T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

SALEP İÇERİĞİNİN TESPİTİNDE KULLANILABİLECEK MOLEKÜLER MARKER GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Eda KABACAOĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

SALEP İÇERİĞİNİN TESPİTİNDE KULLANILABİLECEK MOLEKÜLER MARKER GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Eda KABACAOĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALEP İÇERİĞİNİN TESPİTİNDE KULLANILABİLECEK MOLEKÜLER MARKER GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Eda KABACAOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 114O197 nolu proje ile desteklenmiştir.

OCAK 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALEP İÇERİĞİNİN TESPİTİNDE KULLANILABİLECEK MOLEKÜLER MARKER GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Eda KABACAOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 22/01/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK (Danışman) _____

Prof. Dr. Mehmet İNAN _____

Prof. Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL _____

Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ _____

Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN _____

ÖZET

SALEP İÇERİĞİNİN TESPİTİNDE KULLANILABİLECEK MOLEKÜLER MARKER GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

EDA KABACAOĞLU

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

Ocak 2018; 96 Sayfa

Salep, günümüzde ticari ölçekte yetiştirilemeyen, doğadan toplanan Orchidaceae familyasından bitkilerin yumrularından çeşitli işlemler sonrasında elde edilerek tüketime sunulan ve çok yüksek fiyatlara alıcı bulan bir gıda maddesidir. Salep çoğu zaman toz formda satışa sunulur. Toz salebin temel bileşimi nişasta ve glukomannan olduğu için taklit veya tağşiş edilebilir nitelikte bir ürün söz konusudur. Diğer yandan pahalı olması sebebiyle de sıvı veya toz formda salep üreten firmalar ürünlerinde saf salebi çok az miktarlarda kullanırlar. Salep aynı zamanda, koruma altında olan (herhangi bir formunun ihracatı yasak olan) bir üründür. Henüz toz formda bir gıda ürününde salebin varlığını veya miktarını tespit etmeyi sağlayacak lisanslı bir yöntem mevcut değildir.

Bu tez çalışmasında salebe özgü tanılama imkanı sağlayacak genetik markerlerin tespiti için bütünsel yaklaşımla türe özgü RAPD parçalarından ve ayrıca ITS2 bölgesi DNA dizilerinden spesifik marker geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Gen havuzu olarak salep üretiminde kullanılan cinsleri içeren kuru ve yaş yumru salep örnekleri kullanılmıştır. ITS2 bölgesi dizilerinden faydalanarak tasarlanan primerler seti kullanılarak, ticari salep ürünleri ve tağşiş/dolgu/katkı amaçlı kullanılan diğer maddeler test edilmiştir. Gerçekleştirilen klasik PZR analizi ile tasarlanan bu markerler salebin tespitinde kullanılabilmiştir. Gerçek zamanlı PZR denemeleri tasarlanan ITS2a spesifik primer çifti ile 18SrRNA evrensel primer çifti kullanılarak yürütülmüş ve kalibrasyon eğrisi oluşturularak primerlerin PZR verimlilikleri belirlenmiştir. Patates nişastası veya mısır unu ile toz salepten izole edilen DNA kalıpları gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiş ve uygulanan yöntemlerin duyarlılığı ve uygulanabilirliği araştırılmıştır. Miktar belirlemeye yönelik yöntem geliştirme çalışmalarında farklı miktarlarda patates nişastası ve salep içeren paçallardan elde edilen DNA ile ΔΔCt metodu kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiş, yöntemin doğruluğu belirlenmiş ve son olarak ticari örnekler test edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Salep, Tağşiş, ITS2, Gerçek zamanlı PZR, *Orchidaceae*

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL

Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ

Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN

ABSTRACT

STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR THE DETECTION OF SALEP

EDA KABACAOĞLU

PhD. Thesis in FOOD ENGENEERİNG

Supervisor: Assit. Prof. Barçın KARAKAŞ BUDAK

January 2018, 96 pages

Salep, is a non-cultivable product which is obtained by collecting tubers of the Orchidaceae plants from the wild. Following various processes the tubers are available for consumption as a highly valued food ingredient. Salep is most often marketed in powder form. As the main components in salep are glucomannans and starch, it is a powder material which may be mimicked or adulterated. Original salep finds high market value thus, manufacturers of commercial salep powders or drinks use very little of the original ingredient, adding starch or gums as bulking agents. On the other hand, salep is a product protected under the law (export of salep in any form is strictly prohibited). There is presently no method to test the presence of salep in a food powder or to evaluate salep authenticity.

The aim of this study is the determination genetic marker(s) that may be used in detection, determination and authentication of salep. To this end, with a holistic approach, RAPD fragments were obtained for the development of SCAR markers. Additionally, specific primers designed from the ITS2 locus were analyzed. Tuber samples representative of genera used in salep production were used to construct the gene pool. Methods were validated by testing against a collection of salep samples as well as possible adulterants/bulking agents/additives. Sequences of the ITS2 region were utilized in designing a primer set which could be used in real time PCR experiments to obtain a calibration curve that could be applicable for quantification. The sensitivity of the developed methods were validated by testing with powder salep mixtures mixed with predetermined amounts of starch or corn flour in real time PCR set up with designed ITS2a specific primers and 18S rRNA universal primers.

KEYWORDS: Salep, Adulterant, ITS2, Real-time PCR, *Orchidaceae*

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL

Prof. Dr. Aydın TÜRKEÇ

Asst. Prof. Dr. Hatice İKTEN

ÖNSÖZ

Salep oldukça kıymetli doğal varlıklarımızdan biridir. Geleneksel olarak gıda amaçlı tüketilen ve sadece doğadan toplama usulüyle elde edilebilen bu ürünün sürdürülebilir şekilde üretimi henüz ticari ölçekte mümkün olamamış, ekonominin temel kuralı doğrultusunda da yüksek kıymet atfedilen bu ürünün arz edilen miktarındaki azalma ürünün maddi değerinin her geçen gün artmasına sebep olmuştur. Bulduğu yüksek değer nispetinde de taklit ve tağşişe açık bir ürün halini almıştır toz salep. Bu tespitten yola çıkarak toz salep için bu maddeyi diğer toz gıda ürünlerinden ayırmada kullanılabilecek bir yöntem geliştirme düşüncesiyle yola çıkılan bu tez çalışması ile salepte otantisitenin ortaya konulmasında kullanılabilecek marker bölgelerin araştırılması hedeflenmiştir.

Tez çalışmasının başlangıç aşamasında yaprak örnekleri ile çalışılması düşünülse de DNA izolasyon çalışmalarında farklı materyallere ihtiyaç duyulduğu görülmüştür. Salep yüksek seviyede su tutucu ve jel oluşturucu özellikte bir materyal olduğu için DNA izolasyonunda farklı izolasyon yöntemleri denenerek toz ve yumru salepten izolasyon için en uygun yöntemin belirlenmesi sağlanmıştır. Hem genel bir yaklaşım olarak ortak RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) dizilerinden, hem de spesifik yaklaşım olarak ITS2 (internal transcribed spacer 2) dizilerinden faydalanarak tasarlanan primer çiftleri ile çok sayıda orkide bireyi ve salep örneğinde denemeler yapılmıştır. Sonuç olarak tağşişte kullanılabilecek materyallerde negatif sonuç veren, ancak salepte büyük ölçüde ve tutarlı şekilde amplifikasyon sağlayan primer çifti belirlenmiştir. Bu primerler ile miktar tespitine yönelik çalışmalar da yürütülmüştür.

TÜBİTAK TOVAG-114O197 numaralı ve "Salep İçeriğinin Tespiti için Moleküler Marker Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar" başlıklı proje, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiş ve Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür. Tez çalışmasında kaynak sağlayan TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunar ve çalışmaların sonucu elde edilen bilgilerin, orkidegiller ve salep üzerinde moleküler çalışmalar yürüten ve/veya salep üretim yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çabaları olan araştırmacılar için olduğu kadar salep kullanan gıda endüstrisi yetkilileri ve denetleme kuruluşlarında görevli kişiler için de faydalı olmasını dilerim.

Doktora tez çalışması süresince öncelikle bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Barçın KARAKAŞ BUDAK'a ve değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet İNAN, Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN ve Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e çok teşekkür ederim. Ayrıca biyolojik örneklerin toplanmasında/tanılanmasında sundukları katkılar için Akdeniz Üniversitesi'nde görevli Doç. Dr. İsmail Gökhan Deniz'e ve sağladıkları *O. sancta* ile *S. vomeraceae* taze yumru örnekleri için ETAE'ne (Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İzmir) teşekkür ederim. Son olarak desteğini ve yardımını esirgemeyen Yeliz YILMAZ, Selcan Sevinç SOLAK, Mete YİĞİT, Semiramis GEREDELİ, Gürkan YILMAZ ve diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma, ayrıca maddi, manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Enver, annem Ayşe, kardeşim Derya KABACAOĞLU ve Einari PAAKKANEN'e sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım

.

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum "**SALEP İÇERİĞİNİN TESPİTİNDE KULLANILABİLECEK MOLEKÜLER MARKER GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

03/Ocak/2018

Eda Kabacaoğlu

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ v
AKADEMİK BEYAN vi
SİMGELER VE KISALTMALAR ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xvi
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK TARAMASI 3
2.1. Salep; Genel Bilgiler ve Mevcut Durum 3
2.2. İşlenmiş Gıdalarda Tağşişin Tespiti ve Moleküler Teknikler 4
2.3. Salepgiller Üzerine Yapılmış Seçilmiş Moleküler Araştırmalar 6
3. MATERYAL VE METOT 9
3.1. Örneklerin Toplanması 9
3.2. DNA İzolasyonu ve Analizi 10
3.3. RAPD analizleri 12
3.4. ITS2 Dizilerinden Faydalanılarak Doğrudan Marker Geliştirme Çalışmaları 12
3.5. Genel DNA Teknikleri 12
3.5.1. Agaroz jel elektroforezi 12
3.5.2. DNA miktarının tayini 13
3.5.3. PZR 13
3.5.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması 14
3.5.5. Transformasyona uygun hücrelerin hazırlanması 15
3.5.6. DNA ligasyonu ve transformasyon 15
3.5.7. Transformantların görüntülenmesi 15
3.5.8. Plazmid DNA izolasyonu ve transformantların doğrulanması 16
3.5.9. Primerlerin sentezlenmesi ve DNA dizi analizi 16
3.6. Gerçek Zamanlı PZR Analizleri ve Miktar Belirleme Çalışmaları 17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 20
4.1. DNA İzolasyonu 20
4.2. RAPD Çalışmaları 22
4.3. ITS2 Bölgesi İçin Tasarlanan Primerleri ile Yürütülen Çalışmalar 35

4.4. Gerçek Zamanlı PZR (qPZR) 42
4.4.1. ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftlerinin qPZR reaksiyon verimliliğinin belirlenmesi 42
4.4.2. Aynı miktarda salep ve tağşiş materyali (patates nişastası) ile yürütülen qPZR denemesi 49
4.4.3. Salep ve nişasta toz karışımlarından elde edilen DNA örnekleri ile yürütülen qPZR denemeleri 53
4.4.4. Mısır unu ve salep DNA'sı kullanılarak kantifikasyon eğrilerinin elde edilmesi 59
4.4.5. Salep ve patates nişastası toz karışımlarından elde edilen DNA örnekleri ile yürütülen qPZR denemeleri ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplamaları 63
4.4.6. Ticari salep örneklerinin analizleri 67
5. SONUÇ 68
6. KAYNAKLAR 70
7. EKLER 75
ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: yüzde
°C	: santigrad derece
∞	: sonsuz
bç	: baz çifti
Ct	: eşik döngüsü (threshold cycle)
Dev	: devir
dk	: dakika
g	: yer çekimi ivmesi (gravitational force)
kbç	: kilobaz çifti
mg	: miligram
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
mM	: milimolar
nm	: nanometre
sn	: saniye
T_m	: erime sıcaklığı, primer eşleşme sıcaklığı
U	: ünite

Kısaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BLAST	: Basic Local Allignment Search Tool
BSA	: sığır serumu albümini (bovine serum albumen)
cDNA	: komplementer deoksiribonükleik asit
CTAB	: cetiltrimetilamonyum bromid (cetyltrimethyl ammonium bromide)

dNTP : deoksinükleotid trifosfat

dsDNA : çift iplikçikli DNA (double stranded)

EDTA : etilen diamin tetra asetik asit

ETAE : Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü

HK : hesaplanan konsantrasyon

ITS : internal transcribed spacer

LB : Luria Bertani

LOD : tespit sınırı (Limit of Detection)

LOQ : miktar belirleme sınırı (Limit of Quantification)

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NTC : kalıpsız kontrol (no template control)

PVP : polivinil pirollidon

PZR : polimeraz zincir reaksiyonu

qPZR : gerçek zamanlı (kantitatif) PZR

RAPD : random Amplified Polymorphic DNA

RNA : ribonükleik asit

SCAR : Sequence Characterized Amplified Regions

SS : standart sapma

TAE : Tris-Asetat-EDTA

VK : varyasyon katsayısı

ITS : transkribe edilen internal ara bölge (internal transcribed spacer)

Tezde ondalık yazım kullanılımında virgül (,) ondalık ayıracı kullanılmaktadır.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Genomik DNA'da ITS bölgelerinin şematik gösterimi (Focke vd. 2011) 7

Şekil 2.2. Orkide türleri ve tağşiş/katkı maddeleri ITS2 dizileri arasındaki homoloji. ITS2 veri-tabanından sağlanan dizilerin homoloji grafiği DNAMAN programı ile elde edilmiştir 8

Şekil 4.1. DNeasy® mericon™ Food DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak elde edilen DNA ve OPA01 RAPD primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 21

Şekil 4.2. Farklı yöntem ve materyalden elde edilen çeşitli DNA'lar ile OPA01 ve OPA02 RAPD primerlerinin meydana getirdiği PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü 21

Şekil 4.3. OPA01 primeri ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünleri (Çizelge 4.2'de verilen DNA örnekleri kullanılmıştır) 23

Şekil 4.4. OPA01 ile Çizelge 4.4'te verilen kalıp DNA'lar kullanılarak elde edilen RAPD PZR ürünleri 26

Şekil 4.5. OPA20 ile Çizelge 4.4'te verilen kalıp DNA'lar kullanılarak elde edilen RAPD PZR ürünleri 26

Şekil 4.6. OPA20 ile elde edilen RAPD PZR ürünleri ile yürütülen jel **a)** ve aynı jelin kesim sonrası görüntüsü **b),** 1. ETA2 (*Serapias vomaraceae*), 2. C17 (*Orchis italica*), 3. Y6 (*Orchis anatolica*), 4. Ba01, 5. Ba16, 6. C23 (*Ophrys classica*), 7. C22 (*Ophrys classica*), 8. Tağşiş (Ta8:buğday nişastası), K. Kontrol 27

Şekil 4.7. *EcoRI* endonükleazı ile kesilmiş plasmidler 28

Şekil 4.8. *Eco*RI endonükleazı ile kesilmiş plasmidler 28

Şekil 4.9. *EcoRI* ve *HindIII* endonükleazları ile kesilmiş plasmidler 29

Şekil 4.10. BA01 ile elde edilen RAPD amplikon dizisi 29

Şekil 4.11. C17 ile elde edilen RAPD amplikon dizisi 30

Şekil 4.12. C22a ile elde edilen RAPD amplikon dizisi 30

Şekil 4.13. C22b ile elde edilen RAPD amplikon dizisi 30

Şekil 4.14. C22c ile elde edilen RAPD amplikon dizisi 31

Şekil 4.15. NCBI BLASTn veritabanı ile elde edilen C17 homoloji değerlendirmesi (üstte) ve filogenetik ağaç (altta) 31

Şekil 4.16. C17, C22 ve Ba01 örneklerinden elde edilen kalıp DNA ile **a)** C17-1-F/R primerleri ve **b)** C22-F/R primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü 32

Şekil 4.17. OPB04 primerleri ve Çizelge 4.6'da verilen örnek seti ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü 34

Şekil 4.18. OPB15 primerleri ve Çizelge 4.6'da verilen örnek seti ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü 34

Şekil 4.19. OPB19 primerleri ve Çizelge 4.4'te verilen örnek seti ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü 35

Şekil 4.20. OPB serisi primerler ile elde edilen ürünlerin klonlama için saflaştırılması için yürütülen jel elektroforezi **a)** ve jelden kesim sonrası **b)** görüntüler 35

Şekil 4.21. ITS2aF/R primerleri ile gerçekleştirilen PZR denemesi sonrasında yürütülen agaroz jel görüntüsü. Jelde, 1-34 no.lu kuyucuklara yumru örnekleri; 35-49 no.lu kuyucuklara tağşiş materyali örnekleri ile elde edilen PZR ürünleri yüklenmiştir 37

Şekil 4.22. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü **a)** ITS2a F/R primer çifti ve **b)** 18S rRNA F/R primer çifti; 1. *Serapias* sp. (A3)., 2. *Orchis sancta* (ETA1), 3. *Gymnadenia stiriaca* (C11), 4. *Orchis italic* (C13), 5. *Orchis italica* (C17), 6. *Orchis morio* (C18), 7. *Orchis mascula* (C19), 8. *Ophrys classica* (C22), 9. *Orchis anatolica* (Y2), 10. *Orchis anatolica* (Y5),11. Tic1, 12. Tic2, 13, Tic3, 14. Keçi boynuzu zamkı, 15. Guar zamkı, 16. Guar zamkı, 17. Arap zamkı, 18. Pektin, 19. Patates nişastası, 20. Buğday nişastası, 21. Öğütülmüş makarna, 22. Yağsız süttozu, 23. Toz konyak, 24. Konyak taze yumrusu, 25. Toz tarçın, 26. Mısır nişastası, Kontrol (C) 37

Şekil 4.23. ITS2aF/R primerleri ile C13 örneğinde çoğaltılan parçaya ait dizi analizi sonucu 38

Şekil 4.24. ITS2aF/R primerleri ile C13 örneğinde çoğaltılan parça için NCBI veritabanı taraması neticesinde elde edilen sonuç 38

Şekil 4.25. ITS2aF/R primerleri ile C13 örneğinde çoğaltılan parçaya filogenetik değerlendirme (NCBI veritabanı ile elde edilmiştir) 38

Şekil 4.26. PZR ürünlerinin saflaştırılması ardından elde edilen jel resmi, M:marker, 1:A3 *Serapias sp.*,2:C11 *Gymnadenia stiriaca,* 3:C13 *Orchis italica,* 4:C14 *Orchis italica,* 5:C18 *Orchis mario, 6:*C19 *Orchis mascula, 7:*C22 *Ophrys classica,* 8:Y2 *Orchis anatolica,*9:*Y5 Orchis anatolica* 39

Şekil 4.27. Transformasyon sonrası elde edilen klonların plaka görüntüsü. Plakalar üzerinde belirtilen numaralar (1-9) klonlanan fragment numarasına karşılık gelmektedir 39

Şekil 4.28. Koloni PZR agaroz jel görüntüsü. N: negatif kontrol (yalnız plazmid) K: PZR kontol 40

Şekil 4.29. Transformasyon yapılmış pJET 1.2 vektörünün *Bgl*II enzimi ile kesimi sonrası elde edilen görüntü. 1a-9c (180 bç ITS bölgesini ihtiva eden plazmid), Pa (pozitif kontrol-976 bç PZR ürünü ihtiva eden plazmid), N (negatif kontrol-yalnız plazmid), U: kesilmemiş plazmid 41

Şekil 4.30. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA seri dilüsyonları ile verdiği amplifikasyon grafiği 43

Şekil 4.31. ITS2a F ve R primer çifti için qPZR reaksiyon verimliliği ve elde edilen standart eğri 43

Şekil 4.32. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA dilüsyon serisi ile qPZR reaksiyon sonucunda elde edilen ürünlerinin %4 agaroz jel görüntüsü 44

Şekil 4.33. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep DNA seri dilüsyonları ile verdiği amplifikasyon grafiği 44

Şekil 4.34. 18S rRNA F/R primer çifti için qPZR reaksiyon verimliliği ve standart eğri 45

Şekil 4.35. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep DNA dilüsyon serisi ile qPZR reaksiyon sonucunda elde edilen ürünlerinin %4 agaroz jelde görüntüsü 45

Şekil 4.36. Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen çekirdek salep örnekleri 46

Şekil 4.37. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA'sı ile gerçek zamanlı PZR'de elde edilen amplifikasyon grafiği 47

Şekil 4.38. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA seri dilüsyonları ile oluşturduğu standart eğri 47

Şekil 4.39. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA dilüsyonu ile oluşturduğu realtime PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 48

Şekil 4.40. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep DNA kalıbı ile gerçek zamanlı PZR analizi sonucunda elde edilen amplifikasyon grafiği 48

Şekil 4.41. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep karışım DNA'sı seri dilüsyonu ile yürütülen PZR analizi sonucunda elde edilen standart eğri 49

Şekil 4.42. ITS2a F/R primer çifti ile Salep karışımı ve patates nişastası DNA karışımlarından elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon görünümü) 50

Şekil 4.43. 18S rRNA F/R primer çifti ile salep karışımı ve patates nişastasından izole edilen DNA karışımlarından elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon görünümü) 50

Şekil 4.44. ITS2a F/R primer çifti ile salep ve patates nişastası DNA'ları ile elde edilen paçalların kalıp olarak kullanıldığı PZR sonucunda elde edilen standart eğri.....51

Şekil 4.45. 18S rRNA F/R primer çifti kullanılarak salep karışımı ve patates nişastası DNA karışımların ile elde edilen standart eğri.....51

Şekil 4.46. ITS2a F/R primer çifti ile elde edilen erime eğrisi analizi.....52

Şekil 4.47. 18S rRNA F/R primer çifti ile elde edilen erime eğrisi analizi.....52

Şekil 4.48. Salep nişasta karışımlarından DNA izolasyonu sırasında alınan bir görüntü. Süpernatan alındıktan sonra kalan zamksı fraksiyon berrak bir sıvı olarak görülebilmektedir.....54

Şekil 4.49. Salep nişasta karışım DNA'larından ITS2a F/R primer çifti ile elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon göürnümü).....55

Şekil 4.50. Salep nişasta karışım DNA'larından 18S rRNA F/R primer çifti ile elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon görünümü).....55

Şekil 4.51. Salep nişasta karışım DNA'larından ITS2a F/R primer çifti ile elde edilen standart eğri.....56

Şekil 4.52. Salep nişasta karışım DNA'larından 18S rRNA F/R primer çifti ile elde edilen standart eğri.....56

