

FARKLI GEOFİT CİNSLERİNİN GENOMİK DNA MİKTAR VE SAFLIKLARININ BELİRLENMESİ¹

Arif ATAĞ²
Adnan DOĞAN⁵

Belinda AYDIN³
Kutay Coşkun YILDIRIM⁶

Yeşim DOYĞACI⁴
Erdal KAYA⁷

ÖZET

Ülkemiz geofitler açısından oldukça elverişli bir ekolojiye sahiptir. Dünya geofitlerinin (soğanlı, yumrulu, yumru köklü, rizomlu ve benzeri bitkiler) önemli bir kısmını barındıran Türkiye florasında geofitlerin 78 cinsine ait yaklaşık 1027 taksonu (tür, alt tür, varyete, form) yetişmekte, olup bunların yaklaşık %40'ı endemiktir. Bu türlerin büyük bir kısmı Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü bünyesinde koruma altına alınmışlardır. Bu ekolojide moleküler biyoloji çalışmalarını başarıyla yürütebilmek için mutlaka yeterli ve yüksek saflıkta DNA izole etmek gerekmektedir. Geofitlerin endemik türlerinin yok olma ihtimalleri de düşünüldüğünde bu çalışmaların önemi daha da artmaktadır. Bu çalışmada Türkiye ekolojisinden toplanan farklı geofit cinslerine ait taze yapraklardan toplam 2517 adet DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izole edilen DNA'ların saflık ve miktar tayinleri yapılarak birbirleri ile karşılaştırmaları yapılmıştır. Çalışmada en fazla *Allium*, *Crocus*, *Ornithagalum*, *Muscari*, *Ophrys*, *Geranium*, *Cyclamen*, *Scilla*, *Anemone*, *Gagea* cinslerine mensup türlerle çalışılmıştır. Bunların dışında çalışılan cinslerle birlikte toplam 26 cinsle çalışma yapılmıştır. Çalışılan cinsler içerisinde elde edilen sonuçlar topluca değerlendirildiğinde DNA izolasyonunun miktar ve saflık açısından en başarılı yapıldığı cinsler *Delphinium*, *Erodium*, *Cyclamen*, *Fritillaria*, *Allium*, *Crocus*, *Primula* ve *Anemone* olurken en sorunlu olan cinsler ise *Asphodelus*, *Oxalis* ve *Asphodeline* olmuştur. Çalışılan 2517 örneğin %65'lik kısmında DNA izolasyonu sorunsuz iken %35'lik kısmında ise düşük kalitede DNA elde edilmiştir. DNA izolasyonu sorunsuz olan örneklerin ortalama DNA miktarı 83 ng/µl ve saflık değeri 1.89 olmuştur. Elde edilen sonuçlar ışığında; çalışılan cins sayısının fazlalığı, yaprak tip ve içeriklerinin farklılığına rağmen iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışma ile ileride yapılacak tanımlama, genetik haritalama, benzerlik ilişkisi gibi moleküler araştırmalar için kaynağı ve orijini belli genetik materyalin koruma altına alınması ve depolaması gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: DNA İzolasyonu, Agaroz Jel, Geofitler, Spektrofotometre

¹ Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: Mayıs, 2013

² Dr., Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, YALOVA

³ Dr., Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, İSTANBUL

⁴ Biyolog, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, YALOVA

⁵ Dr., Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, YALOVA

⁶ Zir. Yük. Müh., Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, YALOVA

⁷ Zir. Yük. Müh., Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, YALOVA

SUMMARY

DETERMINATION OF GENOMIC DNA QUANTITY AND PURITY OF DIFFERENT GEOPHYTE GENUS

Ecology of our country is very convenient in terms of Geophytes. World geophytes (bulbs, tubers, tuberous root, rhizome plants and so on) are an important part in Flora of Turkey. Geophytes grown in Turkey seventy-eight belonging to the genus containing about 1,027 taxa (species, subspecies, varieties, forms) and approximately 40% of them are endemic. A large number of these species within the Yalova Atatürk Central Horticultural Research Institute are under protection. It is required to isolate DNA high purity and enough quantity to successfully carry out the study of molecular biology. Also considering the possibility of extinction of endemic geophyte species increased the importance of this work. In this study, different Geophyte species collected from Turkey ecology DNA isolated from fresh leaves. DNA isolation and cold storage of the total population was 2,517. The results showed that the modified protocol almost successfully produced a sufficient amount of DNA with high quality. It was obtained high purity and sufficient amounts of DNA from *Delphinium*, *Erodium*, *Cyclamen*, *Fritillaria*, *Allium*, *Crocus*, *Primula* and *Anemone*. However sufficient purity and quantity of DNA could not be obtained from most of the *Asphodelus*, *Oxalis* ve *Asphodeline* species. 65% of the isolated DNA results were successful but 35 % of the total samples were obtained poor quality DNA. The average amount of samples in a high-quality DNA isolation from 83 ng/ μ l, and the purity value was 1.89. In the light of these results, Even if studied excessive number of species, different leaf types and their contents although the obtained results can be said to be successful. In this study, future identification, genetic mapping, molecular research all kinds of similarities to the relationship, the source and origin of the genetic material to be protected, and storage of certain realized.

