüntü Şekil 2'de verilmiştir.

M A D M K Z Ç G



Şekil-1 Dellaporta et.all.yöntemine göre gDNA izolasyonu sonucunda elde edilen gDNA'nın konsantrasyonunu gösterir agaroz jel fotoğrafı

M A D M K Z Ç G M

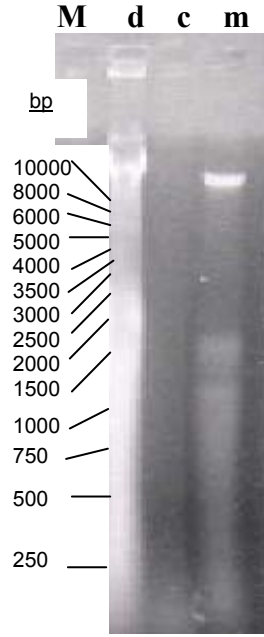


Şekil-2 Modifiye yöntemle göre gDNA izolasyonu sonucunda elde edilen gDNA'nın konsantrasyonunu gösterir agaroz jel fotoğrafı

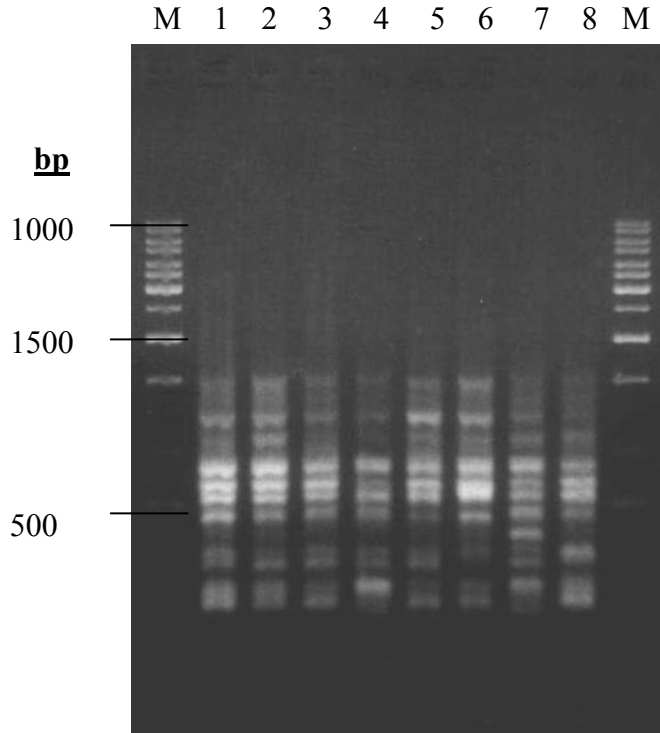
(M: Marker DNA, A:Tokat, D:Denizli, M:Mezitler, K:Kazdağ, Z:Zeytinli, Ç:Küçükkuyu, G:Gökçeada lokalitelerine ait gDNA bantları.)

Şekil 3'te 3 farklı izolasyon yöntemiyle elde edilen gDNA örneklerinin karşılaştırılması verilmiştir. (d: <sup>[14]</sup>, c: <sup>[13]</sup>, m:modifiye yöntem). Jel fotoğrafından da görüleceği gibi ilk yöntemle elde edilen DNA örneği çok fazla kirlilik içermektedir. İkinci uygulanan yöntemle elde edilen DNA miktarı çok az olmaktadır. Bizim bu bitkiler için uyguladığımız yöntemle elde edilen DNA ise jelde net bir bant oluşturmaktadır. Bu da bize DNA'nın oldukça temiz ve miktarının yeterli olduğunu göstermektedir.

Farklı izolasyon yöntemlerinin sonucunda elde edilen farklı genomik DNA örneklerinin RAPD reaksiyonuna uygunluğu, çok sayıda primer kullanılarak değerlendirilmiştir. Farklı yöntemlerle elde edilen DNA örnekleriyle RAPD reaksiyonu uygulaması yapılmıştır. Bu örneklerden sadece modifiye yöntem ile elde edilen DNA örnekleri PZR' da çoğaltılabilmektedir. Çok sayıda primer kullanılarak gDNA'nın kalitesinin değerlendirildiği bu RAPD-PZR sonuçlarının görüntülerine ait bir örnek agaroz jel fotoğrafı Şekil 4'te verilmiştir. Tüm primerlerle, tekrarlanabilirliği olan bantların oluşması bu türler için gerekli DNA izolasyon yönteminin belirlendiğini göstermiştir.