Şekil 4.53. Salep nişasta karışım DNA'larından **a)** ITS2a F/R (85,3 °C) ve **b)** 18S rRNA F/R primer çiftler (85,5 °C) ile elde edilen PZR ürünlerine ait erime eğrisi (replikasyon görünümü).....57

Şekil 4.54. Salep-nişasta karışımında gerçek ve tahmin edilen salep oranları.....59

Şekil 4.55. Salep-mısır unu DNA karışımlarının (%1-100 arası salep DNAsı içeren mısır unu DNA'sı) **a)** ITS2a F/R ve **b)** evrensel 18S rRNA F/R primerleri ile qPZR amplifikasyon grafikleri (replikasyon görünümü).....60

Şekil 4.56. Salep-mısır unu DNA karışımlarının (%1-100 arası salep DNAsı içeren mısır unu DNA'sı) **a)** ITS2a F/R primer çifti ile ve **b)** 18S rRNA F/R primer çifti ile reaksiyonu sonucu çoğalan fragmentlerin erime eğrisi analizi.....61

Şekil 4.57. Mısır unu DNA'sı içine salep DNA'sı katılarak yapılan hilenin miktarını tahmin etmek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak çizilen kantitasyon eğrisi. Referans gen olarak 18S rRNA F/R kullanılmıştır.....62

Şekil 4.58. Salep-mısır unu DNA karışımlarına ait gerçek oranlara karşılık analiz yöntemi ile tahmin edilen salep oranları.....63

Şekil 4.59. Salep-patates nişastası toz karışımlarından elde edilen DNA'ların (%25-100 arası salep içeren patates nişastası) **a)** ITS2a F/R ve **b)** 18S rRNA F/R primerleri ile qPZR amplifikasyon grafikleri (replikasyon görünümü) 64

Şekil 4.60. Salep-patates nişastası toz karışımlarından elde edilen DNA'ların (%25-100 arası salep içeren patates nişastası) **a)** ITS2a F/R primer çifti ile ve **b)** 18S rRNA F/R primer çifti ile reaksiyonu sonucu çoğalan fragmentlerin erime eğrisi analizi 65

Şekil 4.61. Nişasta-salep karışımlarının analizi sonucu hesaplanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine karşılık %salep konsantrasyonlarının çizilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kuru yumru ve ticari toz salep örnekleri 9

Çizelge 3.2. Taze yumru ve sürgün örnekleri 10

Çizelge 3.3. RAPD primerleri ve Taq DNA polimeraz için PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları 14

Çizelge 3.4. PZR primerleri ve HotstarTaq master mix için kullanılan PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları 14

Çizelge 3.5. Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit ile hazırlanan reaksiyon içeriği 18

Çizelge 3.6. RotorGene Q cihazında gerçekleştirilen amplifikasyon ve erime analizi protokolü..... 18

Çizelge 4.1. Uygulanan farklı DNA izolasyon yöntemleri ve izolasyon sonucu elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri 20

Çizelge 4.2. RAPD analizlerinde kullanılan yumru örnekleri ve tağşiş/katkı materyali DNA'ları 22

Çizelge 4.3. OPA serisi primerler ile RAPD-PZR denemelerinin kullanılan, cins, tür ve kaynak sınıflandırması yapılan salep örnekleri ve beraberinde kullanılan tağşiş materyali. Örnek numaraları Ek 3'de verilen jellerde kuyucuk numaralarına karşılık gelmektedir..... 24

Çizelge 4.4. RAPD analizlerinde kullanılan DNA kalıpları 25

Çizelge 4.5. RAPD (OPA20) ile elde edilen sekanslardan tasarlanan potansiyel SCAR marker primer çiftleri..... 32

Çizelge 4.6. OPB serisinden 20 primer ile yürütülen RAPD-PZR için kullanılan DNA örnekleri listesi 33

Çizelge 4.7. ITS2aF/R primerleri ile gerçekleştirilen PZR denemesinde kullanılan DNA kalıpları..... 36

Çizelge 4.8. ITS2aF/R amplikonlarını barındıran klonlardan elde edilen dizileme sonuçları ve NCBI BLASTn değerlendirmesi 42

Çizelge 4.9 ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri ile salep-patates nişastası DNA karışımlarından elde edilen bazı qPZR verileri 53

Çizelge 4.10. Salep karışımı ve patates nişastası % karışımları ve konsantrasyonları 54

Çizelge 4.11. ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri ile salep-patates nişastası karışım DNA'larından elde edilen bazı qPZR verileri 58

Çizelge 4.12. Salep DNA miktar tayini için gerçekleştirilen qPZR için kesinlik ve doğruluk değerleri 62

Çizelge 4.13. Nişasta-salep karışımlarının analizi sonucu elde edilen değerler 66

Çizelge 4.14. Analiz edilen örneklerin hesaplanan değerleri ve verilerin değerlendirilmesi 67

Çizelge 4.15. Ticari toz salep örneklerinin kantitatif analiz sonuçları 67

1. GİRİŞ

Salep, ticari ölçekte yetiştiriciliği yapılamayan, doğadan toplanarak çeşitli işlemler sonrasında toz formda elde edilen ve çok yüksek fiyatlarla tüketiciye sunulan bir gıda maddesidir. Toz salebin temel bileşimi nişasta ve glukomannan olduğu için taklit veya tağşiş edilebilir nitelikte bir nihai ürün söz konusudur. Türkiyede çeşitli bölgelerde salebin toz formda saf olarak satıldığı salep borsaları bulunmaktadır. Diğer yandan pahalı olması sebebiyle de sıvı veya toz formda salep içeceği üreten firmalar ürünlerinde saf salebi çok az miktarlarda kullanmaktadır. Salep halen koruma altında olan (herhangi bir formunun ihracatı yasak olan) bir üründür. Salebin bileşimi itibariyle otantisitesini ortaya koyabilecek bir yönteme literatürde rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması ile salep içeriğinin teşhis edilmesinde ve miktarının belirlenmesinde kullanılabilecek moleküler marker ve bu markerin kullanıldığı yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada öncelikle kullanılacak materyal tedarik edilmiş, denemeler sonucu belirlenen uygun bir DNA izolasyon yöntemi ile genomik DNA izolasyon çalışmaları yürütülmüştür. Daha sonra, bu genomik DNA kalıplarından marker geliştirme çalışmaları iki şekilde ele alınmıştır; (1) RAPD ve SCAR analizleri ile genel yaklaşımlı marker geliştirme (2) ITS2 genomik dizisinden faydalanılarak özgün yaklaşımla marker geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Salebe özgü (spesifik) marker bölgelerden amplifikasyon sağlayan klasik PZR primerleri tasarlanarak bu yöntem salep örneklerine uygulanmıştır. Miktar belirleme yöntemi geliştirmek üzere, elde edilen sonuçlar doğrultusunda gerçek zamanlı PZR denemeleri yürütülmüştür. Geliştirilen marker primerlerinin kullanıldığı gerçek zamanlı PZR yöntemi salep tozlarında ve katkılarında uygulanmış ve yöntemin ölçüm hassasiyeti belirlenmiştir.

Salep borsalarında ‘gerçek salep’ veya ‘otantik salep’ tanımıyla çok yüksek fiyatlardan satışa sunulan kuru toz formda saf salep nişasta vb, maliyeti çok düşük olan diğer gıda katkı maddeleri ile tağşişe uğratılabilmektedir. Öte yandan salep içeceği olarak satılan ticari toz veya sıvı karışımlarda etiket içeriğinde salep ibaresi yer almakla birlikte, bileşimlerinde nişasta ve gamlar gibi pek çok dolgu maddesi de bulunmaktadır. "Salep" etiketi ile satıldığı için üreticiler az/eser miktarda da olsa ürün bileşimine salep ilave etmekle ve ilave edilen miktarı ürün etiketinde belirtmekle yükümlüdür. Bu gibi ürünlerin gerçekten salep içerip içermediğini ortaya koyabilecek bir test henüz geliştirilmemiştir. Diğer yandan, ülkemizde yumru, toz veya tablet (her türlü formda) salep ihracatı doğal kaynakların korunması amacıyla kanunen yasaklanmıştır. Gerekli olduğu durumlarda bir toz örneğin bileşiminde salep bulunduğunu ortaya koyabilecek bir ticari test bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen kapsamlı literatür taramasında bu konuda yapılmış herhangi bir araştırma sonucuna da ulaşılamamıştır. Bu çalışma kapsamında salep ürünlerinin kalite kontrolünde kullanılabilecek markerlerin ve test yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşmak için aşağıdaki spesifik hedefler ortaya konmuştur:

- Kuru yaprak, yaş yumru ve çekirdek salep (haşlanmış, ipe dizilmiş ve kurutulmuş yumru) olarak temin edilen salep örneklerinden, ayrıca tağşiş materyali ve gerçek salep olarak piyasada satılan toz ürünlerden genomik DNA izolasyonu

- Genomik DNA kalıp olarak kullanılarak yapılan RAPD ve SCAR analizleri ile monomorfik bantların tespiti ve moleküler marker geliştirilmesi (genel strateji/bütünsel yaklaşım)
- ITS2 bölgesinden tasarlanan spesifik primer çiftleri ile doğrudan primer/prob geliştirilmesi (özgün strateji)
- Geliştirilen markerler üzerinden tasarlanan primer çiftleriyle salep örneklerinden ve katkı maddelerinden elde edilen DNA örneklerinin kalıp olduğu PZR denemeleri
- Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılmak üzere primer çiftlerinin tasarlanması ve miktar belirleme çalışmaları
- Oranları bilinen salep-tağşiş materyali DNA'ları veya karışımları ile yapılan analizlerle klasik PZR ve qPZR yöntemlerinin miktar belirlemeye yönelik uygulanabilirliğinin araştırılması ve yöntemlerin validasyonu.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Salep; Genel Bilgiler ve Mevcut Durum

Salep bitkilerinin dâhil olduğu Orchidaceae familyasına ait 24 cins ve 90 kadar tür saptanmıştır. Salep sadece yumrulu orkidelerden elde edilebiliyor olsa da tüm yumrulu cinsler bu amaç için uygun değildir. Türkiye'de bulunan 9 cinse ait 25 orkide türü salep eldesi için değerlendirilmektedir. Sezik (1984) farklı bölgelerde (Muğla, Kastamonu ve Antalya) salep elde edilişinde bilhassa *Orchis* türlerinin (*Orchis anatolica, O. coriophora, O. italica, O. laxiflora, O. morio* vb), bunun yanında *Ophrys, Serapias* türleri ile *Anacamptis pyramidalis, Dactylorhiza romana* ve *Barlia robertiana* kullanıldığını belirtir. Aynı kaynakta ovoid yumrulu salep türleri arasında *Himantoglossum* türleri de sayılmaktadır. Sezik vd. (2007) Muğla, Kastamonu, Kahramanmaraş ve civarında salep elde edilen türler için sundukları çizelgelerde yine aynı cins ve türleri vermişlerdir. Ülkemizin birçok bölgesinde doğal olarak yetişmekte olan bu türlere ait toprak altı organları (yumrular) toplanarak yıkama, ipe dizme, su veya sütle kaynatma, kurutma gibi işlemler sonrasında yumru salep, bunların öğütülmesi ile de toz salep formunda elde edilir. Elde edilen ürün hem sıcak içecek, dondurma gibi ürünlerde gıda hammaddesi olarak, hem de sağlığı korumaya yardımcı etkilerinden ötürü bir drog olarak tüketime sunulur (Tanker vd. 2007; Arslan 2011). Toplama doğal yetişme alanlarından yapılır ve bilinçsiz ve aşırı toplama sonucunda doğal varlığımız olan orkide türlerinin yok olması tehlikesi söz konusudur (Erzurumlu ve Doran 2011). Kreutz ve Çolak (2011) orkide türlerimizin yok olmakla karşı karşıya olduğuna dikkat çeker ve sebeplerini net olarak açıklar. Orkidelerin doğal yayılışları ile ilgili çok sayıda araştırma mevcuttur (Sezik ve Özer 1983, 1988; Altan vd. 2007; Sezik 2007; Aybeke vd. 2010) ve doğal ortamlarının dışında kültüre alınabilmesine yönelik çalışmalar da devam etmektedir (Gümüş ve Ellialtıoğlu 2012; Çağlayan vd. 1998; Gönülşen vd. 1996). Orchidaceae için yapılan taksonomik sınıflandırmalar için Türkiye damarlı bitkiler florası için hazırlanan en güncel ve kapsamlı eser Güner (2012)'dir. Tez çalışmasında kullanılacak orkide örneklerinin isimlendirilmesinde bu kaynak kitap esas alınmıştır.

Salebin temel bileşiminde bulunan başlıca besin maddelerinin glukomannanlar (gam/müsilaj) ve nişasta olduğu belirtilebilir. Farklı bölgelerden elde edilen saleplerin %12-44 oranında müsilaj, % 8-19 oranında nişasta içerdiği belirtilmektedir (Sezik vd. 2007; Tamer vd. 2006). Tekinşen ve Güner (2010) yaptıkları araştırmada farklı türlerden elde edilen saleplerin bileşimi arasında önemli farklılıkların olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada analiz edilen 10 farklı türden örneğin glukomannan içeriği %18-%55; nişasta içeriği %5-38; protein içeriği ise %3-5 protein; %1-2 kül; %9-11 su olduğu bildirilmiştir. Salep içeriğinin ayrıca toplama dönemine göre de farklılık gösterdiği bilinmektedir. Kimyasal bileşim analizi ile bir tozun saf salep (Orchidaceae) olup olmadığını ortaya koyabilecek bir test mevcut değildir (Kasparek ve Grimm 1999).

Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliğine göre (2013/12) Salep "Çiçeklenmesini tamamlamış Orchidaceae familyasına dahil yumru bağlayan farklı cins ve türlere ait toprak orkidelerinin yumrularının tekniğine uygun olarak temizlenip su veya sütte haşlandıktan sonra kurutulup öğütülmüş veya öğütülmemiş halini" şeklinde tanımlanmaktadır. Bu tebliğin 5. maddesine göre baharata ve baharat karışımlarına ürünlerin kendi doğasından gelen nişasta hariç olmak üzere nişasta, irmik, razmol,

kepek ve benzeri dolgu maddeleri katılamayacağı belirtilmiştir. Yine bu tebliğede baharatın fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre öğütülmüş ve öğütülmemiş salepte yabancı madde bulunamayacağı, rutubetin en çok %9, kuru madde bazında toplam külün %1,9'u ve %10'luk HCI'da çözünmeyen külün %0,2'i geçmemesi gerektiği belirtilmiştir (Anonim 2013). Bu tariflere göre, saf salep olarak satışa sunulacak bir üründe dışardan ilave edilen herhangi bir nişasta vb. katkının bulunması tağşiş olarak değerlendirilir.

29/12/2011 tarihli ve 28257 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği gereğince gıda maddelerinin etiketlenmesinde uyulması gerekenler kurallar belirtilmiştir (Anonim 2011a). Buna göre; toz formda "salep" olarak satılacak bir üründe veya etiketi üzerinde kelime, resim veya grafik olarak "salep" vurgulandığı taktirde gıdanın "salep benzeri ürünle" karışmasına engel olan ana bileşenin (yani gerçek salebin) net miktarının etiket üzerinde belirtilmesi zorunludur (bkz. Madde 22). 18/9/2009 tarihli ve 27353 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan İhracı Yasak ve Ön İzne Bağlı Mallara İlişkin Tebliğde (İhracat 96/31) Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ (Tebliğ No: İhracat 2009/11) gereğince Orchidaceae (salep) türlerinin yumru ve droglarının da (toz, tablet ve her türlü formda) ihracatı yasaktır (Anonim, 2011b). Bundan da öncesinde 20/09/1988 tarihli Resmi Gazete'de yayınlanan tebliğ ile salep (Orchidaceae), ihracat amacıyla doğadan sökümü yasak olan yabani çiçek soğanları arasında belirtilir (Anonim 1989). Buna rağmen Türkiye'nin yılda 45 ton salep ihraç ettiği tahmin edilmektedir (Kreutz ve Çolak 2011). Kasparek ve Grimm (1999) 1991 yılında Almanya'ya ihraç edilen 2,113 kg salebin kabaca 3-4 milyon orkide yumrusuna tekabül ettiğini belirtmişlerdir. Aynı yayında 1993 yılında Türkiye'nin toplam 75,119 kg salep ihraç ettiği bilgisine yer verilmiş ve kesin olarak yasaklanmış olsa da Türkiye'de bu hususta hukuki yaptırımların uygulanmadığı belirtilmiştir. Hossain (2011), Türkiye'nin en önde gelen ve en iyi kalitede salep ihraç eden ülke olduğunu belirtmiştir. Son yıllarda Türkiye sınırları içindeki orkide sayısının azalmasına bağlı olarak iran gibi komşu ülkelerden yıllık 5.5–6.1 milyon orkidenin hasat edilerek Türkiye ihraç edildiği bildirilmiştir (Ghorbani vd. 2017)

Türkiye'de salebin yoğun olarak toplandığı çeşitli bölgelerde salep borsaları mevcuttur. Türkiye'nin başlıca salep borsasının Burdur'un Bucak ilçesinde olduğu ve buradan tüm Türkiye'ye salep ticareti yapıldığı bilinmektedir. Bu borsalarda salep, kalitesine de bağlı olarak, değişken fiyatlarla satışa sunulmaktadır. İnternet üzerinden ve farklı illerdeki aktarlardan elde edilen saf toz salep fiyatları kg başına 350-1000 TL civarında olduğu belirlenmiştir. Salep içeceklerinin imalatında farklı gıda katkıları dolgu malzeme olarak kullanılmaktadır. Bu dolgu maddeleri için fiyat örneği vermek gerekirse; guar gam 9-18 TL/kg, mısır nişastası 5-10 TL/kg fiyatla satışa sunulmaktadır (Anonim 2017). Bu durum saf salebin tağşişini veya taklidini çok cazip kılabilmektedir. Nitekim Tamer vd. (2006) nişasta ya da sentetik aromolar gibi maddelerle salepte tağşiş probleminin olduğuna dair vurgu yapmışlardır. Sezik vd. (2007) salep benzeri ürünlerin üretimi için kullanılan bazı müsilaj maddeleri ve bunların özelliklerini belirtmişlerdir.

2.2. İşlenmiş Gıdalarda Tağşişin Tespiti ve Moleküler Teknikler

Gıdalarda tağşişin tespiti zorlu bir iştir ancak tüketicinin korunması ve yasal yaptırımların uygulanması açısından da büyük önem taşımaktadır (Primrose vd. 2010). Aldatıcı etiketleme, özellikle yüksek fiyatlandırma gerektiren katma değeri yüksek

gıdalar için çok sık karşılaşılan bir durumdur. Aldatmanın gerçekleştiğinin kesin şekilde ortaya konabilmesi için ise gıda bileşenlerinin tespiti ve miktarlarının belirlenmesi ile mümkündür (Woolfe ve Primrose 2004). Bu tip analizlerde kararlı izotop oranlarının, protein veya metabolik ürünlerin analizi gibi yaklaşımlar ile çeşitli gıdalarda tağşişin tespitine yönelik çalışmalar ve kimyasal/biyokimyasal yöntemler mevcuttur. DNA temelli yaklaşım gıdaların gerçekliğini (otantisitesini) ortaya koyabilmek için kullanılabilecek araçlardan biridir. DNA temelli gerçeklik analizlerinin yaklaşık 20 yıllık bir geçmişi vardır. Gıdanın otantikliğinin ortaya koyulabilmesi için DNA temelli yöntemlerde DNA dizilerinin eşsiz (unique) oluşundan faydalanılır. Bu yöntemlerin oturtulmasında karşılaşılan en büyük zorluklardan biri karmaşık gıda matrislerinden DNA'nın izolasyonu ile istenilen miktarlarda ve kalitede DNA temin edilebilmesidir (Woolfe ve Primrose 2004; Lockley ve Bradsley 2000). Salep ile ancak toprak altı organı olması ve kurutulmuş, öğütülmüş bir gıda olması ile benzerlik taşıyan zerdeçal için Remya vd (2004) DNA izolasyonu ve amplifikasyonu yaptıkları çalışmada hedeflenen iyi ve yüksek kalitede DNA izolasyonu sağlamış ve tekrarlanabilir PZR denemeleri gerçekleştirmiştir.

Gıdalarda tağşişin tespitine yönelik DNA temelli yöntemler geliştirilmiştir ve her geçen gün bunlara yenileri eklenmektedir. Genom seviyesinde farklılıkların ortaya konulabilmesini sağlayan belirleyici maddelerin, yani moleküler markerlerin geliştirilmesinde uygulanabilecek PZR temelli olan ve olmayan pek çok yöntem mevcuttur. Bunlar Agarwal vd. (2008) tarafından güncel bir derleme çalışmasında karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir. Bu yöntemlerin seçiminde genomik DNA dizi bilgisinin mevcudiyeti ve deneme maliyetleri önemli unsurlardır. Geliştirilmiş ve oturtulmuş PZR temelli yöntemler arasında çeşitli et türlerinin ve GDO soyanın tespiti ve miktarların belirlenmesi örnek olarak belirtilebilir (Woolfe 2004).

DNA parmak-izi yöntemleri ile ilgili kapsamlı bilgiler sunan güncel yayınlar mevcuttur (Sucher vd. 2012; Semagn vd. 2006; Weisling vd. 1995). Bu yöntemlerden RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ve SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) tez çalışması kapsamında kullanılması uygun görülen yöntemlerdir. RAPD prosedürü basitçe GC oranı %50'nin üzerinde olan 10 bazlık rastgele seçilmiş (arbitrary) primerlerin kullanıldığı PZR uygulaması olarak tarif edilebilir (Weisling vd. 1995; Bardakçı 2001).

RAPD gibi gelişigüzel marker tespit yöntemlerinden elde edilen bulgular daha duyarlı ve daha yüksek çözünürlüklü yöntemlerin (markerlerin) geliştirilmesinde değerlendirilir. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) rastgele tasarlanmış nükleotid dizilerine sahip primerlerle DNA'nın çoğaltılması ve jel analizi ile görüntülenmesi temeline dayanır (Arif vd. 2010). Çoğu zaman RAPD jellerinde gözlenen bantlar (markerler) dominant özelliktedir ve görüntülenen bantlar aynı lokuslardaki farklı genden (heterozygous) veya özdeş genlerden (homozygous) kaynaklanıyor olabilir. Nadir durumlarda farklı alellerde aynı lokustan çoğalan farklı büyüklükte kodominant RAPD markerleri de elde edilebilir. RAPD markerleri her ne kadar dominant markerler olsa da PZR koşullarındaki ufak değişiklikler farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilir ki bu da tekrarlanabilirliği düşürür. RAPD'lerin güvenilirliğini arttırmak ve bunları kodominant markerlere dönüştürmek için geliştirilen yöntemlerden biri SCAR'dır (Chaudhary 2012).