Keywords: DNA Isolation, Agarose Gel, Geophytes, Spectrophotometer

GİRİŞ

Türkiye geofitler açısından oldukça elverişli bir ekolojiye sahiptir. Bu sebeple oldukça zengin bir geofit popülasyonu ülkemizde mevcuttur. Soğanlı, yumrulu ve rizumlu bitkiler Türkiye florasında önemli bir yer tutar. Özellikle ülkemizin farklı kesimlerinden doğadan toplanan farklı türlere mensup geofitlerin ihracatı da yapılmaktadır. Bu ihracat rakamlarının her geçen yıl artmakta olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde geofitler genellikle süs bitkisi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca sınırlı sayıda bazı türler ise fitokimyasal içerikleri için kullanılmaktadır (30, 24).

Geofitler ile DNA izolasyon çalışmaları dünyada farklı türlerde özellikle tanımlama çalışmalarında kullanılmak üzere yürütülmüştür. Bu analizlerde kullanılacak DNA'ların mutlaka yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Bazı türlerde polifenoller ve diğer sekonder metabolitler sebebiyle saf halde DNA ekstraksiyonu oldukça zordur (15, 1, 29, 9, 21, 23, 7, 30).

Tüm bitki türleri için tek bir izolasyon yöntemi bazen arzu edilen sonuçları vermemektedir (28). Genellikle genç ve kısmen açılmış yapraklar DNA izolasyonu için tercih edilir. Çünkü bu yapraklar daha az miktarda polifenol ve diğer DNA izolasyonunu zorlaştıran sekonder metabolitleri içerirler (19). DNA izolasyon protokollerinde yüksek kalite ve miktarda DNA elde etmek ana amaçtır. DNA izolasyonu sonrası elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını belirlemede kullanılan en yaygın iki yöntem spektrofotometre ve agaroz jelde kontrol etmektir. Saf olarak izole edilen DNA'lar farklı moleküler çalışmalarda doğrudan kullanılabilirdiği gibi soğukta depolayarak (-20°C ve -80°C aralığında) daha sonra kullanmak amacıyla da saklanabilmektedirler (8, 27, 25).

DNA izolasyon çalışmalarında elde edilen DNA'ların saflığı ve kalitesi bitkiden bitkiye ve kullanılan protokole göre farklılık arz edebilmektedir. Çok farklı metod ve teknolojiler genomik DNA izolasyonu için kullanılmaktadır. Bu tekniklerin seçiminde farklı faktörler etkili olmaktadır. Özellikle fazla sayıda örnekle ve

sınırlı bir zamanda yapılacak çalışmalar için en yaygın kullanılan yöntemler DNA izolasyon kitleridir. Bu amaçla en yaygın olarak silika temelli kitler kullanılmaktadır. Elde edilen DNA'ların saflığını arttırmak için etanol ve isoproponal kullanımı bu kitlerde oldukça yaygındır (13, 21).

Pek çok araştırmacı kullanımının kolay olması, insan sağlığı için zararlı kimyasalları içermemesi, çabuk sonuç vermesi ve pek çok tür için kullanılabilir olması sebebiyle bitki DNA izolasyon kitlerini kullanmaktadırlar (18, 2, 14).

Saf halde yeterli DNA izolasyonu yapıldıktan sonra özellikle genetik akrabalık ilişkileri ve marköre dayalı seleksiyon çalışmaları pek çok araştırmacı tarafından farklı geofit cins ve türleri ile yürütülmüştür (17, 6, 12).