Şekil-3 Üç Farklı gDNA izolasyon sonucunun karşılaştırması (d: <sup>[14]</sup>, c: <sup>[13]</sup>, m:modified method, M: 1 kb DNA Standardı)



Şekil-4 OPB-08 Primerinin RAPD-PZR sonucu oluşan bantlarını gösterir agaroz jel fotoğrafı

(M:1 kb DNA Standardı, 1:*S.wiedemanniana*, 2:*S.cuneifolia*, 3:*S.parnassica* subsp.*sipylea*, 4:*S.icarica*, 5:*S.pilosa*, 6:*Satureja* sp.1, 7:*Satureja* sp. 2, 8:*Satureja* sp.3)

Bu çalışma ile *Satureja* cinsine ait türlerin DNA izolasyonunda, diğer yöntemlere göre daha az miktarda kimyasal gerektiren ve kolay uygulanabilen bir genomik DNA

izolasyon yöntemi belirlenmiştir. Bu yöntem, ayrıca uçucu yağ ve diğer sekonder metabolitler açısından zengin diğer *Labiatae* türlerinin DNA izolasyonu için de kullanılabilir.

### Kaynaklar

1. P.H.Davis, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, (1982), Vol.7,p 314, University Press, Edinburgh.
2. Başer K.H.C., “Essential oils from aromatic plants which are used as herbal tea in Turkey”, Flavours, Fragrances and Essential Oils.Proceeding of the 13 thInternational Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils, İstanbul, Turkey(1995)
3. Tümen, G., Kırmıner, N., Başer, K.H.C., The essential oils of *Satureja L.* occurring in Turkey, Proceeding of the 27 th.international symposium on essential oil, (Franz, C.H.,Mathe, A. And Buchbauer,G.,EDS.) Allured Publishing Corporation, ViennaAustria, pp.250-254(1997).
4. Başer, K.H.C., Tümen, G., Satıl, F., Kırmıner, N. “Comparative Morphological and Chemical Studies on *Satureja* Species From West Anatolia” Second Balkan Botanical Congress (SBBC), p. 129-132, Ed. By Neriman Özhatay, İstanbul – Turkey. 14-18 May (2000)
5. Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Duband, F., Carnat, A.P.,”Rosmarinic Acid Content and Antioxidant Activity in French”, *Fitoterapia*, 62, 2:166-171(1991) farmasotik aktivite)
6. Müller-Riebau F., Beger B. And Yegen o., “Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils selected aromatic plants growing wild in Turkey”, *J. Agric. Food Chem.* 43, 2262-2266(1995)(antimicrobial)
7. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers *Nucl. Acids. Res.* 18:6531-6535
8. Welsh J.,Mc Clelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.*Nucl. Acid Res* 19:303-306.
9. Southern EM, “Detectionof specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis”. *J.Mol.Biol.*, 144:395-404(1975).
10. Aljanabi, S.M., Forget, L., Dookun, A., “An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide and Polyphenol Free Sugarcane DNA” *Plant Mol. Bio.Repor.* 17:1-8(1999).
11. Porebski S., Bailey L.G. and Baum B.R.,” Modification of a CTAB DNA extraction protokol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components” *Plant Mol. Biol. Repr.* 15:8-15(1997).
12. Doyle J.J.and Doyle J.L. “A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue” *Phytochem Bull*19:11-15(1987)
13. İncirli, A., Bilgiç, H., Akkaya, M. S., "Assessment of Polymorphic AFLP Markers in *Triticum durum* and *Aegilop* sp. ", *Turk J. Biol.* 25, 291-299 (2001).
14. Dellaporta, S. L.,Wood, J., Hicks, J.B., “A Plant DNA Mini Preparation Version II”, *Plant Molecular Biology Reporter*, Voll 1, (1983) ,pp:19.
15. Pich, U. And Schubert, I., Minipep Method For Isolation Of DNA From Plants With A High Contentof Polyfenols ",*Nüç. Acid. Res.*,21, 3328 (1993).
16. Başer K.H.C., Özek T.,Kırmıner N. And Tümen G.,“A Comparative Study of The Essential Oils of Wild and Cultivated *Satureja hortensis*”, *J.Essent.Oil Res.*(In press)



17. Weishing K., Nybom H., Wolf K and Meyer W., “DNA Isolation And Purification. İn:DNA Fingerprinting İn Plants And Fungi, pp 44-59 CRC Press, Boca Raton, Florida (1995).
18. Do N. and Adams R.P. “A Simple Technique For Removing Plant Polysaccharide Contaminants From DNA” BioTechniques 10: 163–166(1991).
19. Sambrook, J. ,Russell, D.W., Maniatis, T, Molecular Cloning A Laboratory Manual. 2ndedition Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, N. Y. (1989).
20. Öz Aydın S. Bazı *Satureja* Türlerinin Morfolojik, Moleküler ve Sistemik Yönden Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir, (2004).