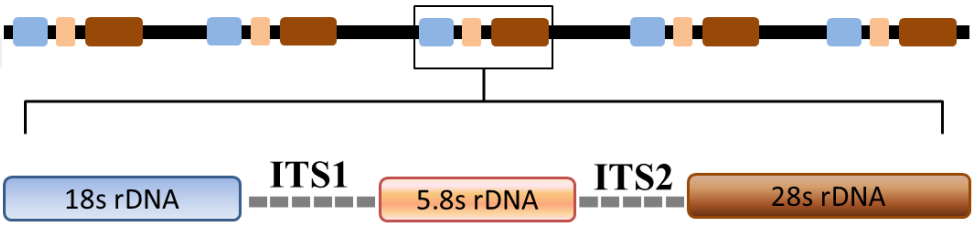
SCAR'lar genetik olarak tanımlanmış lokuslarda PZR yoluyla diziye özgü primerler yardımıyla çoğaltılan genomik DNA parçalarını temsil eden PZR temelli markerlerdir (Paran ve Michelmore 1993; McDermott vd. 1994). SCAR markerleri gelişigüzel çoğaltma ile gerçekleştirilen marker teknikleri ile (ör. RAPD) elde edilen DNA parçalarının klonlanarak dizilerinin belirlenmesi, sonrasında da diziye özgü 15-30 bç uzunluğunda primerlerin tasarlanmasına dayanır. SCAR tekniği parmak izi geliştirme, tanılama çalışmaları, çeşitli türler arasında genetik varyasyonların belirlenmesi gibi uygulamalar için kullanılır. Dhanya ve Sasikumar (2010) bir derleme çalışmasında moleküler markerler kullanılarak ticari ve zirai ürünlerde uygulanabilecek tağşiş tespit çalışmalarını özetlemiş ve SCAR yöntemine ve baharatlarda uygulamalarına değinmiştir. Toz zerdeçalda tağşişin tespiti amacıyla Dhanya vd. (2011a) SCAR yöntemini kullanarak aynı araştırma grubunca kırmızı toz biber ve karabiber için de tağşiş tespit çalışmaları yürütülmüştür (Dhanya vd. 2011b; Dhanya vd. 2009). Pafundo vd. (2007) zeytinyağı için, Dyaneshwar vd. (2006) *Phyllanthus emblica* Linn. için, Polashock ve Vorsa (2002) Amerikan kızılcığı çeşitleri için ve Parent ve Pagé (1998) ahududu çeşitleri için SCAR markerleri geliştirmişlerdir. SCAR markerleri aynı zamanda tarımsal öneme sahip bitki türlerinde genetik karakterizasyon (İkten vd. 2010) ve ekonomik kayıplara sebep olan bazı bitki hastalık/zararlılarına karşı dayanıklılık genlerini takip etmek amacıyla da geliştirilmiştir (Mutlu vd. 2008; McDermott vd. 1994; Paran ve Michelmore 1993). SCAR markerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR (qPZR) ile miktar ölçümü çalışmaları genellikle mikrobiyal ajanların varlığına yönelik araştırılmaktadır. Ancak Chaudhary vd. (2012) bir rozet çiçeği türlerinin ayrımında kullanılabilecek bir qPZR yöntemi geliştirmişlerdir.

2.3. Salepgiller Üzerine Yapılmış Seçilmiş Moleküler Araştırmalar

Orkideleri konu alan ve RAPD yönteminin uygulandığı çalışmaların amacının çoğunlukla genetik farklılıkları ortaya koymak olduğu söylenebilir. Chaudhary vd. (2012) RAPD markerlarını kullanarak Çin'de yetişen 5 Dendrobium türünü analiz etmişlerdir. Oliveira vd. (2010) ise 15 farklı primer seti ile gerçekleştirdikleri RAPD analizleri ile 56 adet Catasetum cinsinden orkide için 12 adet monomorfik marker bölge tespit etmişlerdir. Vasile vd. (2014) güneybatı Romanya'ya özgü Orchidaceae ailesinden bazı türler arasındaki genetik farklılıkları RAPD yöntemi ile ortaya koymuştur. Arı vd. (2004) 19 orkide türünden alınan yaprak dokularından izole edilen DNA ile RAPD yöntemini uyguladıkları benzer amaçlı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Araştırmacıların yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri jel görüntüleri incelendiğinde *Orchis*, *Ophrys* ve diğer bazı salep türlerinde aynı büyüklükte PZR ürünlerinin elde edilebildiği görülebilmektedir. Bu durumda, bantlar arasında homolog dizilerin tespit edilebilmesi halinde marker geliştirmede kullanılabilecek veriler sağlayabileceği düşünülebilir.

Proteinlerin kodlanmasında işlevi olmayan nükleer ribozomal (nr) DNA - internal transcribed spacer (ITS) bölgelerinin dizileri de, matK, rbcI, psbA-trnH, rpoC1 vb.'de olduğu gibi, bitkilerde tür seviyesinde tanılama amacıyla araştırılan genomik DNA bölgeleridir. ITS bölgelerinin şematik olarak gösterimi Şekil 2.1'de verilmiştir. ITS2 dizileri filogenetik sınıflandırmalar için 1990'lı yıllardan beri kullanılmaktadır. ITS2 bölgesinin tür bazında ayrım yapma yeteneğinin GenBank veri tabanı ITS2 girişleri üzerinden yapılan bir değerlendirme ile monokotlar için %74,2 oranında başarılı olabildiği hesaplanmıştır (Yao vd. 2010). ITS2, Fabaceae familyasından bitki türleri için

DNA barkodu olmaya aday genomik bölge olarak araştırılmıştır (Gao vd. 2010). Chen vd. (2010) ITS2 bölgesinin bitkilerde barkod olmaya aday en uygun bölge olduğunu belirtmiştir. Orkide türleri için de ITS bölgesi dizilerinin belirlenmesine dayalı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Devey vd. 2008; Soliva vd. 2001). Soliva vd. (2001), orkide türleri sistematiği için DNA dizilerinin kullanımı ile ilgili olarak ITS dizilerinin arasındaki homolojinin çiçek morfolojisindeki farklılığı yansıtmadığını belirtmiştir. Bu bulgu ITS bölgesinden tasarlanan orkide (salep) spesifik primerlerle çoğaltma yapılarak gıdada bulunabilecek diğer tağşiş unsurlarından ayırt edilebileceği fikrini desteklemektedir. Focke vd. (2011) 39 baharat için 18s,rDNA-ITS1-5.8s,rDNA-ITS2-28s,rDNA bölgesinden her bir baharata özgün primerler tasarlayarak bu baharatlar için genomik DNA amplifikasyonu ile tespite (identification) dayanan yöntem üzerine çalışmışlardır. ITS bölgesinden faydalanılarak pek çok tıbbi bitki için genom temelli marker geliştirme çalışması Sucher ve Carles (2008) tarafından özetlenmiştir.

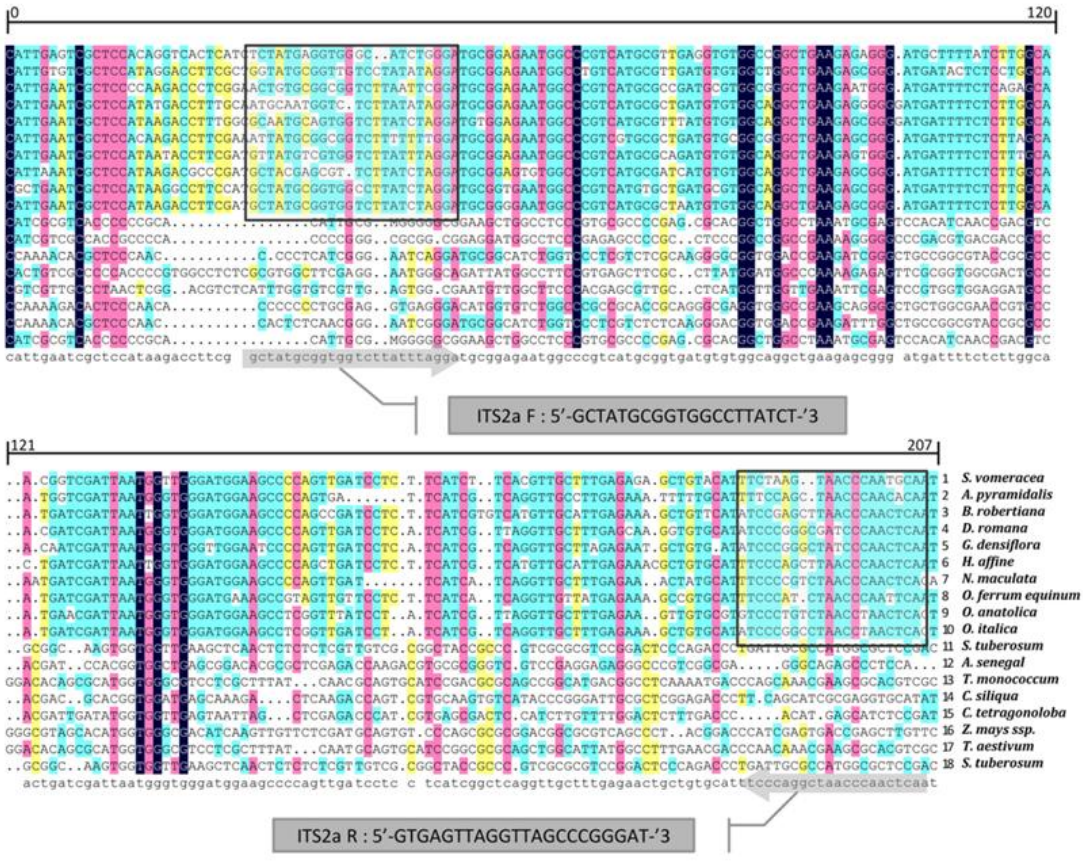


Şekil 2.1. Genomik DNA'da ITS bölgelerinin şematik gösterimi (Focke vd. 2011)

Nükleer ribozomal DNA (nrDNA) ökaryotlarda çekirdekte yer alan ribozomal DNA'nın kodlandığı bir bölgedir. Bu bölge peş peşe dizili 18S, 5.8S ve 28S rRNA genlerini ve bu bölgelerin kopyalarını içeren çoklu bir gen ailesi olarak tanımlanmaktadır. ITS bölgesi (internal transcribed spacers) kodlanmayan bir nükleer ribozomal DNA bölgesidir. 18S, 5.8S ve 28S rRNA genleri, doğrusal olarak düzenlenmiş bir ünite (kistron) oluşturmaktadır; buradaki özgün kodlama bölgeleri dahili kopyalama aralayıcı bölgeleri (ITS) ile birbirinden ayrılmaktadır (18S ve 5.8S genleri arasında ITS1 bölgesi, 5.8S ve 28S genleri arasında ITS2 bölgesi) (Wendel ve Alvarez 2003, Focke vd. 2011). Bitki ve hayvanlarda ITS2 sekans uzunlukları 195-510 bç aralığında değişmektedir. Çok sayıda tekrarlarının olması ve kısa bir bölge olması sebebiyle bozunmuş ya da çok seyreltik DNA örneklerinde dahi ITS bölgeleri verimli bir şekilde çoğaltılabilmektedir (Yao vd. 2010).

ITS dizileri için yapılan NCBI Genbank taramasında çok sayıda *Ophrys*, *Orchis*, *Serapias*, *Anacamptis* vb. türü için belirlenen ITS-1 ve ITS-2 dizisine ulaşılabildiği tespit edilmiş. Bunun da ötesinde internette serbest erişimi olan bir ITS2 veritabanı taranmış (http://its2-old.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/cgi-bin/its2.pl), ve burada farklı taksonlara ait ITS2 dizileri için daha fazla sayıda giriş olduğu görülmüştür. ITS2 veritabanından faydalanılarak Şekil 2.2'de verilen homoloji grafikleri elde edilmiştir. Bu grafiklerde kullanılan orkide türlerine (*Serapias vomeracea* AY014551.1, *Anacamptis pyramidalis* 1945632, *Barlia robertiana* Z94064.1, *Dactylorhiza romana* 47154942, *Gymnadenia densiflora* KP225186.1, *Himantoglossum affine* KU931659.1, *Neotinea maculata* Z94074.1, *Ophrys ferrum equinum* AM711829.1, *Orchis anatolica* HQ657131.1, *Orchis italica* Z94080.1) ait ITS2 dizileri ile muhtemel tağşiş/katkı

maddelerine (*Solanum tuberosum* KF022369.1(patates), *Acacia senegal* HQ605077.1(arap zamkı), *Triticum monococcum* KJ459878.1(buğday), *Ceratonia siliqua* AJ245576.1(keçi boynuzu zamkı), *Cyamopsis tetragonoloba* AF274687.1(guar zamkı), *Zea_mays ssp. mexicana* U46636.1 (mısır), *Triticum aestivum* AF438188.1(buğday), *Solanum tuberosum* KF022370.1) (patates)) ait diziler karşılaştırıldığında salep karışımlarına tağşiş amaçlı olarak ilave edilebilecek kaynaklar arasında fazla benzerlik olmadığı görülmektedir. Bunun yanında orkide türleri arasında yüksek bir benzerliğin olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumdan faydalanarak orkideye spesifik ITS2 primerleri tasarlanmıştır. Başka bitkisel ürünlerde ITS2 bölgesinden faydalanarak tür ayrımı (otantisite belirlemesi) amaçlayan yakın tarihli çalışmalara da ulaşılmıştır. Lin vd. (2012) *Sophora flavescens Ait*. için ITS2 bölgesinden faydalanarak PZR-RFLP markerleri geliştirerek 1:10 oranında karışık *S.flavescens*/*S.tomentosa* DNA örneklerinde tespit sağlayabilmiştir. Balasbramani vd. (2011) ise nükleer ribozomal DNA-ITS bölgelerinden elde ettikleri moleküler markerler ile ayurvedik bir bitkisel ürün olan 'vidari' için tespit yöntemi geliştirmiştir.



Şekil 2.2. Orkide türleri ve tağşiş/katkı maddeleri ITS2 dizileri arasındaki homoloji. ITS2 veri-tabanından sağlanan dizilerin homoloji grafiği DNAMAN programı ile elde edilmiştir

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışma kapsamında ilk olarak farklı Orchidaceae cinslerine ait silika jel içinde muhafaza edilen kuru yaprak örneklerinin kullanılması öngörülmüştür. Ancak, bu örneklerden izole edilen DNA miktar ve kalitesinin çalışma açısından yeterli seviyede olmaması nedeniyle yaş yumru ve kuru yumru salep örnekleri tedarik edilerek çalışmalar sürdürülmüştür (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2). Ayrıca, ETAE'den (Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İzmir) taze/kuru yumru olarak *Orchis sancta* ve *Serapias vomeraceae* türü taze yumrular (10'ar adet) sağlanmıştır. Marker geliştirme çalışmalarında negatif kontrol örnekleri olarak salep katkılamada kullanılması muhtemel tağşiş örnekleri olarak guar zamkı, keçiboynuzu zamkı, mısır nişastası, patates nişastası, buğday nişastası, konyak tozu, tarçın, yağsız süttozu ve pektin tedarik edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kuru yumru ve ticari toz salep örnekleri

Örn. No.	Örnek kodu	Toplandığı İl	Notlar
1.	BU01	Sinop	Safranbolu, Sinop civarı
2.	BU02	Manisa	-
3.	BU03	Sivas	Beşçatal
4.	BU04	Antalya	Elmalı, Antalya
5.	BU05	Kastamonu	-
6.	BU06	Manisa	Çayır salebi
7.	BU07	Kastamonu	-
8.	BU08	Maraş	Çöp salep, Andırın, Maraş
9.	BU09	Samsun	-
10.	BU10	Muğla	-
11.	BU11	Burdur	Bucak, Burdur
12.	BU12	Antalya	Toros salebi, Akseki, Antalya
13.	BU13	Adana	Pozantı, Adana
14.	BU14	Muş	-
15.	BU15	Diyarbakır	-
16.	BU16	Yozgat	Akdağ, Yozgat
17.	BU17	Manisa	Turgutlu, Manisa
18.	BU18	Erzincan	-
19.	BU19	Mardin	-
20.	BU20	Sivas	Beşçatal
21.	Ticari1	-	Toz salep, Tic1
22.	Ticari2	-	Toz salep, Tic2
23.	Ticari3	-	Toz salep, Tic3
24.	Ticari4	-	Toz salep, Tic4

Çizelge 3.2. Taze yumru ve sürgün örnekleri

Örnek kodu	**Tür Adı**	**Notlar** (Tarih,Yer)
Y5	*Orchis anatolica*	2015, Burdur
Y32	*Ophrys sp.*	2015
C12	*Orchis italica*	2015, Kaş-Uğrar
C13	*Orchis italica*	2015, Kaş
C16	*Orchis italica*	2015, Kaş
C17	*Orchis italica*	2015, Kaş-Uğrar
C12	*Gymnadenia stiriaca*	2015, Kaş
C11	*Gymnadenia stiriaca*	*2015, Kaş*
C15	*Orchis italica*	2015, Kaş
C19	*Orchis mascula*	2015, Kaş-Uğrar
C14	*Orchis italica*	2015, Kaş-Uğrar
C26	*Ophrys* sp.	2015, Kaş
C25	*Ophrys* sp.	2015, Kaş-Uğrar
C21	*Ophrys epicopalis*	2015
C20	*Ophrys dinarica*	2015
C18	*Orchis morio*	2015
Y6	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
Y2	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
C22	*Ophrys classica*	2015
C23	*Ophrys classica*	2015
C24	*Ophrys sphegodes*	2015, Kaş-Uğrar
ETA1*	*Orchis sancta*	2015, ETAE
ETA2*	*Serapias vomaraceae*	2015, ETAE
B1-B20**	-	2015, Bartın
A1	*Ophrys ferrum equinum*	2014
A2	*Orchis anatolica*	2014
A3	*Serapias* sp.	2014

* Ege Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü (ETAE) tarafından salep bitkilerinin kültüre almayı amaçlayan bir proje sonucu üretilen türlerdir.
** Karadeniz Bölgesinden elde edilen 20 adet taze yumru örneği temin edilmiştir.

Kuru yumru (çekirdek) salep örneklerinin öğütülmesi: Çekirdek salep oldukça sert yapıda bir materyaldir. Havan, bıçaklı öğütücüler veya farklı manuel öğütme işlemleri ile bu örneklerin homojen toz forma dönüştürülmesi mümkün olamamaktadır. Çok sert ve öğütülmesi zor olan kuru salep yumrularının toz hale getirilebilmesi ve yumruların öğütülmesi için TissueLyser II (Quiagen) ekipmanı ile bilyalı çelik kavanoz adaptöler (Retsch) kullanılmıştır. Örnekler 2-4 dk süre ile 30 Hz'de toz haline getilirmiştir.

3.2. DNA İzolasyonu ve Analizi

DNA izolasyonu için öncelikle araziden toplandıktan sonra silika jel içerisinde kurutulmuş yaprak örnekleri ve salep yumru örnekleri kullanılmıştır. Kuru yapraklardan izolasyonu iyileştirmek üzere CTAB (cetiltrimetilamonyum bromid) -PVP (polivinil pirollidon) yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca örneklerin sıvı azot ile öğütülerek homojen

hale getirilmesi denenmiştir. Farklı yöntemler kullanılarak ve tekrarlı olarak gerçekleştirilen çok sayıda izolasyon ve PZR denemesi sonucunda, kuru yaprak örneklerinden elde edilen DNA'nın aşırı fragmante olduğu ve çalışmalarda kullanmaya uygun kalitede olmadığı anlaşılmıştır. Hem DNA miktar ölçümleri, hem yürütülen PZR denemeleri ile bu durum kesinleşmiş ve dolayısıyla yumru salep örneklerinden DNA izolasyonu yapmaya karar verilmiştir. Bu örneklerin yanı sıra mümkün olduğunca fazla sayıda yaş salep yumrusu örneğine ulaşılmıştır. Bunlardan DNA izolasyonu için de farklı yöntemler denenmiş, elde edilen DNA örneklerinin kalitesi ve miktarı belirlenerek PZR denemeleri ile test edilmiştir. Tez çalışmalarında uygulanan DNA izolasyon yöntemleri aşağıda özetlenmiştir.

CTAB yöntemi: Doyle ve Doyle'un (1987) yöntemine göre yapılan bu izolasyonda taze ya da kurutulmuş örnekler 20-200 mg olacak şekilde tartılarak 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır. Taze doku örnekleri ezme çubuğu ile 100 µl %2'lik CTAB çözeltisi (%CTAB cetiltrimetilamonyum bromid; 100mM TrisCl pH8; 20 mM EDTA; kullanmadan hemen önce %0,2 β-mercaptoethanol ilave edilir) eklenerek ezilmiş ve üzerine 400 µl daha CTAB ilave edilmiştir. Kuru toz halindeki örneklere ise doğrudan 400 µl %2'lik CTAB çözeltisi eklenmiştir. Sıvı azot kullanılarak parçalanan örneklere ise 500 µl CTAB çözeltisi eklenmiştir. Örnekler 65 °C'de 2 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve üzerlerine 500 µl kloroform-izoamil alkol karışımı (24:1) eklenerek emülsiyon elde edilene kadar alt üst edilerek karıştırılmıştır. Bu işlem ardından karışım 11.000 dev/dk'da 20 dk santrifüj edilerek üst faz yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 350 µl soğuk izopropanol eklenmiştir. Karışım, içindeki DNA kümeleninceye kadar alt üst edilmiş ve -20 °C'de bir gece bekletilmiştir. Örnekler 5 dk 10.000 dev/dk'da santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet, %70 etanol ile 3 dk 10.000 dev/dk'da santrifüj edilerek yıkanmıştır. Sıvı kısım atılarak örnekler oda sıcaklığında 30 dk kadar kurutulmuş ve 50-100 µl TE tamponu ya da su içinde çözündürülmüştür.