Bu çalışmada Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın desteğiyle ve farklı üniversite ve araştırma kuruluşlarının katılımıyla yürütülen bir TÜBİTAK projesi kapsamında 26 farklı geofit cinslerinden toplanan 2517 adet popülasyon örneğinin DNA izolasyonu, saflık ve miktar tayini ile karşılaştırmaları yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Türkiye florasından toplanan 26 farklı geofit cinsine mensup toplam 2517 adet geofit bitkisi çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Çalışmada kullanılan geofit cinsleri ve bunlardan çalışılan örnek sayıları sırasıyla şu şekildedir:

Allium (760), *Crocus* (315), *Ornithogalum* (282), *Muscari* (266), *Orchiadaceae* (151), *Geranium* (70), *Scilla* (56), *Gagea* (53), *Cyclamen* (52), *Asphodeline* (51), *Galadiolus* (50), *Anemone* (49), *Romulea* (40), *Arum* (37), *Bellevalia* (37), *Primula* (34), *Galanthus* (34), *Fritillaria* (30), *Biarum* (26), *Corydalis* (26), *Narcissus* (25), *Sternbergia* (22), *Asphodelus* (21), *Erodium* (12), *Oxalis* (10) ve *Delphinium* (8). Bu cinslere ait taze yapraklar DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Çalışma 2011 ve 2012 yıllarında Türkiye florasından toplanan 26 farklı geofit cinsine ait popülasyon örnekleri ile yürütülmüştür.

Metot

Genomik DNA Ekstraksiyonu

Geofit cislerine ait popülasyon örneklerinin DNA izolasyonu için silika temelli yaygın bitki DNA izolasyon kitlerinden QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (16) kullanılmıştır. Bu kit dünyada en yaygın kullanılan bitki izolasyon kiti olması sebebiyle tercih edilmiştir. İzole edilen DNA'lar daha sonra farklı ıslah ve tanımlama çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C 'de muhafaza altına alınmışlardır. Kit ile çalışırken öncelikle yaprak dokularının iyice homojenize edilmesi gerekir. Bu amaçla önce her bir 2.0 ml yüksek basınç dayanıklı Eppendorf plastik tüp içerisine 0.1 g yaprak örneği ve 1 adet metal bilye atılmış daha sonra yaklaşık 30 saniye sıvı azot içerisine daldırılmıştır. Hızla donan tüp içerisindeki örnekler yaklaşık 2 dakika saniyede 30 kez titreşim yapacak şekilde Tissue Lyser II (Qiagen) homejenizatörü ile parçalanmışlardır. Parçalanmış örnekler DNeasy Plant Handbook (16) kitabındaki protokole bazı modifikasyonlar yapılarak DNA izolasyon işlemi yapılmıştır.

DNA Saflık ve Miktarlarının Belirlenmesi

DNA izolasyon çalışması sonucunda elde edilen saf DNA miktar ($\text{ng}/\mu\text{l}$) ve saflıkları (A_{260}/A_{280}) (DNA/protein) önce Picodrop Spektrofotometre (Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer) ve daha sonra %1'lik agaroz jel ile yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir. Spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde özellikle saflık değerinin belirlenmesinde 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin oranı esas alınmıştır. Tüm okumalar birkaç tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerler alınmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde her iki uygulamada da yeterli kalitede ve saf halde sonuç veren örneklerin DNA izolasyonunun sorunsuz olduğu kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Toplam 2517 popülasyon örneğinin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm DNA izolasyonları taze açmış yapraklardan 100 mg

olarak alınan örneklerle yapılmıştır. Yapılan izolasyon sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 1’de verilmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde çalışılan cinsler içerisinde DNA izolasyonunun miktar ve saflık açısından en başarılı yapıldığı cinsler *Delphinium*, *Erodium*, *Cyclamen*, *Fritillaria*, *Allium*, *Crocus*, *Primula* ve *Anemone* olurken en sorunlu olan cinslerin ise *Asphodelus*, *Oxalis* ve *Asphodeline* olduğu görülmektedir. Özellikle *Delphinium* cinsine ait 8 ve *Erodium* cinsine ait 12 popülasyondan alınan DNA örneklerinin tamamında iyi kalitede DNA elde edilmiştir. Bu sonuçlar Çizelge 1 ve Şekil 1’de %100 iyi DNA oranı ile gösterilmiştir. Ancak *Asphodelus* cinsine ait 21 popülasyondan örnek alınmış ve bunların 17 tanesinde DNA izolasyonu sorunlu olmuştur. Bu sebeple iyi DNA oranı Çizelge 1’de %19 olarak gösterilmiştir. Bu cins yapılan çalışmalar sonucunda DNA izolasyonu en sorunlu cins olarak ön plana çıkmıştır. Bu cinsi sırasıyla *Oxalis* ve *Asphodeline* takip etmiştir. Genel anlamda çalışılan 2517 örneğin %65’lik kısmında DNA izolasyonu sorunsuz iken %35’lik kısmında ise düşük kalitede DNA elde edilmiştir.