CTAB-PVP yöntemi: Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen ancak modifiye edilen bu protokolde CTAB yöntemi aynen uygulanmış olup DNA ekstraksiyonu sırasında problem yol açan fenolik bileşiklerin yok edilmesi amacı ile %2'lik CTAB solüsyonu içine %1'lik PVP ilavesi yapılmıştır.

Modifiye CTAB yöntemi (Protocol 1): Swetha vd (2014) göre modifiye edilen bu yöntemde yaş yumrudan 1 g, kuru toz yumrudan 0,25 g olacak şekilde örnekler tartılmış ve üzerlerine 5 ml %2 CTAB solüsyonu eklenerek tüp dikkatlice vortekslenmiştir. Karışıma 10 ml CTAB ekstraksiyon tamponu (10mM Tris, 20 mM EDTA, 3 M NaCl, %5 CTAB, %1 PVP, %0,3 β-mercaptaetanol) eklenmiş ve tüpler 400 dev/dk çalkalama ile 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler soğutulup ardından aynı hacimde chloroform - izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve 1200 *g*'de 15 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrar edimiş ve oluşan temiz faz yeni tüpe alınarak hacimce 1:3 oranında 3 M sodium asetat ve hacimce 2:3 oranında kloroform-izoamilalkol karışımı (24:1) eklenerek 1200 *g*'de 15 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan sıvı dökülürmüş ve pellet üzerine -20 °C'de bekletilen izopropanol eşit miktarda eklenerek 1 gece -20 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün karışım 4500 *g*'de 20 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet %70 etanol ile 3 kere yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. DNA çökeltisi 1-3 ml saf su ile çözündürülmüştür.

Enzimle DNA ekstraksiyonu: DNA izolasyonunda mucopolisakaritlerden kaynaklanabilecek sorunları bertaraf etmeyi amaçlayan bu yöntemde enzimatik degredasyon yapılmaktadır. Bunun için Meyer vd (2001) keçiboynuzu ve guar zamkı üzerine gerçekleştirdiği çalışmada kullanılan yöntem bazı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Örnekler, β-mannanase (1000 U, kaynak *Cellvibrio japonicus* Megazyme, İrlanda) ve termostabil α-glukosidaz (3000 U, kaynak *Bacillus stearothermophilus*, Megazyme, İrlanda) enzimleri ile ekstraksiyon öncesi muamele edilmiştir. Örneklerin ön muamelesi için; yalnız β-mannanaz içeren, hem α-galaktosidaz hem de β-mannanaz içeren, sadece enzim tamponu içeren ve hiç enzim içermeyen olmak üzeren 4 farklı yöntem uygulanmıştır. Temin edilen enzimler üreticinin talimatları doğrultusunda BSA içeren uygun fosfat tamponları içerisinde çözündürülür. Örnekler 100 mg olacak şekilde tartılır. Örneklerin üzerlerine içerisinde 60 µl β-mannanaz (250 U/ml), 60 µl α-galaktosidaz (150 U/ml), 880 µl enzim tamponu (0,1 M tris-Cl, 20 mM EDTA pH 4,5) bulunan 1 ml enzim solüsyonu eklenir. Tüpler dikkatlice vortekslenerek 40 °C'de 15 dk ve 18 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon ardından sıvı DNeasy® mericon™ Food DNA ve NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel, Almanya) DNA ekstraksiyon kitleri ile üretici firmaların talimatları doğrultusunda optimize edilmiş DNA ekstraksiyon işlemine devam edilir. Ayrıca, CTAB yöntemi ile de izolasyon yapılmıştır.

DNA izolasyon kitlerinin kullanımı: Kitlerin kullanılmasında üretici firmanın talimatlarına uyulmuştur. Bu amaçla DNeasy® mericon™ Food DNA ekstraksiyon (Qiagen, CA, ABD) kiti, NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel, Almanya) kiti, GeneJet Plant Genomic DNA purification Mini (Thermo Scientific, MA, ABD) kiti ve MagJet Plant Genomic DNA (Thermo Scientific, MA, ABD) kiti ile denemeler yürütülmüştür.

3.3. RAPD analizleri

RAPD analizi için 10-mer rastgele primerler ile salep ve tağşiş DNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı PZR gerçekleştirilmiştir. RAPD için 40 rastgele primer kullanılmıştır (OP-A ve OP-B serileri, Operon Technologies, primer dizileri Ek 1a'da verilmiştir). PZR, 50µl hacimde ve kullanılan polimeraza uygun karışım ve programla gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri etidiyum bromür ilave edilmiş %1,5'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.4. ITS2 Dizilerinden Faydalanılarak Doğrudan Marker Geliştirme Çalışmaları

Bilinen DNA dizileri ile salebe spesifik amplifikasyon yapan ITS2 primerleri tasarlanarak klasik PZR ile test edilmiştir. ITS2 bölgesi (Şekil 2.2) için ITS2F1 ve ITS2R1 (sırasıyla 5'-GCTATGCGGTGGCCTTATCTA-3' ve 5'-GTGAGTTAGGTTAGCCCGGGAT-3' primerleri tasarlanmıştır (Ek 1b).

3.5. Genel DNA Teknikleri

3.5.1. Agaroz jel elektroforezi

Total genomik DNA örneklerinin kalitesi, PZR ürünlerinin varlığı, restriksiyon endonükleazlarının etkisi gibi araştırmalarda örnekler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır. Uygulamalar yürütülen DNA'ların büyüklüklerine göre %1, %1,5, %2

veya %4'lük agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanırken, 1xTAE tampon çözeltisine (Tris-Asetat-EDTA, 40 mM Tris, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA) gerekli oranda agaroz (SeaChem, FMC Bioproducts, ME, ABD) ilave edilmiş ve mikrodalga fırın yardımıyla ısıtılarak çözündürülmüştür. Bu çözeltiye 1 µl/50 ml etidiyum bromür çözeltisi (10 mg/ml, Invitrogen, CA, ABD) ilave edilerek, karışımın uygun ebatta ve şekilde seçilen kalıplara (jel kasedine) dökülmesi ve katılaşmasıyla jel elde edilmiştir. Jel kuyularına yüklenecek örnek 5:1 oranında 6X DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) jel yükleme tamponu ile karışıtılmış, gerekli görüldüğü hallerde ultra saf su ile seyreltilerek toplam 10-20 µL hacimde hazırlanmıştır. Jel 1X TAE tampon içinde tutularak örnekler kuyulara yüklenmiştir ve elektroforez uygulaması ile örnekler jel içinde uygun doğru akım altında, 40-120 dk süreyle yürütülmüştür. Agaroz jel içinde molekül ağırlıklarındaki farka göre bantlara ayrılan DNA molekülleri etidiyum bromür varlığında UV (312 nm) ışınları altında turuncu ısıma verdiği için kurulan dijital kamera sistemi (Vilber Lourmant E-Box-VX2) ile görüntülenebilmiştir. Bu işlemde DNA standardı olarak O'GeneRuler^{TM} 1 kb Plus DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder, low range DNA Ladder ve ultra low range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır. Elektroforez çalışmalarında kullanılan DNA standartları Ek 2'de verilmiştir.

3.5.2. DNA miktarının tayini

Çift sarmal DNA yoğunluğu (miktarı) Quant-iT™ dsDNA assay kit (Molecular Probes®, Invitrogen, CA, ABD) yardımıyla Qubit™ (Invitrogen, ABD) flourometresi kullanılarak belirlenmiştir. Fluorometrede 510 nm uyarma ve 527 nm emisyon filtreleri kullanılmıştır. Tedarikçi firmanın talimatları doğrultusunda öncelikle içinde Quant-iT reaktifi ve tamponu bulunan çalışma solüsyonu hazırlanmış ve standart olarak 100 ng/ µL DNA ve 0 ng/ µL DNA 190 µL çalışma solüsyunu içinde 10 µL olacak şekilde iki adet dilüsyon hazırlanmış ve cihaz kalibre edilmiş. Ardından hedef DNA miktarı 199 µL çalışma solüsyonu içinde 1 µL DNA olacak şekilde hazırlanan dilüsyon ile tayin edilmiştir.

Genomik DNA yoğunluğu ve kalitesinin ölçümleri için mikro-hacim ve küvet ile ölçüm yapabilen UV-Vis Spektrofotometre sistemi olan Nanodrop 2000 Mikro-Hacim UV-Vis Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) cihazı ile DNA kalitesi ve yoğunluğu belirlenmiştir. Genomik DNA saflık oranının hesapları 260/280 nm ve260/230 nm'de yapılmıştır.

3.5.3. PZR

PZR için TGradient® (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Almanya) ısı döngü cihazı (thermocycler) ve Applied Biosystems ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) cihazı kullanılmıştır. PZR karışımı için HotstarTaq DNA Polymerase Master Mix (Qiagen, Hilden, Almanya) ve Taq DNA Polymerase, Recombinant (5 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kitleri kullanılmıştır. Yürütülen çalışmada PZR analizlerinde kullanılan primerler ve bunlara ait bazı özellikler Ek1'de verilmiştir.

PZR cihazında dizilerin uzaması basamağı için verilen asgari süre (elongation time), oluşması beklenen parçanın kbç cinsinden büyüklüğüne ve DNA polimeraz

enzim kitinin kullanım talimatlarına bağlı olarak belirlenmiştir. Kapak sıcaklığı tepkime süresince 99 °C, tepkimeler sonrasında tüplerin bekletileceği sıcaklık ise 4 °C olarak ayarlanmıştır. Kullanılan PZR ısı döngü cihazında tepkimede kullanılacak primer çiftinden en düşük erime sıcaklığına sahip olan primerin bağlanma sıcaklığının (T_m) ±5 °C olarak programlanmıştır. PZR öncesinde tüplerin sürekli buz üstünde tutulmasına özen gösterilmiştir. PZR denemelerinde kullanılan ısı döngü programı 1 kere 35 döngü içeren düz program olmuştur. Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te uygulanan ısı döngüsü programları verilmiştir. Kullanılan cihazın ısıtma bloğu sıcaklık gradienti sağlayabilir özellikte olduğu için PZR denemelerinde T_m ± 5 °C aralığında reaksiyonlar gerçekleştirilerek PZR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR işleminin kontrolü için primer çiftleri ile elde edilen PZR ürünleri agaroz jelde 1X TAE tamponu içinde yürütmüştür. Uygulanan sıcaklık gradientinde en yoğun bandı veren sıcaklık (T_m) optimum bağlanma sıcaklığı olarak belirlenmiş ve daha sonra yapılan PZR uygulamalarında her primer çifti için ayrı olarak belirlenmiş optimum bağlanma sıcaklığı kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. RAPD primerleri ve Taq DNA polimeraz için PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre(dk:sn)	Döngü komutu
1	94	04:00	35 kere 4'ten 2'ye git
2	94	01:00	
3	(T_m) ±5	00:45	
4	72	02:00	
5	72	10:00	
6	4	∞	

Çizelge 3.4. PZR primerleri ve HotstarTaq master mix için kullanılan PZR ısı döngü programı için süre ve sıcaklık koşulları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü komutu
1	95	02:00	35 kere 4'ten 2'ye git
2	95	00:20	
3	(T_m) ±5	00:10	
4	72	00:10	
5	72	10:00	
6	4	∞	

3.5.4. PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılması işlemlerinde MinElute PZR purification kit (Qiagen, CA, ABD) kullanılmış olup üretici firmanın talimatları doğrultusunda analiz gerçekleştirilmiştir. Elüsyon işlemi 10-50 µl 10 mM tris (pH 8) ile yapılmıştır.

PZR ürünleri gerekli görüldüğü durumlar da jelde yürütülüp amplikon bandı kesilerek jel ortamından uygun tampon içine özetlenmiştir. PZR her bir DNA örneği için 50 µl karışım olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Seçilen örnekler %0,8'lik agaroz

ile hazırlanmış jelde yürütülmüştür. Agaroz jelde her kuyucuğa 50 µl yüklenerek elektroforez gerçekleştirilmiştir. Jelden kesim 360 nm dalga boyunda çalışan kesim kutusunda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için MinElute Gel Extraction Kit (Quigen, CA, ABD) kullanılmıştır.

3.5.5. Transformasyona uygun hücrelerin hazırlanması

Escherischia coli XL-blue hücreleri kimyasal olarak kompetent (transformasyona uygun) hale getirilmiştir. Bunun için hücreler LB agar besiyerinde 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiş ve tek koloniden 3 ml LB sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon 37 °C'de 250 dev/dk çalkalamalı inkübatörde gece boyu sürdürülmüş ve 0,5 ml kültür karışımı 50 ml LB sıvı besiyerine tekrar ekilmiştir. İnkübasyon, OD_{600} 0,4 oluncaya kadar yaklaşık 3 saat inkübasyona devam edilmiştir. Kültür karışımı 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınmış ve 20 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra 4 °C'de 3000 dev/dk'da 10 dk santrifüj edilmiş ve oluşan pellet, buz üzerinde bekletilmiş 15 ml 0,1 M $CaCl_2$ içinde çözündürülerek buz üzerinde 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler tekrar 4 °C 3000 dev/dk'da 10 dk santrifüj edilerek buzda bekletilmiş 2 ml 0,1 M $CaCl_2$ içinde %15 gliserol olacak şekilde ayarlanmış 2 ml 0,1 M $CaCl_2$ karışımı ile çözündürülmüştür. Bu karışım 1,5 ml lik eppendorf tüplere içinde 100 µl olacak şekilde bölüştürülmüş ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.6. DNA ligasyonu ve transformasyon

DNA parçalarının transformasyonunda CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır. TA ucu ihtiva eden PZR ürünleri üretici firmanın talimatlarına göre DNA blunting enzimi ve 2X reaksiyon tamponu ile 70 °C'de küt uçlu hale getirilmiş ve ardından 50 ng plazmid vektör ve vektör/hedef gen DNA parçasının molar oranları 1:3 ile 1:5 oranları arasında olacak şekilde hedef gen parçası, steril su ile 20 µl hacmine getirilen karışımda 20 dk 22 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Kimyasal transformasyona uygun bakteri hücrelerine yapılan gen aktarımı için buz üstünde tutulan hücrelere 6-10 µL ligasyon karışımı doğrudan ilave edilmiştir. Tüpe hafifçe vurularak karışma sağlandıktan sonra 20 dk kadar buz üzerinde bekletilmiş ve hücreler ani olarak 42 °C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 60 sn tutulup ısı şokuna maruz bırakılmış, tekrar buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüpe 200µl sıvı LB Lennox sıvı besiyeri ilave edilerek 1 saat süreyle 37 °C'de 250 dev/dk çalkalamalı kabinde inkübasyon yapılmıştır. Hücre süspansiyonu, 1 saat öncesinden 37 °C'de inkübatöre alınan 100 µg/mL ampisilin içeren LB Lennox agar petrilerine yayma yöntemle ekilmiştir. Petriler bir gece 37 °C'de üremeye bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak gen ihtiva etmeyen plazmid, pozitif kontrol olarak ise kit içinde bulunan 976 bç parçalık bilinen bir PZR ürün kullanılarak hücrelere transformasyon yapılmıştır.

3.5.7. Transformantların görüntülenmesi

Plazmidlere DNA fragmanlarının aktarımı plazmitte bulunan direnç genleri sayesinde kontrol edilebilmiştir. Aktarılan plazmid sayesinde antibiyotik direnci kazanan (transformasyon +) *E. coli* hücreleri LB besiyerlerinde gelişebilmiştir. Bu amaçla negatif kontrol olarak yalnız plazmid transformasyonu yapılmış *E. coli* hücreleri, pozitif kontrol olarak ise kiti içerisinde bulunan 976 bç uzunluğundaki DNA

fragmanın plazmide transforme edildiği *E.coli* hücreleri kullanılmıştır. Transformantlar ampisilin içeren LB Lennox katı besiyerlerinde gece boyu inkübe edilmiştir. Buradan seçilen koloniler plazmid izolasyonu yapılmak üzere tekrar ampisilin içeren LB Lennox sıvı besiyerine ekilerek gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.8. Plazmid DNA izolasyonu ve transformantların doğrulanması

Transformantların doğrulanmasında bir ön aşama olarak ampisilinli LB Lennox besiyerinde geliştirilen kolonilerden 6. saatte 1 µl alınarak HotstarTaq DNA polymerase Master mix (Qiagen, Hilden, Almanya) kiti kullanılarak toplam 30 µl hacimde PZR analizi gerçekleştirilmiştir. Burada doğru parçayı taşıdığı düşünülen transformantlardan plazmid izolasyonu NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel Co., Düre, Almanya) purifikasyon kit ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bunun için 37 °C'de 18-24 saat geliştirilmiş bakterilerden 1,5-3 ml kültür örneği santrifüjlenerek pelet olarak ayrılan organizmalardan plazmidler izole edilmiştir. Plazmid DNA kalitesi agaroz jelde yürütülerek kontrol edilip ardından DNA miktarı belirlenmiştir.

Plazmid izolayonu ardından DNA'nın kesilmesinde Fermentas FastDigest (Thermo Scientific, MA, ABD) restriksiyon enzimleri ve tamponları üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Enzimler plazmid haritalarına bakılarak belirlenmiştir. Kesim işlemi için, kullanılan DNA'ya bağlı olarak endonükleazın kullanım talimatları doğrultusunda 1-5 µg DNA içeren tüpe toplam hacim 20-50 µl olacak şekilde 10X endonükleaz tamponu ve enzim(ler) ilave edilmiş, karışım 37 °C'de 5-60 dk tutulmuştur. Kesimin doğrulanmasının kontrolü ve DNA kalitesi agaroz jelde yürütülerek belirlenmiştir.

3.5.9. Primerlerin sentezlenmesi ve DNA dizi analizi

Dizi analizlerinin Orta Doğu Teknik Üniversitesi yerleşkesinde bulunan dizi analiz merkezince (RefGen Gen araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara, Türkiye) ve Ankara'da bulunan BM-Labosis (BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti., Ankara, Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu merkeze 100ng/µL konsantrasyonda gönderilen örneklerde dizi tespiti DNA dizi analizi cihazında konukçu plazmide uygun dizi analiz primer çiftiyle gerçekleştirilmiştir.

GenBank veritabanının bulunduğu BLAST tarama motoru (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ve ITS2 Database tarama motoru (http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/) kullanılarak elde edilen dizi verileri homolog dizilimlerle kıyaslamalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca dizilim verilerinin incelenmesi, primerlerin tasarlanması gibi bazı araştırmalarada DNAMAN 5.2.2 versiyonu (Lynnon Corporation, Quebec, Kanada), SnapGene (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, ABD), FinchTV (version 1.4.0, Geospiza, Seattle, WA, ABD), Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, AnnArbor, MI, ABD) bilgisayar programlarından faydalanılmıştır. Tasarlanan primerlerin sentezlenmesi REFGEN (RefGen Gen araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara, Türkiye) ve BM-Labosis (BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti., İzmir, Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir

3.6. Gerçek Zamanlı PZR Analizleri ve Miktar Belirleme Çalışmaları

Geleneksel PZR yöntemlerinde çoğalan hedef dizi genellikle agaroz jel elektroforezi boyunca amplikon ile birleşerek DNA sarmalları arasına giren florasan boya kullanılarak tespit edilir. Gerçek zamanlı PZR analizlerinde ise her PZR döngüsünde amplikonların oluşumu esnasınsa tespit edilir. Bunun gerçekleşmesi için genellikle 2 yol vardır, birinci yol çift sarmal DNA arasına giren boyalar kullanmak SYBR green gibi PZR reaktifi olarak eklenen boyalar her PZR döngüsünde oluşan amplikonlar ile birleşir. SYBR Green I, qPZR'de en sık kullanılan dsDNA'ya özgü boyadır. Yapısal olarak dsDNA'ya özgü asimetrik bir siyanin boyasıdır. SYBR Green I, diziye bağımsız olarak ds-DNA'nın küçük yivine bağlanır. Bağlanma eğilimi etidyum bromidinkinden 100 kat daha fazladır. 480 nm dalga boylu mavi ışık ile uyarılabilir ve emisyon spektrumu, 520 nm'de maksimum olan fluoresceininkine kıyaslanabilir. Bağlanan boya ışıması serbest boyadan 1000 kat daha yüksektir ve bu nedenle, PZR sırasında amplifikasyon birikimini izlemek için çok uygundur. Gerçek zamanlı olarak izlendiğinde, polimerizasyon basamağında gözlemlenebilen flüoresan sinyalinde bir artışa neden olur ve DNA denatüre edildiğinde düşer. Sonuç olarak, her PZR döngüsünün uzama basamağının sonunda fluoresans ölçümleri yapılmalıdır. Ancak bunun gibi cift sarmal DNA ile birleşen boyalar, reaksiyon sırasında oluşan spesifik olmayan DNA çift sarmallarınada bağlanabilmektedir. Bundan dolayı genellikle PZR analizi sonunda hedef gen için erime eğrisi analizi yapılarak spesifik erime noktası tespit edilir. Bu erime noktası sıcaklığı oluşan amplikonların baz komposizyonuna ve uzunluğuna bağlıdır ve bu nedenle her amplikon için spesifiktir. Erime eğrisi analizi boyunca amplikon sıcaklığı kademeli olarak yükseltilir ve çift sarmal DNA'nın denature olduğu erime noktasında sadece çift sarmal DNA'ya bağlanabilen florasan boyaların ışımasında keskin bir artış gözlenir. Erime eğrisi analizlerinde, PZR boyunca hedef DNA ve spesifik olmayan amplikonlar yada primer-dimer formasyonları dolayısıyla ortaya çıkan florasan ışımalar temin edilir. Erime eğrisi analizinin dezavantajları arasında amplifikasyon prosesi bitimi sonrası yapılması gerekliliği ve sonuçların deney esnası sırasında görüntülenememesidir. Ancak birçok gerçek zamanlı PZR analizi genellikle 30-40 döngü sonrası 40 dk içinde biter ve erime eğrisi analizi bu PZR programı ile otomatik olarak birleştirilerek aynı reaksiyon serisinde birkaç dakikada gerçekleştirilir. Bu yöntem, hedefe spesifik floresan problara olan ihtiyacı ortadan kaldırır ve bu nedenle herhangi bir hedef gen için herhangi bir primer çifti ile kullanılabilir ve kullanımı daha ucuz hale getirilebilir (Grant ve Amar 2013).