DNA izolasyonu sorunsuz olan örneklerin ortalama DNA miktarı 83 ng/µl ve saflık değeri 1.89 olmuştur. Cinslere ait popülasyonların genel ortalamaları alınarak yapılan değerlendirmede genellikle cinslerin birkaç istisna dışında 1.8–1.9 yüksek saflık değeri aralığında olduğu görülmüştür (Şekil 2). İzole edilen DNA miktarları için benzer bir değerlendirme yapılmış ve 14–178 ng/µl aralığında cinslere ait ortalama değerler elde edilmiştir (Şekil 3). En yüksek değeri 178 ng/µl ile *Arum* cinsi verirken onu sırasıyla *Geranium* (136 ng/µl) ve *Anemone* (129 ng/µl) takip etmiştir. En düşük miktar değeri ise 14 ng/µl ile *Oxalis* cinsinden elde edilirken onu sırasıyla *Asphodeline* (43 ng/ µl) ve *Erodium* (47 ng/ µl) cinsleri takip etmiştir.

Arbi ve ark. (3) tarafından *Allium roseum* L. ile yapılan benzer bir çalışmada spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde saflık ve miktar olarak bu çalışmada elde edilen değerlere çok yakın sonuçlar elde edilmiştir. Shashi ve ark. (20) tarafından *Allium stracheyi* tohumlarından DNA izolasyonu yüksek saflıkta ve yeterli miktarda yapılmış ve özellikle tohumlardan elde edilen DNA’ların fenoller ve diğer polisakkaritlerden arı olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle bu çalışmada yaprak örnekleri fenolik bileşenler ve diğer

polisakkaritlerce zengin olan ve yeterli saflık ve miktarda DNA elde edilemeyen türler için tohumlar genomik DNA eldesi için kullanılabilir.

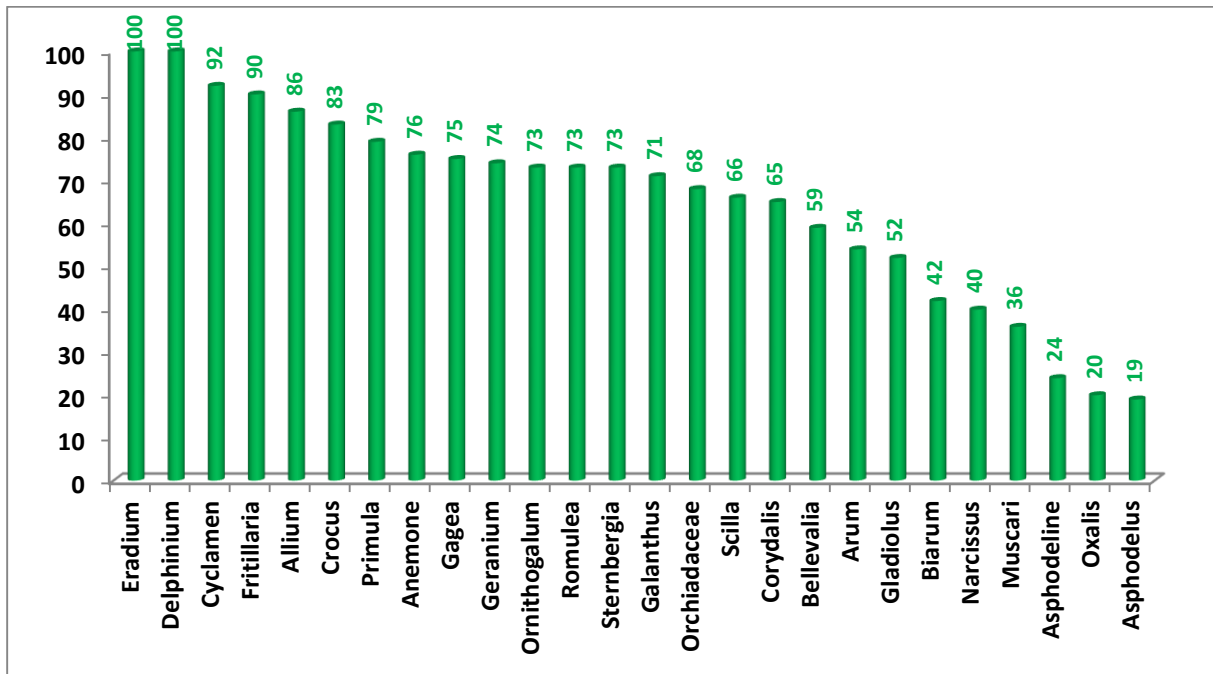
Beiki ve ark. (5) farklı *Crocus* türlerinin hem yaprak hem de soğanlarından DNA izolasyonu çalışması yapmışlardır. Soğandan izole edilen DNA’ların özellikle fenolik bileşenler ve diğer polisakkaritler yönünden temiz olmaları sebebiyle önermişlerdir. Yaptığımız çalışmada da bu araştırmaya benzer bulgular elde edilmiştir. Özellikle *Crocus*’ların yapraklarının oldukça lifli olması sebebiyle özellikle örnek alma döneminin geç kalınması halinde DNA izolasyonlarının sorunlu olduğu gözlenmiştir. Bu tür dönemlerde soğanlardan DNA izolasyonu yapılabileceği Beiki ve ark. (5) tarafından bildirilmiştir. Ancak Göçmen Taşkın ve ark. (12), *Cyclamen alpinum* türüne ait popülasyon örnekleri ile yaptığı bir çalışmada farklı sonuçlar elde etmiştir. Yaprak ve yumrularından elde ettikleri DNA örneklerinden özellikle yumrularından yapılan izolasyonlarda elde edilen DNA örnekleri içinde fazla miktarda polisakkarit ve fenolik bileşik olduğunu ve PCR çalışmaları öncesi seyreltilmeleri gerektiğini bildirmişlerdir.

Özellikle iyi kalite DNA oranı düşük olan cinslerden alınan örneklerin büyük bir kısmında yaprak örnekleri çok lifli ve yüksek fenolik içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Bu geofit türlerinden DNA izolasyonu yaparken mümkün olduğunca fazla sayıda en taze organlardan örnek alınması ve yüksek fenolik içeriğine karşı kloroform, alkol gibi kimyasallar ile izole edilen DNA örneklerinin 1–2 kez yıkanması önerilmektedir. DNA dışındaki diğer bileşenlerden yeterince arındırılmayan örneklerin moleküler çalışmalarda kullanılması genellikle arzu edilen sonuçların elde edilememesine neden olmaktadır (4, 10). Ayrıca aynı cinsde ait farklı tür ve alttürler de kendi içinde farklılık gösterebilmektedir. Nitekim çalışma sırasında aynı cinsde ait farklı türlerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Benzer çalışmalarda da bu tür farklılıkların görülebildiği bildirilmiştir (26).

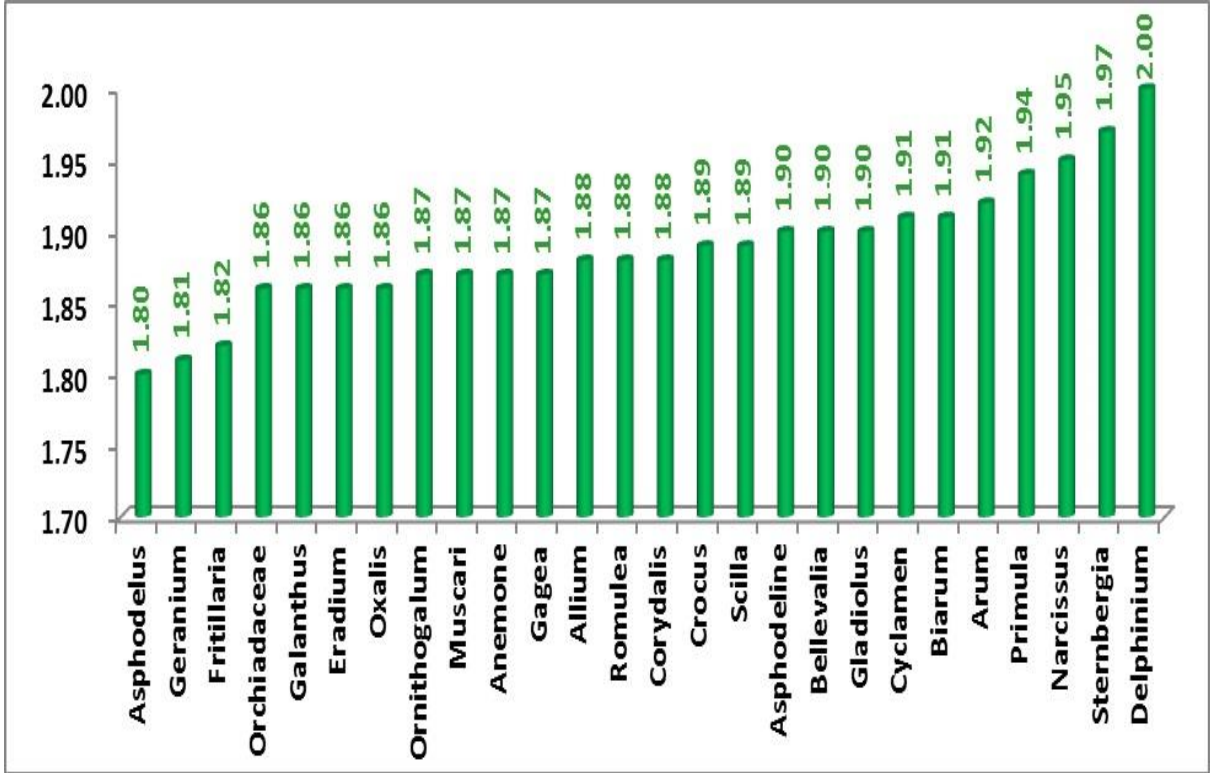
Elde edilen sonuçlar kullanılan DNA izolasyonu kiti üzerinden değerlendirildiğinde sonuçlar başarılı olarak kabul edilmektedir. Çünkü çok farklı özellikte cinslere ait yaprak örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda hep arzu edilen sonucu elde etmek oldukça zordur (11).