Gerçek zamanlı PZR analizleri için bu çalışmada Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, CA, ABD) ve Rotor-Gene Q (Qiagen, CA, ABD) gerçek zamanlı PZR sistemi kullanılmıştır. Çalışmada spesifik primer çifti olarak ITS2a-F ve R primer çiftleri, dahili kontrol olarak ise 18S rRNA R ve F evrensel primerleri (Soares vd. 2013) kullanılmıştır (Primer dizileri Ek1b'de detaylandırılmıştır.).

Primerin reaksiyon verimliliği ve primer setlerinin spesifite ve hassasiyet testleri yapılmıştır. Reaksiyonların kurulumunda QIAgility (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları Rotor-Gene Q 5plex HRM (Qiagen, CA, ABD) cihazında gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazının yazılımı (version 2.0.3) (Qiagen, CA, ABD) ile analiz edilmiştir. qPZR reaksiyonlar Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (400, Qiagen, CA, ABD) ile kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Örnek DNA'lardan hedef bölgelerin amplifikasyonu kalıp

DNA, 2X Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix (HotStarTaqPlus DNA polymerase, SYBR Green boyası, dNTP karışımı, nükleaz ari su) ve her bir primerden 300 nM içerecek şekilde toplam 10-30 µL hacimde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5). Primerin reaksiyon verimliliği ve primer setlerinin spesifite ve hassasiyet testleri yapılmıştır. Reaksiyonların kurulumunda QIAgility (Qiagen, CA, ABD) kullanılmıştır

Çizelge 3.5. Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit ile hazırlanan reaksiyon içeriği

Reaksiyon karışımı	**Miktar**	**Son konsantrasyon**
2x Rotor-Gene SYBR Green Master Mix	12,5 µl	1x
Primer karışımı (herbirinden 10 mµ)	1,9 µl	0,75 µM Forward primer 0,75 µM Reverse primer
RNase-free water	9,6 µl	-
DNA (>100ng/µl)	1 µl	>100 ng/reaksiyon
Toplam hacim	25 µl	

Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan 2 basamaklı PZR programı Çizelge 3.6'da verilmiştir. Erime eğrisi analizi için, sıcaklık her 5 saniyede bir 1°C'lik sıcaklık artışıyla 60 °C'de 95°C'ye kadar arttırılmıştır. Reaksiyonlarda 72 veya 36 kuyucuklu karuseller kullanılmış ve bunlara uygun olarak 0,2 ml ve 0,1 ml'lik gerçek zamanlı PZR tüplerinden yararlanılmıştır.

Çizelge 3.6. RotorGene Q cihazında gerçekleştirilen amplifikasyon ve erime analizi protokolü

Basamak	**Koşullar**
Denaturasyon	95 °C'de 5 dakika
40 döngü tekrarı	Basamak 1 @ 95°C, 5 sn
	Basamak 2 @ 60°C, 10 sn
Erime analizi	@ 60-95 °C, her 5 sn'de 1 °C sıcaklık artışı

Çalışmada kullanılan primerler klasik PZR ile spesifiteleri kontrol edilmiş ve ardında gerek zamanlı PZR analizleri gerçekleştirilerek PZR amplifikasyon verimlilikleri belirlenmiştir. PZR reaksiyon verimliliği PZR reaksiyonu sırasında amplifikasyon hızının yüzde olarak (diğer bir ifade ile amplikonun çoğalma hızının) ifade edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Buna göre PZR reaksiyonun verimliliği %100 (ya da 1) olması, amplikon miktarının her döngüde 2 kat artması olarak ifade edilebilir. Reaksiyon verimliliği veriler Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazının yazılım programı (version 2.0.3) (Qiagen, CA, ABD) vasıtasıyla, gerçek zamanlı PZR analizlerinde DNA konsantrasyonunun logarima değerlerine karşılık çizilen Ct değerleri ile elde edilen standart eğriler kullanılarak belirlenmektedir. Verimliliğin hesaplanması için $E= (10^{-1/eğim}-1)x100$ eşitliği kullanılmaktadır. Eğimin -3,32 değerinde olması %100 reaksiyon verimi anlamına gelmektedir. Herbir primer çiftinin reaksiyon verimliliğinin

belirlenebilmesi için orkideye özgü ITS2 bölgesine ait ITS2a F/R primerlerin ve 18S rRNA F/R primerlerinin salep DNA dilüsyon serisi ile, qPZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. DNA'ların dilüsyon serisi, konsantrasyonları ölçülen genomik DNA'ların nükleaz arı su ile 4'er kat 5 kez seyreltilmesi ile elde edilmiştir. qPZR reaksiyon sonucunda çizdirilen standart eğrilerden reaksiyon verimlilik değerleri elde edilmiştir. Standart eğri eğimi -3,6≤M (-3,32)≤-3,1 değerleri arasında olan, reaksiyon verimliliği ise %90-%110 (0,9-1,1) arasında ve R^2 değeri ≥0,98 olan primer çiftleri ve reaksiyon koşulları ile deneylere devam edilmiştir.

Geliştirilen yöntemler için yapılan LOD ve LOQ hesaplamada kullanılan formüller sırasıyla LOD=(SS/eğim) × 3 ve LOQ=(SS/eğim) × 10 şeklindedir. Bu hesaplamalarda, geliştirilen yöntem kullanılarak analiz edilen en düşük miktardaki örneğe ait verilerden elde edilen standart sapma değeri kullanılmıştır (Taverniers vd. 2004).

ΔΔCt metodu, bir bağıl miktar belirleme metodu olup popüler birçok gerçek zamanlı PZR analizi yazılım paketlerinde sıklıkla bulunmaktadır. Eşik döngüsü (the threshold cycle, Ct) floresan seviyesinin belirli bir miktara (eşiğe) eriştiği noktadır. Bu metot hedef ve referans örneklerdeki bağıl gen ekspresyonunun hesaplaması için, referans geni normalizör olarak kullanılarak, qPZR sisteminde oluşturulan Ct bilgisini, doğrudan kullanmaktadır (Livak ve Schmittgen 2001; Rao vd. 2013). Gerçek zamanlı PZR normalizasyonuna dayalı kalibrasyon eğrisinin kurulması, güvenilir bir kantitatif analiz için gereklidir çünkü bu işlem ekstraksiyon verimindeki varyasyonları ve amplifikasyon verimini kontrol eder. Endojen kontrol, hedef gen içeriğine bağlı olarak ya da DNA degredasyonu, inhibisyon ya da örneklerden elde edilen DNA miktarı ve kalitesi farklılığı gibi diğer faktörlere bağlı olarak, türe özgü primerlerde amplifikasyon varyasyonlarının bulunması durumunda doğrulamaya imkân verir. Örnek olarak, işlem görmüş et ürünleri genellikle bitkisel kaynaklı içeriğe sahiptir ve farklı işlem uygulamaları hedef gen amplifikasyonuna etki edebilmektedir, endojen kontrolün kullanımı bu varyasyonaları kontrol altında tutmaya olanak tanımaktadır.

Bu amaçla ΔΔCt metodunun uygulanmasında kalibrasyon modelinin inşasıda ikili model karışımlarının amplifikasyonu yoluyla sırasıyla ITS2 F/R and 18SrRNA F/R primer çiftlerinin PZR ürünleri için, elde edilen Ct_{ITS2} and $Ct_{18SrRNA}$ eşik döngülerinden ($2^{(-\Delta\Delta Ct)} = 2^{(CtITS2-Ct18SrRNA)}$) hesaplanma yapılması önerilmektedir. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin yüzde salep miktarına karşı çizilmesi ile elde edilen grafik, kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasını mümkün kılmaktadır. Bu yaklaşım, Türkiye'nin 20 farklı bölgesinden toplanan salep yumrularından hazırlanan temsili salep örneğinden, patates nişastasına eklenen salep miktarının (%25, %75, %90, %95, %98 ve %100) hesaplanmasına olanak sağlamaktadır. Analizlerde hesaplamalar, gerçek zamanlı PZR cihazı üreticisinin talimatları doğrultusunda cihaz beraberinde gelen yazılım kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyonu

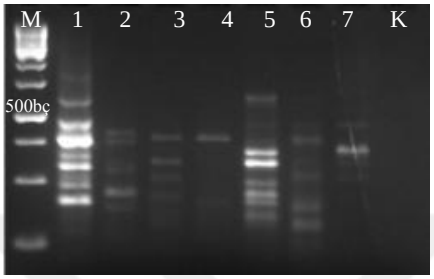
Salep yüksek oranlarda hidrokolloid gam maddesi (glukomannan) içerdiği için DNA izolasyonunda genel anlamda büyük zorluklar yaşatan bir malzeme olmuştur. DNA izolasyonu için uygulanan farklı yöntemler ve elde edilebilen DNA konsantrasyonları Çizelge 4.1'de verilmektedir. Bu çizelgede, yapılan pek çok izolasyon çalışması arasından sadece öğütülmüş yumru örnek materyali ile yapılan izolasyonlara ait ortalama değerler sunulmuştur. Çok az miktarda örnek ile çalışılsa dahi jel oluşumu nedeniyle DNA izolasyonunun diğer bitkisel materyalde olduğundan çok daha düşük verimle sağlanabildiği görülmüştür. Hatta örneklerden kaynaklanan müsilaj yapı klasik CTAB uygulamasında örneklerin pipetlenmesini engelleyecek seviyelerde olmuştur. Benzer sorunlar müsilaj yapıda olan keçiboynuzu zamkı, arap zamkı, guar zamkı gibi tağşiş materyali için de söz konusu olmaktadır.

Çizelge 4.1. Uygulanan farklı DNA izolasyon yöntemleri ve izolasyon sonucu elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri

DNA izolasyon yöntemi	DNA konsantrasyonu (ng/µL)	A260/280
CTAB yöntemi	134,6±81,9	1,713±0,129
CTAB-PVP yöntemi	21,9±2,8	1,328±0,118
Modifiye CTAB yöntemi (Protocol 1)	62,2±13,5	1,477±0,219
Enzimle DNA ekstraksiyonu	33,1±15,5	1,910±0,439
DNeasy® mericon™ Food DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen)	101,5±20,4	1,670±0,307
NucleoSpin Plant II kiti (Machery-Nagel)	44,7±10,16	1,533±0,238
MagJet Plant Genomic DNA (Thermo Scientific)	46,0±18,8	1,600±0,280
GeneJet Plant Genomic DNA (Thermo Scientific)	31,6±9,4	1,455±0,065

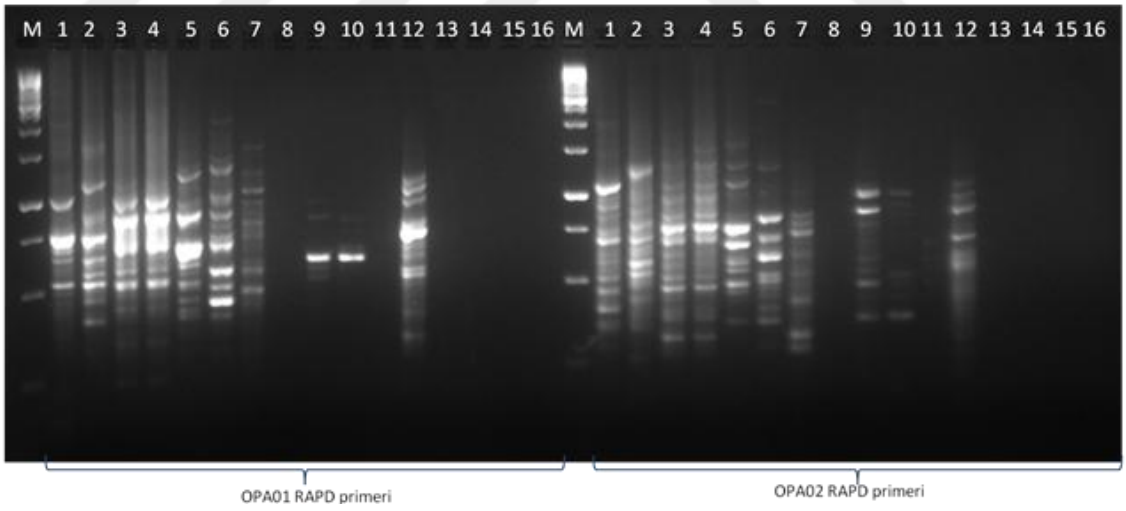
Çizelge 4.1'de verilen değerler DNA izolasyonunun değerlendirilmesinde kullanılabilecek parametrelerdir ve ideal olarak DNA miktarının 5 ng/mg'dan fazla ve saflığın göstergesi olarak da $A_{260/280}$ oranının 1,8-2,0 değerleri arasında olması istenen bir durumdur. Miktarca uygun gibi görünse de uygulanan çok sayıda farklı izolasyon metodunda da arzu edilen derecede saf örneklerin sağlanamadığı görülmüştür. Ancak, pratik uygulanabilirlik açısından elde edilen DNA örnekleri ile kurgulanan PZR denemeleri daha da aydınlatıcı sonuçlar sağlamıştır. DNA yönteminin belirlenebilmesi için RAPD primerleri ile çok sayıda deneme yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda kimi DNA izolasyon yöntemleri ile hiç PZR ürünü elde edilemediği görülmüştür. Bazı yöntemlerde ise PZR ürünlerinin fazla sayıda olduğu ve sürme yaptığı ('smear')

gözlenmiştir. Diğer yandan β-mannanaz ilavesi ile gerçekleştirilen DNA izolasyonlarında jelleşmeden kaynaklanan sorun büyük ölçüde bertaraf edilse de negatif kontrol örneklerinde (enzim katkısından kaynaklı olarak) DNA bulunduğu tespit edildiğinden özellikle RAPD çalışmalarında bu yöntemin kullanılmasının uygun olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 4.2). Yapılan RAPD çalışmalarında ayırt edilebilir bantların tekrarlanabilir şekilde elde edilebilmesini sağlayan DNA ekstraksiyon yönteminin DNeasy® mericon™ Food DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen) olduğu görülmüştür. Bu amaçla yürütülen analizlerden elde edilen iki jel görüntüsü Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmektedir.



1: *Orchis sancta*; 2: BU01-kuru yumru; 3: BU05-kuru yumru; 4: ticari toz salep-Tic1; 5: ticari toz salep-Tic2; 6: ticari toz salep-Tic3; 7: guar zamkı; K: PZR için negatif kontrol

Şekil 4.1. DNeasy® mericon™ Food DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak elde edilen DNA ve OPA01 RAPD primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



1: *Orchis anatolica*, taze yumru; 2: *Orchis sancta*-taze yumru; 3: *Orchis italica*-taze yumru; 4: *Orchis italica*-taze yaprak; 5: arap zamkı; 6: keçiboynuzu zamkı; 7: toz konjac, 8. PZR için negatif kontrol (su); 9: DNA izolasyonu için negatif kontrol (enzim ve enzim tamponu) (DNeasy® mericon™ Food kit); 10: enzim ve su (DNeasy® mericon™ Food kit); 11: ticari toz salep-Tic1 (enzim-Nucleospin plant ll kiti); 12: ticari toz salep-Tic1 (DNeasy® mericon™ Food kit); 13: ticari toz salep-Tic1 (β-mannanaz-CTAB); 14: arap zamkı (β-mannanaz-CTAB); 15: arap zamkı (CTAB); 16: PZR için negatif kontrol (su). Jelde 1-7. kuyucuklarda yürütülen örneklerin DNA izolasyonu DNeasy® mericon™ Food kit ile yapılmıştır.

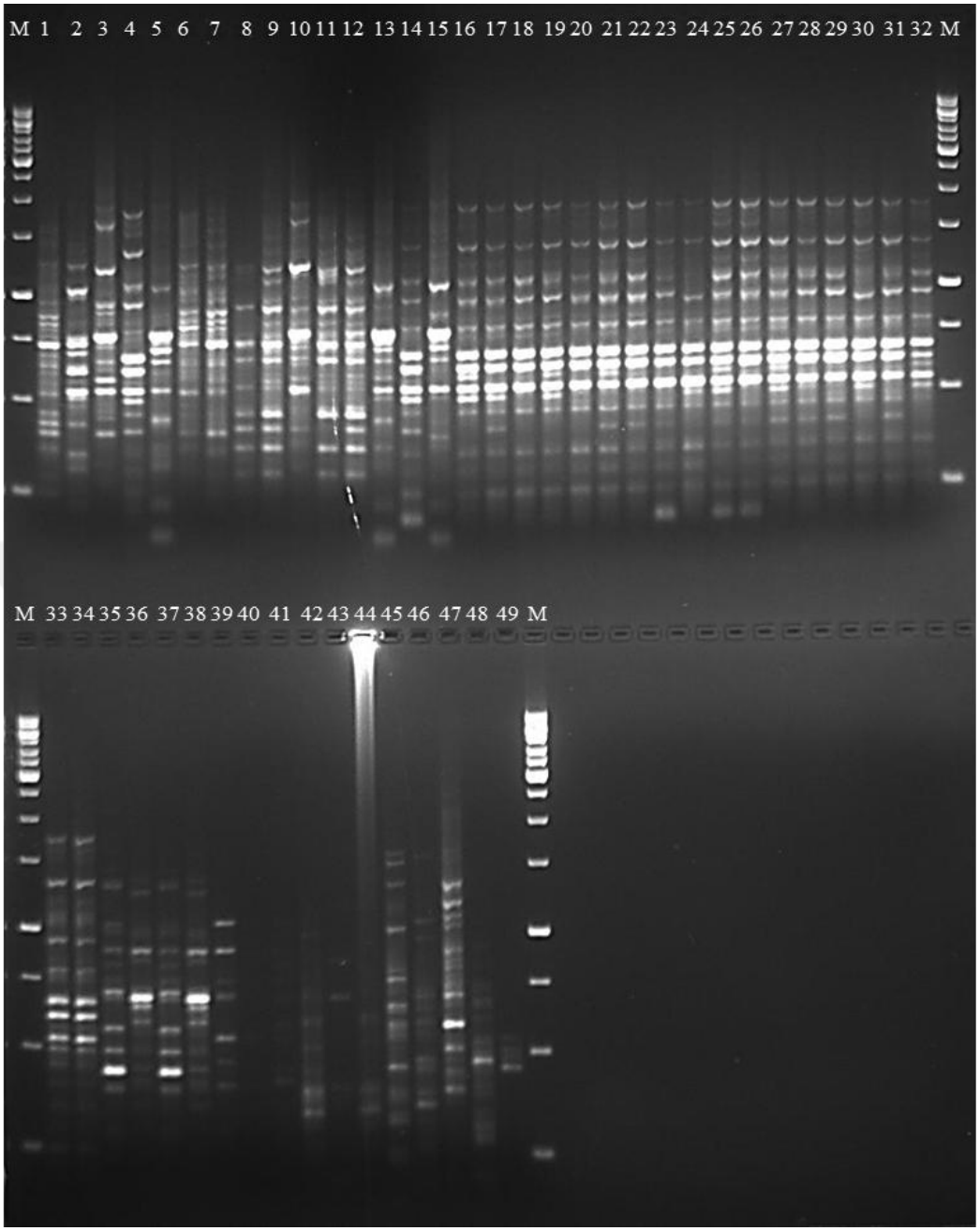
Şekil 4.2. Farklı yöntem ve materyalden elde edilen çeşitli DNA'lar ile OPA01 ve OPA02 RAPD primerlerinin meydana getirdiği PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

4.2. RAPD Çalışmaları

Elde edilen DNA örnekleri iki set (toplam 40) RAPD primeri ile gerçekleştirilen PZR denemelerinde kullanılmıştır. İlk denemelerde 48 adet DNA örneğinin (Çizelge 4.2) tamamı kullanılarak jel görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.3), ancak daha sonraki çalışmalarda daha verimli ürün sağlayan 33 örnek ile devam edilmesi uygun bulunmuştur. Bu sayı, yürütülecek jel kutularının daha verimli kullanılması da düşünülerek belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. RAPD analizlerinde kullanılan yumru örnekleri ve tağşiş/katkı materyali DNA'ları

No	Örnek kodu	Tür Adı	Notlar (Tarih,Yer)
1	A1	*Ophrys ferrum equinum*	2014
2	A3	*Serapias* sp.	2014
3	ETA1*	*Orchis sancta*	2015, ETAE
4	ETA2*	*Serapias vomaraceae*	2015, ETAE
5	C18	*Orchis morio*	2015
6	C20	*Ophrys dinarica*	2015
7	C21	*Ophrys epicopalis*	2015
8	C22	*Ophrys classica*	2015
9	C23	*Ophrys classica*	2015
10	C24	*Ophrys sphegodes*	2015, Kaş-Uğrar
11	C25	*Ophrys* sp.	2015, Kaş-Uğrar
12	C26	*Ophrys* sp.	2015, Kaş
13	Y2	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
14	Y6	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
15-34	B1-B20	-	2015, Bartın
35	Ta1	Keçi boynuzu zamkı	
36	Ta2	Guar zamkı	
37	Ta3	Keçi boynuzu zamkı	
38	Ta4	Guar zamkı	
39	Ta5	Arap zamkı	
40	Ta6	Pektin	
41	Ta7	Patates nişastası	
42	Ta8	Buğday nişastası	
43	Ta9	Mısır nişastası	
44	Ta10	Makarna öğütülmüş	
45	Ta11	Yağsız süttozu	
46	Ta12	Toz konyak	
47	Ta13	Konyak taze yumru	
48	Ta14	Toz tarçın	
49	KONTROL		



Şekil 4.3. OPA01 primeri ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünleri (Çizelge 4.2'de verilen DNA örnekleri kullanılmıştır)

Elde edilen jelde yaş yumru örneklerinde bantların daha belirgin olduğu ancak tağşiş örneklerinde bantların sünme yaptığı ya da daha az belirgin olduğu görülmektedir. Bu durumun tağşiş örneklerin kurutulmuş ve / ve ya işlem görmüş örnekler olmasından kaynaklandığı düşülmüştür. Örneklerin seçilmesinde yaş yumru örneklerinden olan ve birbirine çok benzer bantlar verdiği görülen bartın örneklerinden farklı orkide bireylerini temsil ettiği düşünülerek, farklı bant deseni gösteren örneklerin seçilmesine dikkat edilmiştir.

Seçilen örnekler ile öncelikle OPA1-20 primerlerinin tamamı ile RAPD denemeleri yürütülmüştür. Bu primer setleri ile Çizelge 4.3'de verilen örneklerden izole edilen DNA kalıpları kullanılarak elde edilen RAPD PZR jel görüntüleri Ek 3'de verilmiştir. Bantların birbirinden daha fazla ayrılması amacı ile bunlardan OPA1 ve OPA20 primer seti ile tekrar elde edilen ve jelde daha uzun yürütülen PZR ürünlerine ait jel görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Ortak bant arayışında Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilen jellerde bulunan, her ikisinde de yaklaşık 500 bç'den biraz büyük ortak bantlar üzerinde durulmuştur.

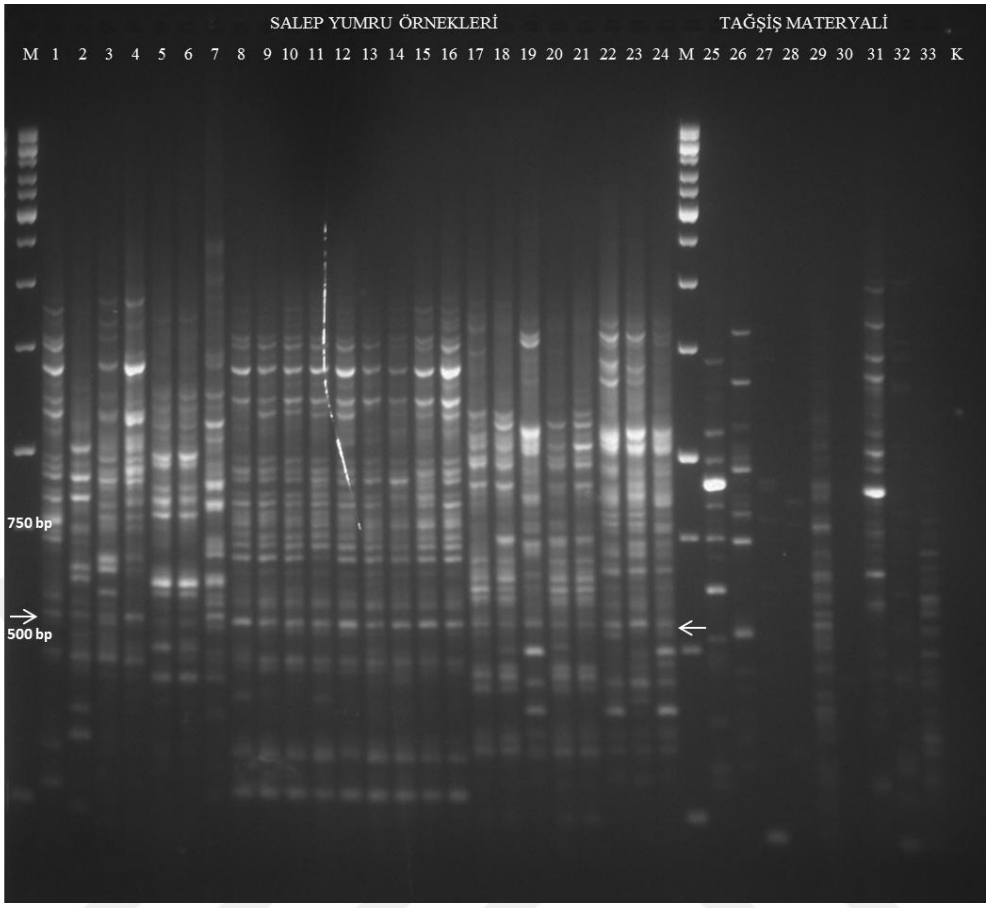
Çizelge 4.3. OPA serisi primerler ile RAPD-PZR denemelerinin kullanılan, cins, tür ve kaynak sınıflandırması yapılan salep örnekleri ve beraberinde kullanılan tağşiş materyali. Örnek numaraları Ek 3'de verilen jellerde kuyucuk numaralarına karşılık gelmektedir

Örnek no.	Örnek kodu	Cins/Tür/Madde Adı	Notlar (Tarih,Yer)
1.	A1	*Ophrys ferrum equinum*	2014
2.	A3	*Serapias* sp.	2014
3.	ETA1	*Orchis sancta*	2015, ETAE
4.	ETA2	*Serapias vomaraceae*	2015, ETAE
5.	C18	*Orchis morio*	2015
6.	C20	*Ophrys dinarica*	2015
7.	C21	*Ophrys epicopalis*	2015
8.	C22	*Ophrys classica*	2015
9.	C23	*Ophrys classica*	2015
10.	C24	*Ophrys sphegodes*	2015, Kaş-Uğrar
11.	C25	*Ophrys* sp.	2015, Kaş-Uğrar
12.	C26	*Ophrys* sp.	2015, Kaş
13.	Y2	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
14.	Y6	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
15.	Ba1	-	2015, Bartın
16.	Ba2	-	2015, Bartın
17.	Ba3	-	2015, Bartın
18.	Ba4	-	2015, Bartın
19.	Ba5	-	2015, Bartın
20.	Ba6	-	2015, Bartın
21.	Ba9	-	2015, Bartın
22.	Ba10	-	2015, Bartın
23.	Ba12	-	2015, Bartın
24.	Ba16	-	2015, Bartın
25.	Ba18	-	2015, Bartın
26.	Ta2	Keçiboynuzu zamkı	
27.	Ta3	Guar zamkı	
28.	Ta5	Arap zamkı	
29.	Ta7	Patates nişastası	
30.	Ta8	Buğday nişastası	
31.	Ta9	Mısır nişastası	
32.	Ta11	Yağsız süttozu	
33.	Ta12	Toz konyak	
34.	Ta14	Toz tarçın	

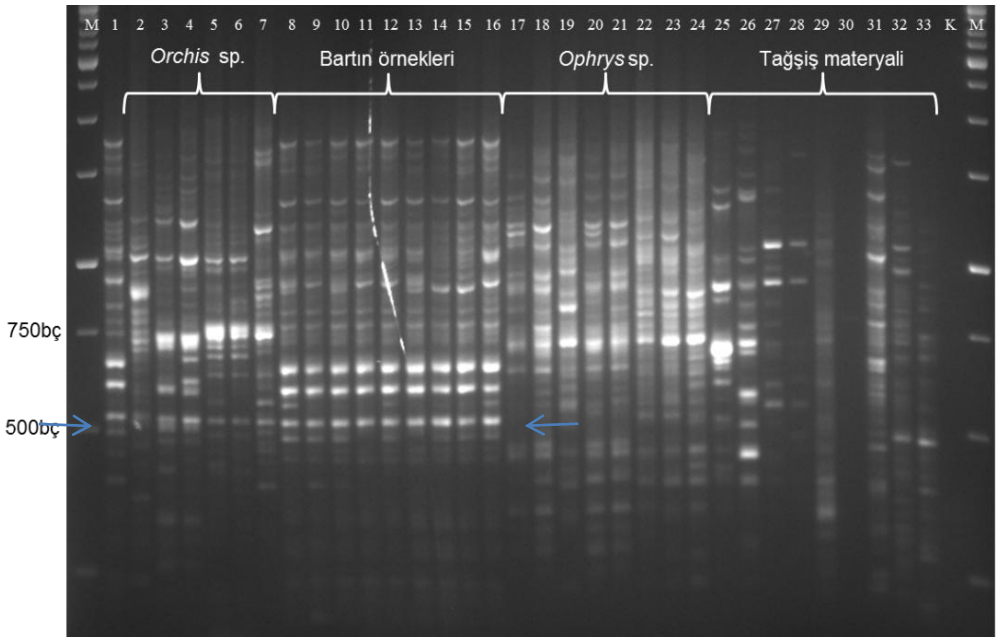
Çizelge 4.4'te verilen kalıp DNA'lar kullanılarak elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Görüntülerde salep örnekleri için elde edilen PZR ürün desenlerinin 3 ayrı grup halinde benzerlik gösterdiği görülebilmektedir (Orchis, Ophrys ve Bartın). OPA-20 primeri ile elde edilen görüntüde (Şekil 4.5) Marker kulvarında 500-750 bç bantları arasında (500bç'den biraz büyük) bir ortak bandın özellikle, ETAE'den temin edilen *Serapias vomeraceae* ile Bartın'dan temin edilen yumru örneklerinde ve *Ophrys* türlerinde aynı büyüklükte bir ürün olarak ortak (monomorfik bant) olabileceği düşünülmüştür.

Çizelge 4.4. RAPD analizlerinde kullanılan DNA kalıpları

No.	Örnek kodu	Tür Adı	Notlar (Tarih,Yer)
1.	ETA2	*Serapias vomaraceae*	2015, ETAE
2.	C15	*Orchis italica*	2015, Kaş
3.	C16	*Orchis italica*	2015, Kaş
4.	C17	*Orchis italica*	2015, Kaş
5.	Y2	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
6.	Y6	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
7.	ETA*1	*Orchis sancta*	2015, ETAE
8.	Ba1	-	2015, Bartın
9.	Ba2	-	2015, Bartın
10.	Ba3	-	2015, Bartın
11.	Ba4	-	2015, Bartın
12.	Ba5	-	2015, Bartın
13.	Ba6	-	2015, Bartın
14.	Ba10	-	2015, Bartın
15.	Ba16	-	2015, Bartın
16.	Ba18	-	2015, Bartın
17.	C25	*Ophrys* sp.	2015, Kaş-Uğrar
18.	C26	*Ophrys* sp.	2015, Kaş
19.	Y32	*Ophrys* sp.	2015
20.	C22	*Ophrys classica*	2015
21.	C23	*Ophrys classica*	2015
22.	C20	*Ophrys dinarica*	2015
23.	C21	*Ophrys epicopalis*	2015
24.	A1	*Ophrys sphegodes*	2015, Kaş-Uğrar
25.	Ta2	Keçi boynuzu zamkı	
26.	Ta3	Guar zamkı	
27.	Ta5	Arap zamkı	
28.	Ta7	Patates nişastası	
29.	Ta8	Buğday nişastası	
30.	Ta9	Mısır nişastası	
31.	Ta11	Süttozu	
32.	Ta12	Konyak öğütülmüş	
33.	Ta14	Tarçın öğütülmüş	
34.	KONTROL		

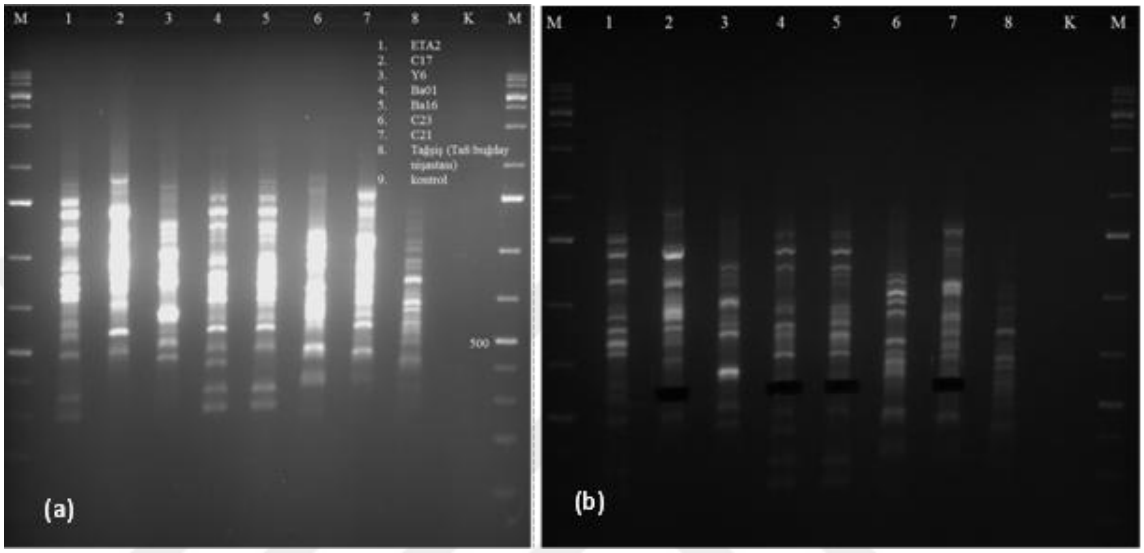


Şekil 4.4. OPA01 ile Çizelge 4.4'te verilen kalıp DNA'lar kullanılarak elde edilen RAPD PZR ürünleri



Şekil 4.5. OPA20 ile Çizelge 4.4'te verilen kalıp DNA'lar kullanılarak elde edilen RAPD PZR ürünleri

Potansiyel marker bölge olarak OPA20 RAPD primeri ile elde edilen 550-600 bç'lik parçanın dizisini tespit etmek için yeni PZR kurulmuş, hedeflenen parça jelden kesilerek klonlanmış ve çoğaltılan plazmid restriksiyon enzimleri ile kontrol edildikten sonra sekans belirlenmiştir. Bu aşamada elde edilen jelin (kesim öncesi ve sonrası görüntüsü) Şekil 4.6'da verilmiştir. Kesim sırasında 2, 4 ve 6 numaralı örnekler seçilerek kesilmiş ve tartılan jel parçaları QiaQuick gel extraction (Qiagen, Almanya) kiti kullanılarak jel purifikasyonu yapılmıştır. Klonlama için InsTAclone PCR Cloning Kit (Fermentas-Thermofisher Scientific-K1214) kullanılmıştır.

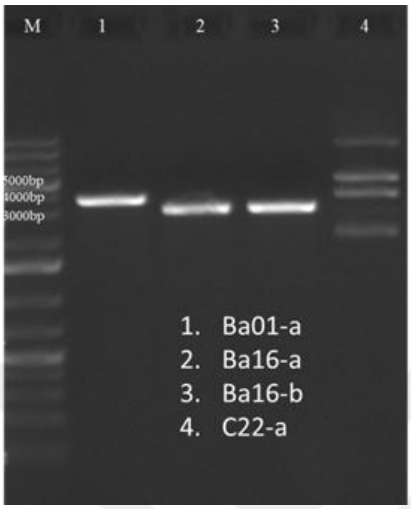


Şekil 4.6. OPA20 ile elde edilen RAPD PZR ürünleri ile yürütülen jel **a)** ve aynı jelin kesim sonrası görüntüsü **b),** 1. ETA2 (*Serapias vomaraceae*), 2. C17 (*Orchis italica*), 3. Y6 (*Orchis anatolica*), 4. Ba01, 5. Ba16, 6. C23 (*Ophrys classica*), 7. C22 (*Ophrys classica*), 8. Tağşiş (Ta8:buğday nişastası), K. Kontrol

Jelden kesilen parçalar C17 (313 mg), Ba01 (322 mg), Ba16 (296 mg) ve C22 (289 mg) ve kit talimatları doğrultusunda extraksiyon yapılmıştır. İşlem sonunda elde edilen DNA konsantrasyonları C17, Ba01, Ba16 ve C22 için sırasıyla 8.74, 5.85 µg/ml, 5.14 ve 3.42 µg/ml olmuştur.

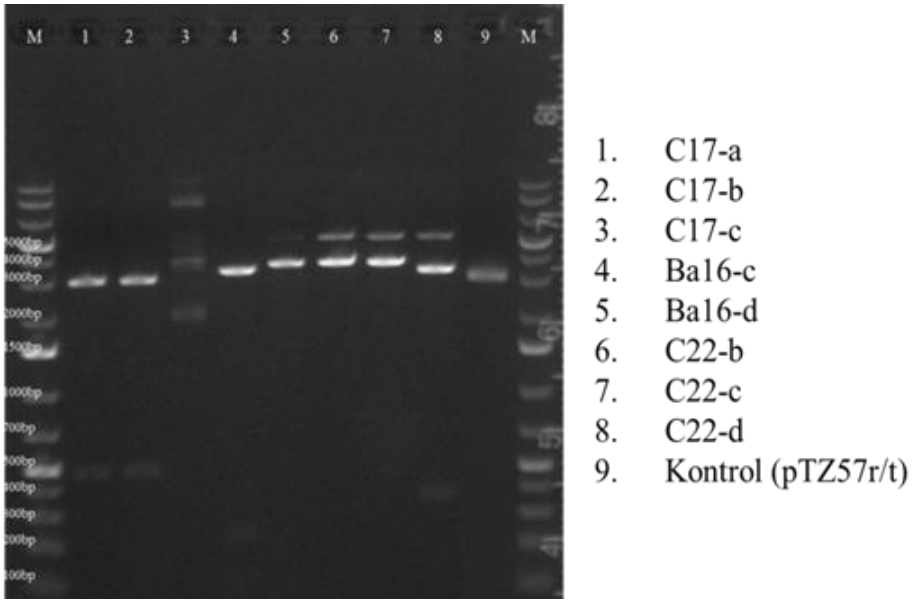
Transformasyon için gerekli DNA miktar (1 µl vektör için) 600 bç (insert) / 2886 bç (vektör) x 3 x 50 = 31 ng şeklinde hesaplanmıştır. Buna göre her bir DNA örneğinden alınması gereken miktar ortalama 30 ng DNA olacak şekilde hesaplanmıştır (C17: 3,43 µl; Ba01: 6,68 µl; Ba16: 7,24 µl; C22: 8,77 µl). DNA örnekleri 1 µl pTZ57r/t plasmid vektörü ile ligasyona sokulmuştur. Toplam 15 µl ligasyon karışımı için 1,5 µl vektör, 5-13 µl DNA, 3 µl tampon, 0,5 µl T4 ligaz ve 15 ml'ye tamamlayacak hacimde nükleazdan arındırılmış destile su kullanılmıştır. Ligasyon karışımı 22 ° C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve transformasyona elverişli *E. coli* suşu olan XL-1 Blue (Stratagene, CA, ABD) hücrelerine transformasyon işleminde kullanılmıştır. Seçilen transformantlar 100 µg/mL ampisilin içeren 4 ml sıvı LB besiyerinde gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim sağlanan fermantasyon sıvısının 1 ml'si 1 ml %50'lik gliserol ile karıştırılmış ve -80°C'de muhafazaya alınmıştır. Geriye kalan fermantasyon sıvısı plasmid izolasyonu yapılmak üzere santrifüj edilmiş ve pelletten plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlarda transformasyonun kontrolü için

EcoRI restriksiyon enzimi ile kesim ve agaroz jel elektroforezi sonrasında görüntüleme yapılmıştır (Şekil 4.7). Elde edilen jel görüntüsüne göre yalnızca 1. kuyucuktaki örneğin, yani Ba01-a plasmidinin, istenilen büyüklükte insert taşıdığı anlaşılmaktadır. Bunun üzerine, daha önce kullanılan ligasyon karışımından 7 µl kullanılarak tekrar transformasyon yapılmıştır.



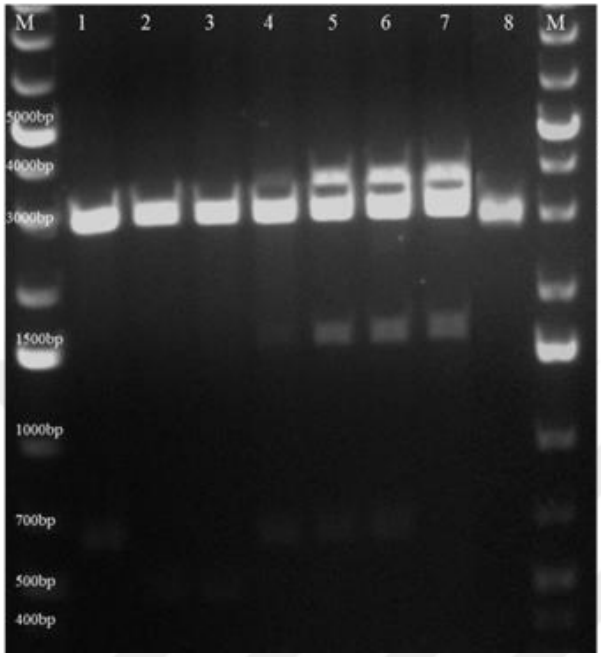
Şekil 4.7. *EcoRI* endonükleazı ile kesilmiş plasmidler

Gerçekleştirilen ikinci transformasyon denemesinde 8 adet koloni elde edilmiş ve tekrar plasmid ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen plasmid DNA'lar ve konsantrasyonları; C17-a: 59,9 ng/µl; C17-b: 32,6 ng/µl; C17-c: 308 ng/µl; Ba16-c: 149 ng/µl; Ba16-d: 22,3 ng/µl; C22-b: 656 ng/µl; C22-c: 523 ng/µl; C22-d: 643 ng/µl olmuştur. Plasmidlerin kontrolü için yine *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır. Kontrol için plasmid DNA (pTZ57r/t) eklenmiştir. Elde edilen DNA'lar jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Eco*RI endonükleazı ile kesilmiş plasmidler

*Eco*RI endonükleazı ile plazmidin yaklaşık 3,5 kbç (2887 + ~550 bç) büyüklükte düşmesi beklenmektedir (insert içinden kesim olmadığı taktirde). Jel görüntüsünden bazı klonlarda plazmidin insert içinden de kesildiği ve küçük parçalar da toplandığında plazmidin beklenebilecek büyüklükte olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen plazmidler *Hind*III ve *Eco*RI endonükleazları ile ikili kesilerek tekrar kontrol edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *EcoRI* ve *HindIII* endonükleazları ile kesilmiş plasmidler

T7 promotöründen T7 reverse primeri ile yapılan dizileme sonuçları DNAMAN ve SnapGene programı ve NCBI web sitesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen temiz (plazmidden arındırılmış, RAPD primeri dahil) 5 dizi aşağıda verilmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

```
BA01: 550 bp;
Composition  146 A; 137 C; 115 G; 152 T; 0 OTHER
Percentage:  26.5%  A; 24.9%  C; 20.9%  G; 27.6%  T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 169.33 dsDNA: 339.05

ORIGIN
1       GTTGCGATCC GGCCGTCGAT TTCCTGCGCG TGTAGACGCG CCATGCAGGC TCCTCCACGC
61      CAAAGAGGCT TCCATAGTTG AGCTTTGGTG GCCCTACTAA AATAATAAAT TTCGGCATGA
121     ATGCACCATG ATGGCTTCCA TATGTGGTTG ACAGTGGTCC CCCTAAAATA ATAAATTTCT
181     CCATGAATGT TCCATAACGG CTTCCATATG CGTGCTCCAT AAATTCTAGC GTAAGGGGTC
241     TGCCTGGGTG AATGTGTATG TGTAACAGAT GTACTATTAA GTTCATCGAC AAACTCGATG
301     ACGAAGACAA AACAGACAAA TTCCTTCGAG CACAATGTTA TTGGGATATG TGATATCCTG
361     CTAAGGTGAC CTTGACAGTA CGATAGACAC GTCCTGCGTG ACAATGTAAA TAACTTCCTC
421     CTTTGAGCAC AATGAACGCG AGATTGTTCT TCTCCCCCCA AAAATAGTAG AGCCCCGAGA
481     GATCTACGCA CCCTTCTGGT ATTATTTTTG TCATACCCTT CCCCTCCGTC ACTATTACCT
541     GGATCGCAAC
```