Çizelge 1. DNA izolasyonu yapılan cinsler ve elde edilen sonuçlar
Table 1. Obtained results of DNA isolated genera

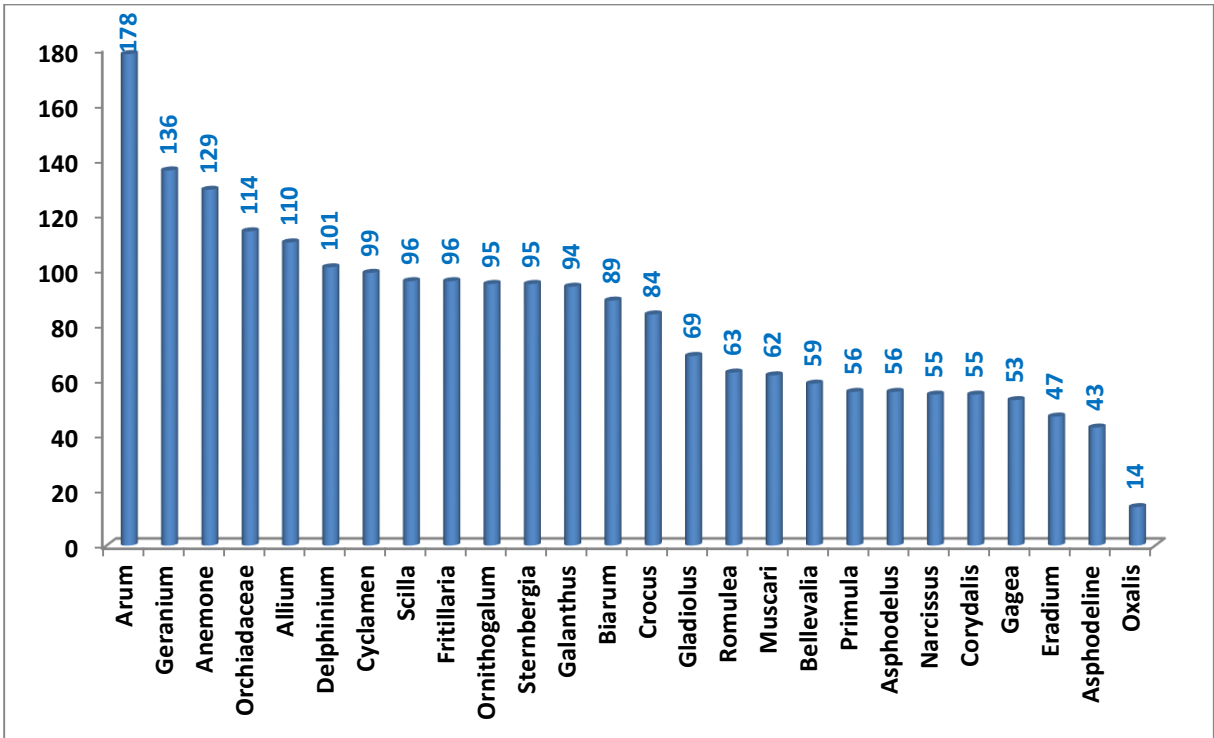
Cins adları Genus name	Cins adı kısaltması Genus name abbreviation	DNA izolasyonu iyi DNA isolation good	DNA izolasyonu sorunlu DNA isolation problematic	Toplam Total	Ortalama miktar Average amount (ng/µl)	Ortalama saflık Average purity (260/280 nm)	% sorunlu DNA oranı Ratio of problematic DNA (%)	% iyi DNA oranı Ratio of good DNA (%)
Allium	Al	651	109	760	110	1.88	14	86
Crocus	Cr	261	54	315	84	1.89	17	83
Ornithogalum	Or	207	75	282	95	1.87	27	73
Muscari	Mu	97	169	266	62	1.87	64	36
Orchiadaceae	O	103	48	151	114	1.86	32	68
Geranium	Ge	52	18	70	136	1.81	26	74
Cyclamen	Cy	48	4	52	99	1.91	8	92
Scilla	Sc	37	19	56	96	1.89	34	66
Anemone	An	37	12	49	129	1.87	24	76
Gagea	Gag	40	13	53	53	1.87	25	75
Romulea	Ro	29	11	40	63	1.88	28	73
Asphodeline	Asl	12	39	51	43	1.90	76	24
Primula	Pr	27	7	34	56	1.94	21	79
Arum	Ar	20	17	37	178	1.92	46	54
Bellevalia	Be	22	15	37	59	1.90	41	59
Galanthus	Ga	24	10	34	94	1.86	29	71
Fritillaria	Fr	27	3	30	96	1.82	10	90
Gladiolus	Gl	26	24	50	69	1.90	48	52
Biarum	Bi	11	15	26	89	1.91	58	42
Narcissus	Na	10	15	25	55	1.95	60	40
Sternbergia	St	16	6	22	95	1.97	27	73
Erodium	Er	12	0	12	47	1.86	0	100
Corydalis	Co	17	9	26	55	1.88	35	65
Asphodelus	As	4	17	21	56	1.80	81	19
Delphinium	De	8	0	8	101	2.00	0	100
Oxalis	Ox	2	8	10	14	1.86	80	20
TOPLAM Total		1800	717	2517	Ort:83 Avr:83	Ort:1.89 Avr:1.89	Ort:35 Avr:35	Ort:65 Avr:65



Şekil 1. DNA izolasyonu sorunsuz olan cinsler (%)
Figure 1. Good DNA isolated genera (%)



Şekil 2. İzole edilen DNA'ların saflık (A_{260}/A_{280}) ortalamaları
 Figure 2. The mean from purity of isolated DNA (A_{260}/A_{280})



Şekil 3. İzole edilen DNA'ların miktar (ng/μl) ortalamaları
 Figure 3. The mean from amount of isolated DNA (ng/μl)

Çünkü aynı yöntemi değiştirmeden tüm cins ve türlere uygulamak başarı oranını düşürmektedir. Çünkü her bir cinsin yaprak yapısı, kimyasal içeriği ve DNA miktarı aynı değildir. Tüm bu zorluklara rağmen bu kadar fazla cinse ait örneklerde elde edilen %65'lik oran oldukça iyi sayılmaktadır. Benzer bir çalışma Mirhomeni ve ark. (14) tarafından yapılmış klasik yöntemlerle birlikte ticari bitki DNA izolasyon kitlerinin de başarı ile farklı PCR çalışmalarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışma farklı geofit cinslerine ait 2517 popülasyondan alınan örnek ile yapılan en kapsamlı ilk çalışmalardan birisidir. Bu çalışma ile ticari olarak satılan ve pek çok araştırmacı tarafından kullanılmakta olan "Bitki DNA İzolasyon Kiti (Qiagen)"nin bazı değişiklikler sonucunda birkaç geofit cinsi hariç pek çok geofit cinsinde güvenle kullanılabileceği ortaya konmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından "1007 Kamu Kurumları Araştırma ve Geliştirme Projelerini Destekleme Programı" çerçevesinde 105G068 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Aljanabi, S. M., L. Forget and A. Dookun, 1999. An Improved Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharides and Polyphenols-Free Sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17:1-8.
2. Al-Saghir, M. G., 2009. Rapid and Efficient Method of Genomic DNA Extraction from Pistachio Trees (*Pistacia vera* L.). *Research Journal of Botany* 4:70-73.
3. Arbi, G., B. Naceur, C. Messaoud, M. Boussaid and M. Neffati, 2009. A Simple Rapid and Efficient Method for the Extraction of Genomic DNA from *Allium roseum* L. (Alliaceae). *African Journal of Biotechnology* 8(17):4020-4024.
4. Bashir, A., 2010. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds from *Colchicum luteum* Baker (Liliaceae). *African Journal of Biotechnology* 9(35):5762-5766.
5. Beiki, A. H., F. Keify and J. Mozafari, 2010. Genetic Differentiation of *Crocus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal GEBJ-18:1-10.*
6. Beiki, A. H., F. Keify and J. Mozafari, 2011. Rapid Genomic DNA Isolation from Corm of *Crocus* Species for Genetic Diversity Analysis. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(18):4596-4600.
7. Camellia, M. O. and A. I. Malikah, 2011. A DNA Isolation Protocol Suitable for RAPD Analysis from Fresh or Herbarium-Stored Leaves of a Historic *Quercus virginiana* L. *Journal of Plant Sciences.* 6:77-87.
8. Channarayappa, 2007. Molecular Biotechnology. Principles and Practices. 1st Edn. University press. London. 1228 p.
9. Dehestani, A. and S. K. K. Tabar, 2007. A Rapid Efficient Method for DNA Isolation from Plants with High Levels of Secondary Metabolites. *Asian Journal of Plant Sciences* 6:977-981.
10. Ebrahimzadeh, M. A., S. Y. Nabavi, S. F. Nabavi, F. Bahramian and A. R. Bekhradnia, 2010. Antioxidant and free Radical Scavenging Activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*. *V. odorata*. *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 23(1):29-34.
11. Fleischmann, A. and G. Heubl, 2009. Overcoming DNA Extraction Problems from Carnivorous Plants. *Anales Jard. Bot. Madrid* 66(2):209-215.
12. Göçmen Taşkın, B., N. Vardareli, E. Doğaç, R. Mammadov ve V. Taşkın, 2012. Genetic Diversity of Natural *Cyclamen alpinum* Populations. *Turk. J. Biol.* 36:413-422.
13. Khan, M. F., 2003. Evaluation of Hexaploid Wheat Genotypes by Using DNA Isolation and Gel-electrophoresis. *Asian Journal of Plant Sciences* 2:212-215.
14. Mirmomeni, M. H., S. Sajjadi Majd, S. Sisakhtnezhad and F. Doranegard, 2010. Comparison of the Three Methods for DNA