Şekil 4.10. BA01 ile elde edilen RAPD amplikon dizisi

```
C17: 533 bp;
Composition  124 A; 126 C; 133 G; 150 T; 0 OTHER
Percentage:  23.3%  A; 23.6%  C; 25.0%  G; 28.1%  T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 164.58 dsDNA: 328.59

ORIGIN
1        TTTTGGCTTG ATGCCTCTGC GTCGACGGGC CCGGGATCCG ATTTGTTGCG ATCCCCGAGG
61       ACCTTATGAA AATTTAAAAA ACCGTCGCTT TCAACGAAAA AGAATTCTGA ATGGGTGCTT
121      AGAATACTTT GATTCTTACT AGCGTAATGG TTTGAGGGGA GTGGAGTGAT TTTTATGAGT
181      GGCGAGTTGC GAGTGCCGCA TGGGGAGTGC CGCTTGGTGA GTGCATGGTG GTACCACTCG
241      CTTTAATTGT AGCGACCCAT GCCGTCGCCC ATACCCCCTT TCTCTATAAA TACCAGGTAC
301      CCCCGTCATA AATGCTCACC TACCTTCTCT CCTTTCCCGC TCTCTATAAA TACCAGGTAC
361      CCATGCCGTT AAAGAATAGT GGAGAACTTT GTTCATTACG CGTTCCCGCA TGGGCGAGTG
421      ACTCTTTAAG AGTTTCGCGA GGTCGAGAGC AAATTCATGG TTGAAGGATT CGTGGCGCGA
481      GTGACCAATA ATGGTGAGAC CCTCAACTCC ATCTTTACAG ATTGGATCGC AAC
```

Şekil 4.11. C17 ile elde edilen RAPD amplikon dizisi

```
C22-A: 562 bp;
Composition  172 A; 148 C; 105 G; 136 T; 1 OTHER
Percentage:  30.6%  A; 26.3%  C; 18.7%  G; 24.2%  T; 0.2%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 172.81 dsDNA: 346.45

ORIGIN
1        GTTGCGATCC NCGCTCACCG CACCAAATGT TTGAACCGAG ACTTTGATTC GGGATCGGAA
61       CCTGAAAATA AGTGCACCTC GCCTTTACTT CTAGTCGAGC TGATAAACGA CTTGCGACTC
121      AGAAAGCAAA GACTTAGTGA AAGAAAAACT CAGGACCCCA AAGTTGCAGT GAGGAGGTCC
181      ATCCACAAAC CCGAAAGATC ACAGAACTTT CCCTCCCAAA CCAAGACTGA GCTCGGCACA
241      TCTGAGAACA AGAAATTTCT CTCTTTCTCT CTCTAGAAAA CCCAAAATTG ATCTTTTTAA
301      AGGTGCATAT GGGGTTCTAT TTATAGATTT TATGAAGTGG TATGTCAATA ACTCATTTAA
361      TGTTTAGGAA ATTACCAAAC ACCCCTCAGA AAAGCAATCA AATCAAGAGG GTTCAAGTGT
421      CATTTCACCA CCCAACCCTT CTCGTCGACT CCGGTCTCAT GGTGAGCGAG GTCATTAATT
481      TAGAGAGAAC CTCACTGGCC GCAACTCGCA TCTTCTAAGC CCAGTCTGCA TGACCTACCG
541      ACCCACCCCT CAGGATCGCA AC
```

Şekil 4.12. C22a ile elde edilen RAPD amplikon dizisi

```
C22-B: 557 bp;
Composition  137 A; 114 C; 128 G; 178 T; 0 OTHER
Percentage:  24.6%  A; 20.5%  C; 23.0%  G; 32.0%  T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 172.05 dsDNA: 343.35

ORIGIN
1        GTTGCGATCC CTGGTGGCGA GCCAGCGTAA TCCAGGGTCT GGATGTAGGA GACCCAGATC
61       GCTGCGAGTC ATTTTCCAAT TATCCAATTT TCTCTCGCTG CGAGCCCGGG GTCACCTAAA
121      TAAACCCTGT GTAGGGGAAA ATACCCTTGG ATCCCCTTGA TGTGACAACT ATCCAGAGGG
181      GATTTTAGTA ATTCCCTAAG CATTAAATAT GTTATTTGTA AGCCACTTTA TAAAATCTAT
241      AAATAGAACA CATATGCACC TCTAAAAAGA TCCATTTTTA GGTTTTCTAG AGATAGAAAG
301      AGAGCATTTT ATTGTTCTCA GAGGTTCCGA GCTCAGTCTT GGTTTGGGAG GGAAAGATCT
361      TTGATCTTTC GGGTTTGTGT CTCCTCGCAG CAGCTTTGAG CTTCTGAGTA GTTTTTCTTA
421      CTAAGTCTTT GTTTTATGAG TCGCAGATTG TTTCTCGGCT TGACTCGCAG TAAGAGAGAG
481      TTGCACCATT TTCAGGTTCC AATCCCGAAT CGAAGTCTCT TTTCAAGCAT TTTGGTGCGG
541      TAAGCGTGGA TCGCAAC
```

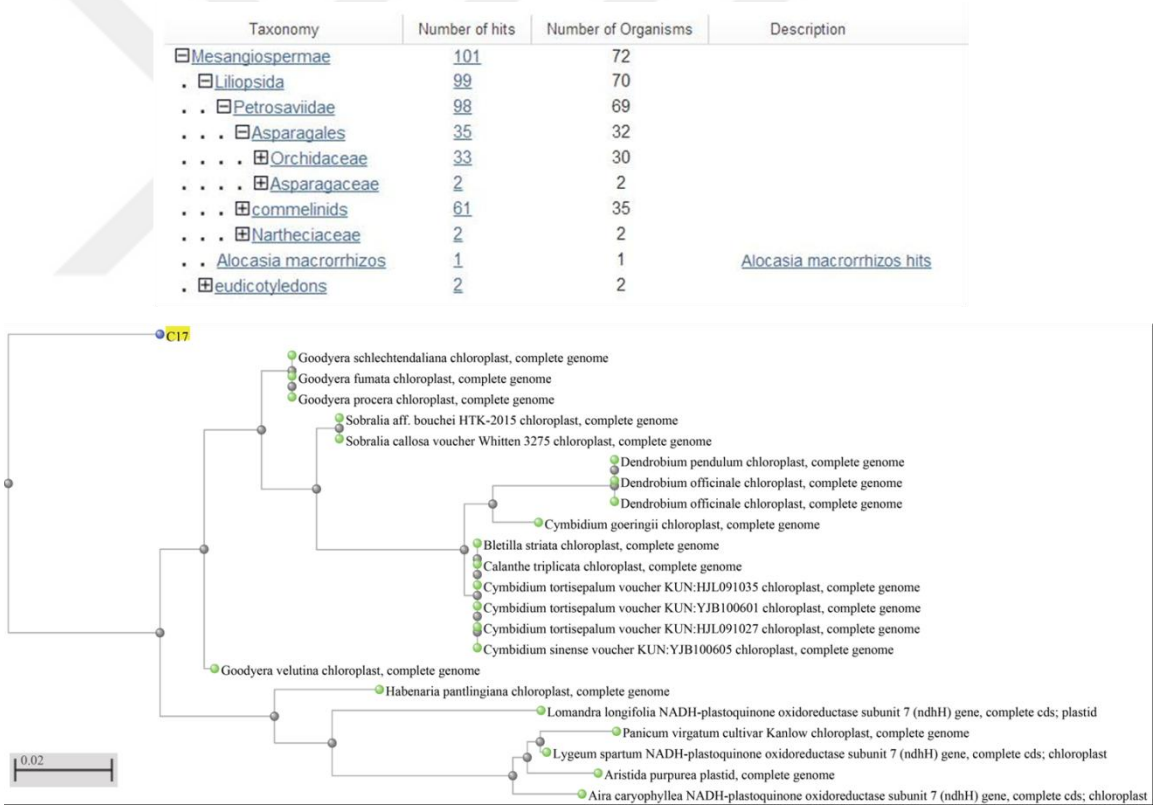
Şekil 4.13. C22b ile elde edilen RAPD amplikon dizisi

```
C22-C: 554 bp;
Composition  144 A; 127 C; 91 G; 192 T; 0 OTHER
Percentage:  26.0%  A; 22.9%  C; 16.4%  G; 34.7%  T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 170.08 dsDNA: 341.48

ORIGIN
1        GTTGCGATCC GTAGCTAAGC GAAGGTGATT GAAGAGCACA GGAAACCTAC AGGATTGATT
61       GAAGAGCACA GGAACCCTTC ACCGCAGTAG CCGATCACTG TTTTCACTTC TTATTCAAGG
121      TTTTTCCTCG GGTATGATTT TGGTCGAACA AGTTTCTTAA AGCTTTCATG TGGTTTGCAT
181      TACTTTTTAA GGGATCGTGG GCTAAATGCT CTGCTTTGAT TTATTAATTG ATTAATCATG
241      AAGTTTCTAT TTCTGAATTC TCACTACCCA ACCTAACACA CATCAAATGC ATCTCCTACT
301      GCTCAACCTA ACATGTGTTG CTTCTCTTCC CCAAGGAAAT TCCTCCCCGA CACTCCCATC
361      ACATTCTTCC ATGGTGCCCC ATCGTGAAAT CTATACCCCC AATTTTTGAG TTCTAAGCTT
421      CAATCTAAGA TGGAAAATAG GTTTTGTTCT GTTTTTCTTT CATTGTGTTT TTATTAGCCT
481      ATACAAAAAA AATTCATGTA CCCAATTCTT ACTCTCTCCA TGTTTTGACA ACGTGCTTTA
541      TTTAGGATCG CAAC
```

Şekil 4.14. C22c ile elde edilen RAPD amplikon dizisi

Elde edilen dizilerden C17 ile gerçekleştirilen taramanın neticesinde veritabanından elde edilen filogenetik değerlendirme sonucu Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. NCBI BLASTn veritabanı ile elde edilen C17 homoloji değerlendirmesi (üstte) ve filogenetik ağaç (altta)

Analiz edilen dizinin 57 bç'lik bir bölümünün *Goodyera* sp.'de %92 oranında benzerlik (identity) gösterdiği görülmektedir. Bu bölge baz alındığında en yakın homoloji sergilenen bireylerin Orchidaceae (Salepgiller) familyasından genom çalışmalarına konu olan bitkiler olduğu görülmüştür. Ancak, tam identity olmasa da

benzer dizilerin *Triticum* sp.'de de bulunuyor olması araştırmacılarda bu bölgeden yola çıkarak marker bölge tanımlamanın sakıncalı olabileceğini düşündürmüştür.

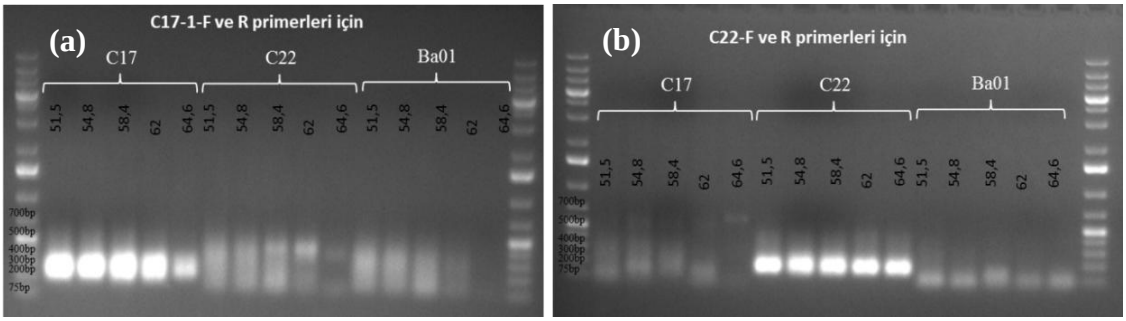
C22a ve C22b dizileri ise %73 homoloji olduğu belirlenmiş, diğer diziler arasında önemli benzerliğe rastlanamamıştır. C22a, C22b, C22c ve BA01 dizileri NCBI veritabanında herhangi bir dizi ile kayda değer bir eşleşme sergilememiştir.

Bu aşamada elde edilen dizi bilgilerinden faydalanarak çalışabilecek 2 çift marker bölge primeri tasarlanmıştır (Çizelge 4.5). Bu primerlerin tasarımında kullanılan dizi en az 2 kere dizileme yapılarak doğrulanmıştır. Primerler sipariş edilerek diğer kalıp DNA'lar ile PZR denemeleri yürütülmüştür.

Elde edilen dizlerden tasarlanan iki primer çifti ile yürütülen PZR ile elde edilen ürünler jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.16). Primerlerin dizi kaynağı olan DNA'lar ile iyi ürün verdiği, ancak spesifik olarak her üç kalıpta da çalışan bir primer seti bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. RAPD (OPA20) ile elde edilen sekanslardan tasarlanan potansiyel SCAR marker primer çiftleri

Primer adı	Dizi	Sıcaklık (°C)	Amplikon büyüklüğü (kbç)
C22-f	5'-TTACTGCGAGTCAAGCCGAG-3'	61,6	~166
C22-r	5'-TGTTCTCAGATGTTCCGAGC-3'	59,0	
C17-1-f	5'-AGCGTAATGGTTTGAGGG-3'	56,1	~206
C17-1-r	5'-ATAGAGAGCGGGAAAGGAG-3'	56,1	



Şekil 4.16. C17, C22 ve Ba01 örneklerinden elde edilen kalıp DNA ile **a)** C17-1-F/R primerleri ve **b)** C22-F/R primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü

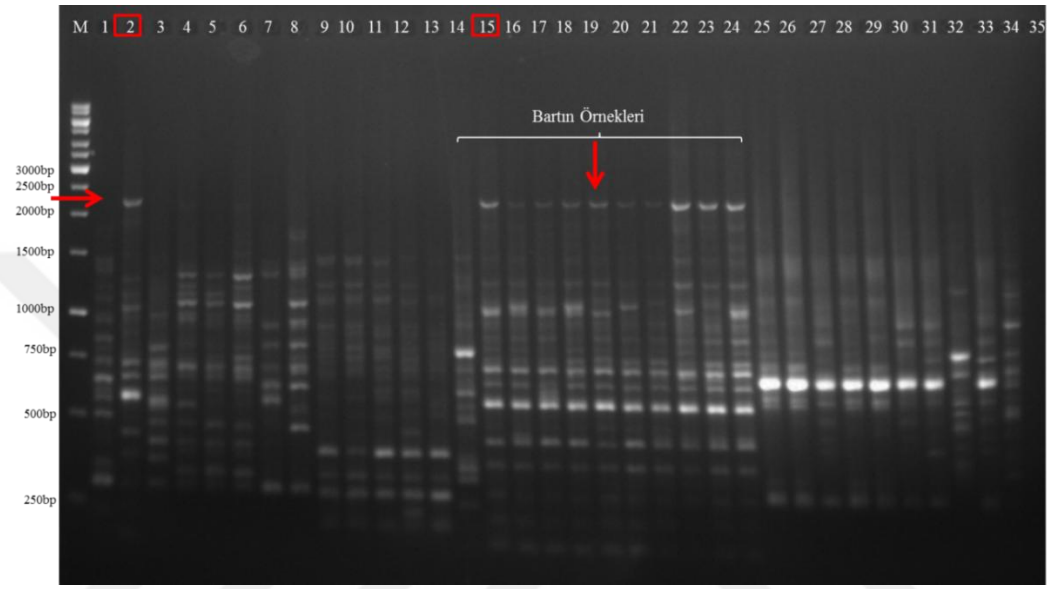
Benzer bir taramanın OPB serisi primerler üzerinden gerçekleştirilmesi için de RAPD-PZR denemeleri yürütülmüş ve Ek 4'de verilen jel görüntüleri elde edilmiştir. OPB serisinden primerler kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PZR için Çizelge 4.6'da verilen örnekler kullanılmıştır. Çizelgede belirtilen örnek numaraları jellerde yükleme yapılan kuyucuk numaralarına karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.6. OPB serisinden 20 primer ile yürütülen RAPD-PZR için kullanılan DNA örnekleri listesi

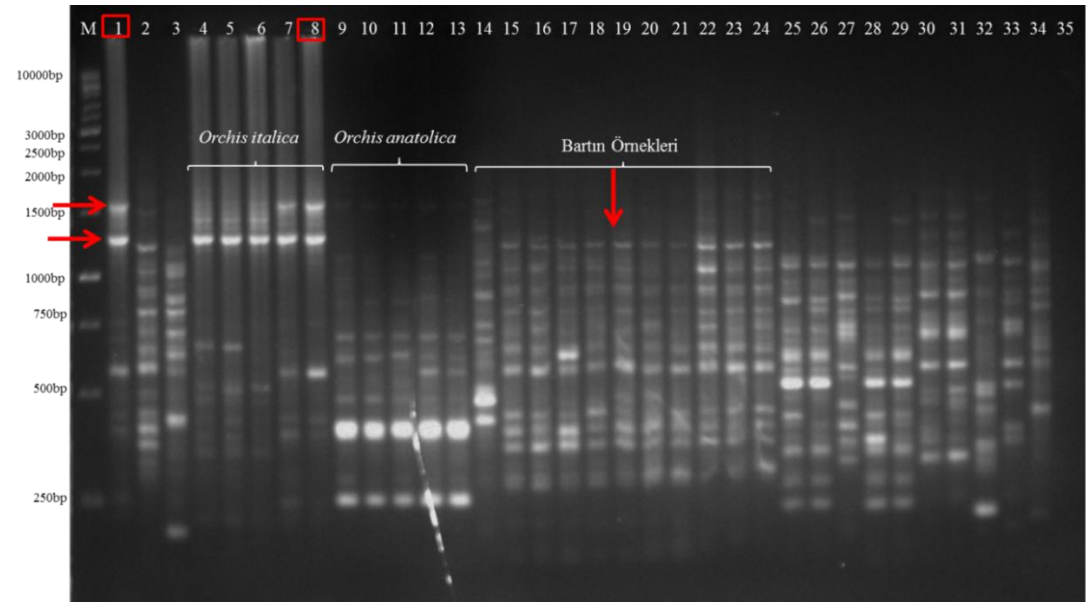
Örnek no.	**Örnek kodu**	**Cins/Tür Adı**	**Notlar** (Tarih,Yer)
1.	A3	*Serapias* sp.	2014
2.	ETA2	*Serapias vomaraceae*	2015, ETAE
3.	C12	*Orchis italica*	2015, Kaş-Uğrar
4.	C13	*Orchis italica*	2015, Kaş
5.	C14	*Orchis italica*	2015, Kaş
6.	C15	*Orchis italica*	2015, Kaş
7.	C16	*Orchis italica*	2015, Kaş
8.	C17	*Orchis italica*	2015, Kaş
9.	Y2	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
10.	Y5	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
11.	Y6	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük
12.	C19	*Orchis mascula*	2015, Kaş-Uğrar
13.	C18	*Orchis morio*	2015
14.	ETA1	*Orchis sancta*	2015, ETAE
15.	Ba1	-	2015, Bartın
16.	Ba2	-	2015, Bartın
17.	Ba3	-	2015, Bartın
18.	Ba4	-	2015, Bartın
19.	Ba5	-	2015, Bartın
20.	Ba6	-	2015, Bartın
21.	Ba10	-	2015, Bartın
22.	Ba12	-	2015, Bartın
23.	Ba16	-	2015, Bartın
24.	Ba18	-	2015, Bartın
25.	C25	*Ophrys* sp.	2015, Kaş-Uğrar
26.	C26	*Ophrys* sp.	2015, Kaş
27.	Y32	*Ophrys sp.*	2015
28.	C22	*Ophrys classica*	2015
29.	C23	*Ophrys classica*	2015
30.	C20	*Ophrys dinarica*	2015
31.	C21	*Ophrys epicopalis*	2015
32.	C24	*Ophrys sphegodes*	2015, Kaş-Uğrar
33.	A1	*Ophrys ferrum equinum*	2014
34.	C11	*Gymnadenia stiriaca*	*2015,* Kaş

OPB serisi ile yürütülen RAPD jellerinden bazılarında potansiyel monomorfik bantlar gözlemlenmiştir. Bu bantların marker amaçlı seçiminde bant büyüklüğü, parlaklığı önemsenmiş ve kuvvetli komşu bantların olmaması gözetilmiştir. Seçilmiş olan OPB04, OPB15 ve OPB19 primerleri ile elde edilen RAPD-PZR ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jellerinin görüntüleri sırasıyla Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmektedir. Şekillerde de görülebileceği gibi cins, tür ve lokalite temelinde ortak olarak amplifiye olan potansiyel monomorfik bantlar bulunmaktadır. Bu bantlar

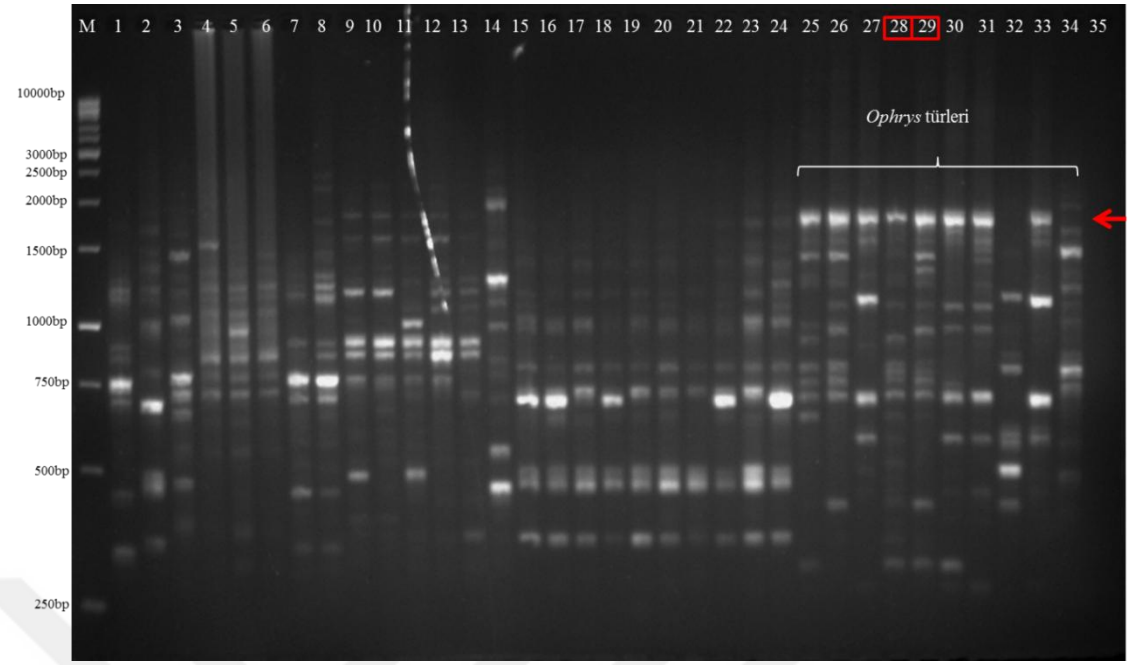
arasından OPB04'te yaklaşık 2250 bç, OPB15'te 1250 ve 1550 bç, OPB19'da ise yaklaşık 1800 bç büyüklükte olanlarından 2 şer örnek seçilerek amplifikasyonun klonlama fragmenti elde etmek üzere tekrar edilmesi kararlaştırılmıştır. Bunun için şekillerde de kırmızı kutu ile işaretlenen OPB04'ten 2 ve 15 no'lu örneklerden 2250 bç, OPB15'ten 1 ve 8 no'lu örneklerden 1250 ve 1550 bç ve OPB19'dan 28 ve 29 no'lu örneklerden 1800 bç büyüklüğünde amplifikasyon ürünlerinin sentezi için RAPD-PZR denemeleri yürütülmüş ve elde edilen jeller jel pürifikasyonu için agaroz jelde koşturulmuştur (Şekil 4.20).