- Extraction from Paraffin-embedded Tissues. *Journal of Biological Sciences* 10:261–266.
15. Murray, M. G. and W. F. Thompson, 1980. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19):4321–4325.
 16. Qiagen Sample and Assay Technologies, 2006. DNeasy Plant Handbook. (<http://www.qiagen.com/literature>).
 17. Ronsted, N., S. S. Law, H. Thornton, M. F. Fay, M. W. Chase, 2005. Molecular Phylogenetic Evidence for the Monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the Infrageneric Classification of *Fritillaria*. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 35:509–527.
 18. Sahasrabudhe, A. and M. Deodhar, 2010. Standardization of DNA Extraction and Optimization of RAPD-PCR Conditions in *Garcinia indica*. *International Journal of Botany* 6:293–298.
 19. Salem, H. H., T. H. Huang, B. A. Ali and Q. D. Xie, 2006. Differentiation of *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* by the Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Applied Sciences* 6:1540–1546.
 20. Şener, B., M. Koyuncu, F. Bingöl and F. Muhtar, 1997. Production of Bioactive Alkaloids from Turkish Geophytes. *International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, 23–27 November 1997, Phuket, Thailand, pp:1–6*.
 21. Shankar, K., L. Chavan, S. Shinde and B. Patil, 2011. An Improved DNA Extraction Protocol from Four *in vitro* Banana Cultivars. *Asian Journal of Biotechnology* 3:84–90.
 22. Shashi, R., K. Garima, S. J. Vikash, J.P. Bhatt and G. Sanjay, 2010. Standardization of Extraction of Genomic DNA and PCR-RFLP Conditions of *Allium stracheyi*: A High Altitude Plant. *Academia Arena* 2(7):11–14.
 23. Silva, J. A. T. D., 2005. Effectiveness of DNA Extraction Protocols for Horticultural and Physiological Model Plant Analyses. *International Journal of Botany* 1:93–99.
 24. Srivastava, N., S. Vikas, K. Barkha, A. K. Dobriyal and S. J. Vikash, 2010. Polyphenolics free DNA Isolation from Different Types of Tissues of *Aconitum heterophyllum* wall-Endangered Medicinal Species. *Journal of Plant Sciences* 5:414–419.
 25. Tiwari, K. L., S. K. Jadhav and S. Gupta, 2012. Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from Some Medicinal Plants. *Research Journal of Medicinal Plant* 6(1):65–73.
 26. Van Tuyl, J. M. and E. Boon, 1996. Variation in DNA-Content in the Genus *Lilium*. *Proc. Int'l Symp. on Flower Bulbs. Acta Hort.* 430:829–835.
 27. Varma, A., H. Padh and N. Shrivastava, 2007. Plant Genomic DNA Isolation: An Art or a science. *Biotechnol. J.* 2:386–392.
 28. Vural, H. C., 2009. Genomic DNA Isolation from Aromatic and Medicinal Plants Growing in Turkey. *Sci. Res. Essays* 4:59–64
 29. Zhang, J. and J. M. Stewart, 2000. Economical and Rapid Method for Extracting Cotton Genomic DNA. *J. Cotton Sci.* 4:193–201.
 30. Ziv, M., 1997. The Contribution of Biotechnology to Breeding Propagation and Disease Resistance in Geophytes. *Biotechnology and Propagation. Int. Proc. Int'l Symp. On Flower Bulbs. (Eds.): H. Lilien-Kipnis. A. H. Halevy. A. Borochoy. Acta Hort.* 430:247–258.