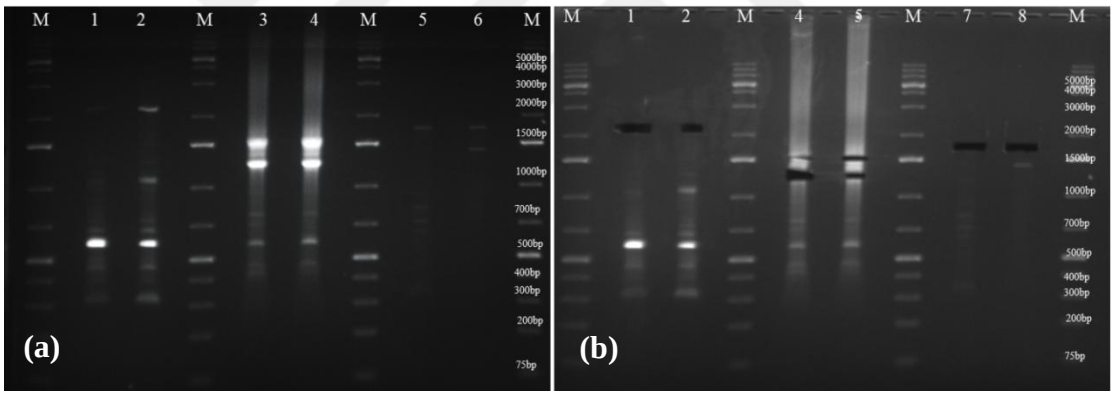
Şekil 4.17. OPB04 primerleri ve Çizelge 4.6'da verilen örnek seti ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.18. OPB15 primerleri ve Çizelge 4.6'da verilen örnek seti ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.19. OPB19 primerleri ve Çizelge 4.4'te verilen örnek seti ile gerçekleştirilen RAPD-PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 4.20. OPB serisi primerler ile elde edilen ürünlerin klonlama için saflaştırılması için yürütülen jel elektroforezi **a)** ve jelden kesim sonrası **b)** görüntüler

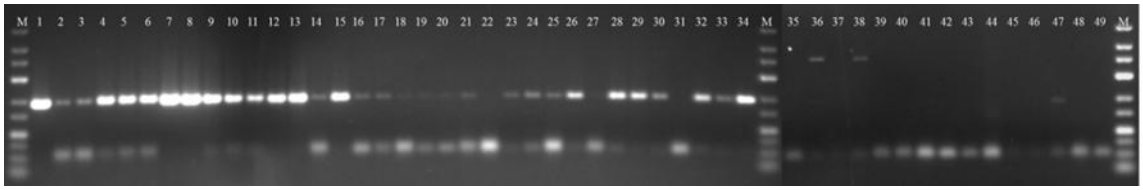
Tez çalışması kapsamında araştırmanın bu kısmında alınan sonuçların ileride yapılabilecek belirli bir salep türü ya da cinsine özgü spesifik marker çalışmalarına konu olabileceği öngörülmüş ve tüm salep türlerine özgü ortak bölge arayışında ITS2 bölgesinde çalışmaların sürdürülmesi kararı alınmıştır.

4.3. ITS2 Bölgesi İçin Tasarlanan Primerleri ile Yürütülen Çalışmalar

ITS2 bölgesi için tasarlanan ITS2a F ve R primerleri ve tüm salep ve tağşiş örnekleri ile PZR analizi gerçekleştirilmiştir. PZR için kullanılan kalıp DNA örneklerine ait bilgiler Çizelge 4.7'de verilmiştir.

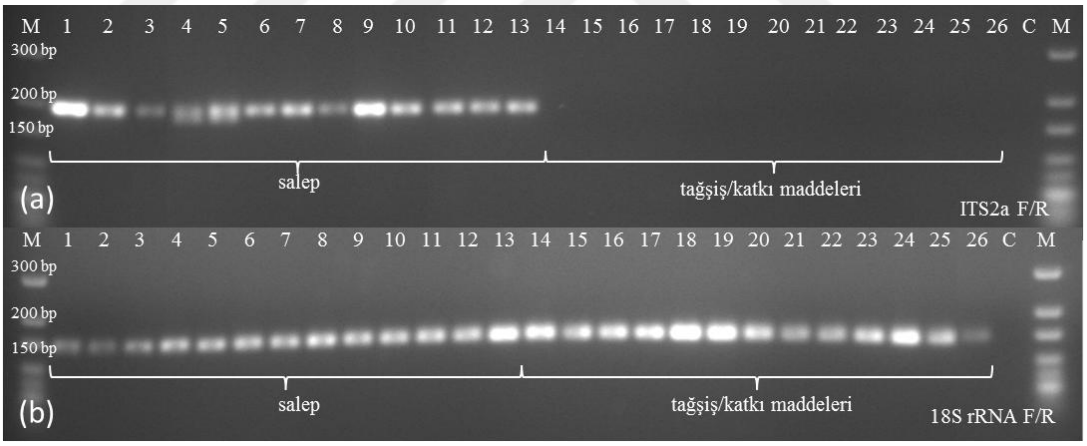
Çizelge 4.7. ITS2aF/R primerleri ile gerçekleştirilen PZR denemesinde kullanılan DNA kalıpları

Örnek no.	**Örnek kodu**	**Tür Adı / Katkı maddesi**	**Notlar** (Tarih,Yer)	**Konsantrasyon** (ng/µL)
1	A1	*Ophrys ferrum-equinum*	2014	33,7
2	A3	*Serapias* sp.	2014	44,7
3	ETA1	*Orchis sancta*	2015, ETAE	25,1
4	ETA2	*Serapias vomaraceae*	2015, ETAE	35,2
5	C11	*Gymnadenia stiriaca*	2015, Kaş	20,9
6	C12	*Gymnadenia stiriaca*	2015, Kaş	11,5
7	C13	*Orchis italica*	2015, Kaş	31,4
8	C14	*Orchis italica*	2015, Kaş-Uğrar	31,9
9	C15	*Orchis italica*	2015, Kaş	43,6
10	C16	*Orchis italica*	2015, Kaş	56,2
11	C17	*Orchis italica*	2015, Kaş-Uğrar	65,4
12	C18	*Orchis morio*	2015	26,5
13	C19	*Orchis mascula*	2015, Kaş-Uğrar	52,3
14	C20	*Ophrys dinarica*	2015	15,4
15	C21	*Ophrys epicopalis*	2015	20,0
16	C22	*Ophrys classica*	2015	32,1
17	C23	*Ophrys classica*	2015	30,8
18	C24	*Ophrys sphegodes*	2015, Kaş-Uğrar	22,7
19	C25	*Ophrys* sp.	2015, Kaş-Uğrar	51,3
20	C26	*Ophrys* sp.	2015, Kaş	54,8
21	Y2	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük	24,2
22	Y5	*Orchis anatolica*	2015, Burdur	36,2
23	Y6	*Orchis anatolica*	2015, Kumluca-Gölcük	20,0
24	Y32	*Ophrys* sp.	2015	28,8
25	B1	-	2015, Bartın	17,6
26	B2	-	2015, Bartın	16,7
27	B3	-	2015, Bartın	18,9
28	B4	-	2015, Bartın	16,4
29	B5	-	2015, Bartın	16,3
30	B6	-	2015, Bartın	18,7
31	B7	-	2015, Bartın	42,3
32	B8	-	2015, Bartın	21,5
33	B9	-	2015, Bartın	4,44
34	B10	-	2015, Bartın	15,3
35	Ta1	Keçiboynuzu zamkı		3,46
36	Ta2	Guar zamkı		ölçülemedi
37	Ta3	Keçiboynuzu zamkı		ölçülemedi
38	Ta4	Guar zamkı		ölçülemedi
39	Ta5	Arap zamkı		ölçülemedi
40	Ta6	Pektin		ölçülemedi
41	Ta7	Patates nişastası		ölçülemedi
42	Ta8	Buğday nişastası		2,07
43	Ta9	Mısır nişastası		ölçülemedi
44	Ta10	Makarna (öğütülmüş)		65,1
45	Ta11	Yağsız süttozu		3,01
46	Ta12	Toz konyak		ölçülemedi
47	Ta13	Konyak taze yumru		32,4
48	Ta14	Toz tarçın		15,7
49	kontrol	Nükleazdan arındırılmış su		-



Şekil 4.21. ITS2aF/R primerleri ile gerçekleştirilen PZR denemesi sonrasında yürütülen agaroz jel görüntüsü. Jelde, 1-34 no.lu kuyucuklara yumru örnekleri; 35-49 no.lu kuyucuklara tağşiş materyali örnekleri ile elde edilen PZR ürünleri yüklenmiştir

Çizelge 4.7'de verilen çizelgede örnek numaraları aynı zamanda Şekil 4.21'de verilen jel görüntüsünde şerit numaralarına tekabül etmektedir. Görülebileceği üzere, 180 bç civarında (150 ile 200 bç marker bantlar arasında) beklenen ürün orkide yumrularından elde edilen pek çok DNA ile etkili şekilde çoğaltılabilmiştir. Tağşiş materyalinde ise nadir olarak ve daha az belirgin olarak gözlemlenen bantlar vardır. Amplifikasyonun gerçekleşmediği tüplerde (low range marker bantlarına göre 50 ile 75 bç arasında) gözlemlenen ürünler primerlerden ileri geldiği belirtilebilir. Bu problemin giderilecebilceği düşünülerek PZR karışımı için Taq DNA Polymerase, Recombinant (5 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kiti yerine HotstarTaq DNA Polymerase Master Mix (Qiagen, Hilden, Almanya) ve kullanılarak analiz tekrar edilmiştir. Şekil 4.22'de görüldüğü gibi tağşiş/katkı materyalinde ITS2a spesifik primerleri bant vermediği, 18S rDNA universal primerlerinin ise 140 bç civarında bant verdiği görülmektedir.



Şekil 4.22. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü **a)** ITS2a F/R primer çifti ve **b)** 18S rRNA F/R primer çifti; 1. *Serapias* sp. (A3)., 2. *Orchis sancta* (ETA1), 3. *Gymnadenia stiriaca* (C11), 4. *Orchis italic* (C13), 5. *Orchis italica* (C17), 6. *Orchis morio* (C18), 7. *Orchis mascula* (C19), 8. *Ophrys classica* (C22), 9. *Orchis anatolica* (Y2), 10. *Orchis anatolica* (Y5),11. Tic1, 12. Tic2, 13, Tic3, 14. Keçi boynuzu zamkı, 15. Guar zamkı, 16. Guar zamkı, 17. Arap zamkı, 18. Pektin, 19. Patates nişastası, 20. Buğday nişastası, 21. Öğütülmüş makarna, 22. Yağsız süttozu, 23. Toz konyak, 24. Konyak taze yumrusu, 25. Toz tarçın, 26. Mısır nişastası, Kontrol (C)

Şekil 4.21'de verilen jelde 7. kulvarda koşturulan C13 (*Orchis italica*) örneği ile aynı koşullarda tekrar yürütülen PZR sonucunda edilen ürün PZR saflaştırma kiti ile muamele edilerek dizileme yapılmıştır. Dizi analizi sonucu Şekil 4.23'te verilmektedir.

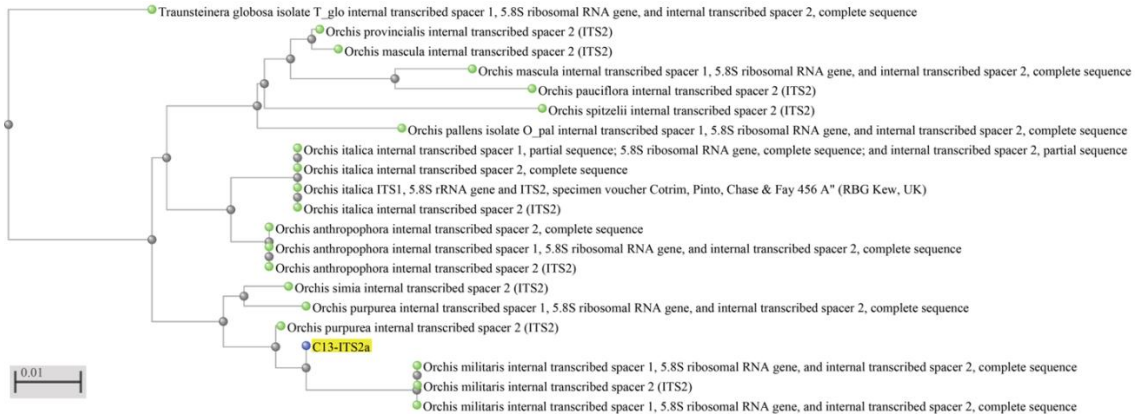
```
C13-Orchis italica: 190 bp;
Composition  39 A; 36 C; 60 G; 55 T; 0 OTHER
Percentage:  20.5%  A; 18.9%  C; 31.6%  G; 28.9%  T; 0.0%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 59.07 dsDNA: 117.14
ORIGIN
1        CGTGCTATGC GGTGGTCTTA TCTAGGATGC GGGGAATGGC TGTCATGTGC TAATGTGTGG
61       CAGGCTGAAG AGTGGGATGA TTTTCTCTTG GCAACGATCG ATTAATGGGT GGGATGGAAG
121      CCTCGGTTGA TCCTATCATC GTCAGGTTGC TTTGAGAAAG CTGTGCATAT CCCGGGCTAA
181      CCTAACTCAC
```

Şekil 4.23. ITS2aF/R primerleri ile C13 örneğinde çoğaltılan parçaya ait dizi analizi sonucu

Dizileme neticesinde *Orchis italica* olduğu bilinen (C13) örnekten 190 bç uzunluğunda bir parça çoğalmıştır. Bu dizi NCBI veritabanında taranarak dizinin istenilen bölgeden çoğaldığı anlaşılmış Şekil 4.24'te verilen eşleşme listesinde görülmektedir. Ayrıca tarama sonucunda bir filogenetik değerlendirme de yapılabilmiştir (Şekil 4.25).

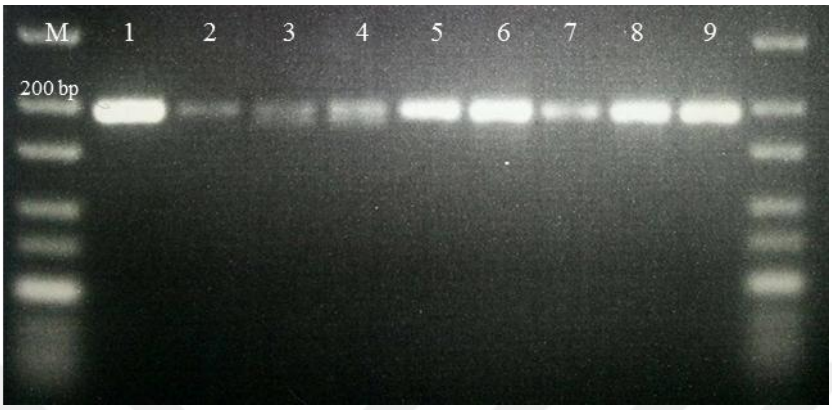
Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms
⊟Orchidinae	144	38
. ⊞Orchis	21	12
. ⊞Dactylorhiza	77	21
. ⊞Gymnadenia	43	2
. Traunsteinera globosa	1	1
. Platanthera chlorantha	1	1
. Pseudorchis albida subsp. straminea	1	1

Şekil 4.24. ITS2aF/R primerleri ile C13 örneğinde çoğaltılan parça için NCBI veritabanı taraması neticesinde elde edilen sonuç



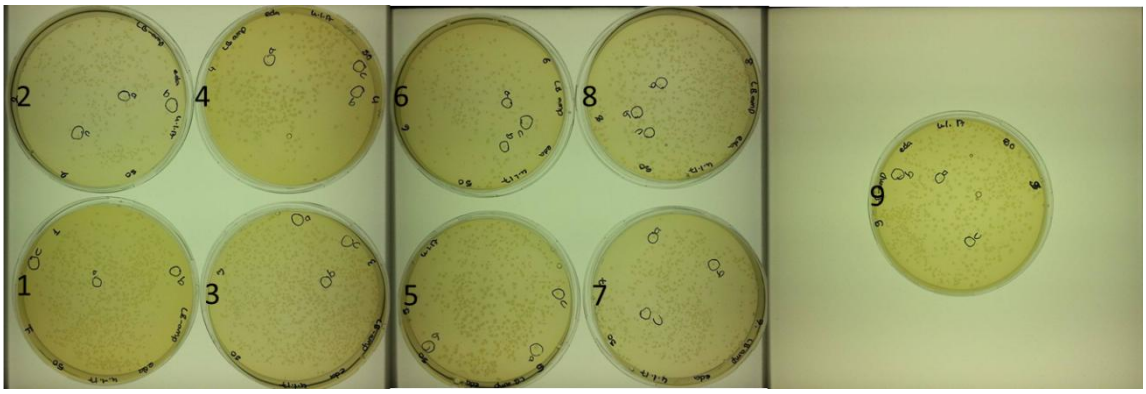
Şekil 4.25. ITS2aF/R primerleri ile C13 örneğinde çoğaltılan parçaya filogenetik değerlendirme (NCBI veritabanı ile elde edilmiştir)

Farklı yumru örneklerinden elde edilen amplikon dizilerinin belirlenmesi için 8 adet (A3 *Serapias* sp., C11 *Gymnadenia stiriaca*, C13 *Orchis italica*, C14 *Orchis italica*, C18 *Orchis morio*, C19 *Orchis mascula*, C22 *Ophrys classica*, Y2 *Orchis anatolica*, *Y5 Orchis anatolica)* örnekleri PZR analizi yapılmış (Şekil 4.26) ve ardından elde edilen PZR ürünleri saflaştırılmıştır.



Şekil 4.26. PZR ürünlerinin saflaştırılması ardından elde edilen jel resmi, M:marker, 1:A3 *Serapias sp.*,2:C11 *Gymnadenia stiriaca*, 3:C13 *Orchis italica*, 4:C14 *Orchis italica*, 5:C18 *Orchis mario*, *6:*C19 *Orchis mascula*, *7:*C22 *Ophrys classica*, 8:Y2 *Orchis anatolica*,9:*Y5 Orchis anatolica*

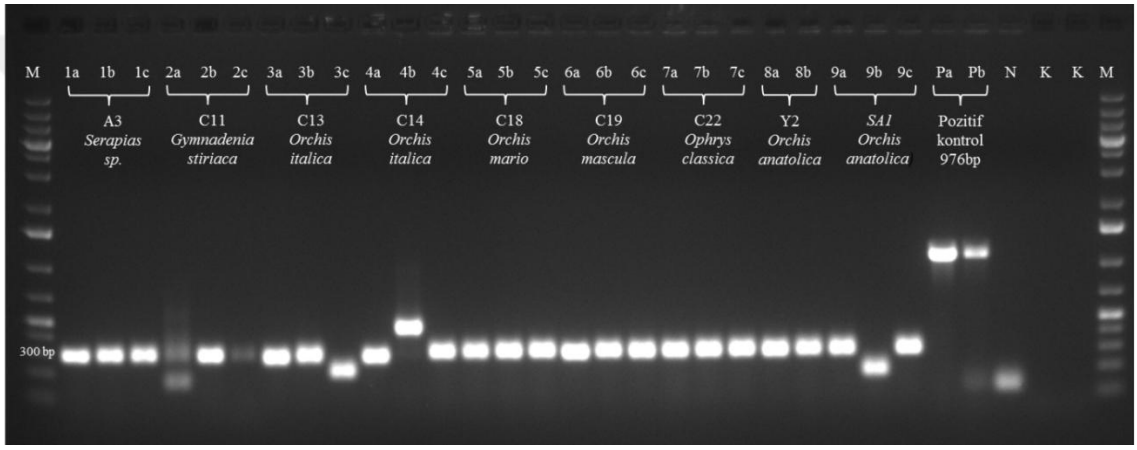
PZR ürünleri ile CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, MA, ABD) kullanılarak pJET 1.2 vektörüne ligasyon yapılmıştır. PZR ürünleri, kullanılan taq polimazın özelliğine bağlı olarak TA kuyruğuna sahip şekilde sentezlenir. Klonlama kitinin içinde bulunan ve PZR ürünlerinden küt uç elde etmeye olanak veren Blunting enzyme (Thermo Scientific, MA, ABD) ihtiva eden ligasyon karışımı hazırlanmış ve PZR ürünleri pJET 1.2 vektörüne ligate edilmiştir. Ardından elde edilen ligasyon karışımı kimyasal olarak kompetent hale getirilmiş *E.coli* XL1-Blue hücrelerine transforme edilmiş ve ampisilinli LB Lennox besiyerlerine ekim yapılarak gece boyu 37 °C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen plaka görüntüleri Şekil 4.27'de görülmektedir.



Şekil 4.27. Transformasyon sonrası elde edilen klonların plaka görüntüsü. Plakalar üzerinde belirtilen numaralar (1-9) klonlanan fragment numarasına karşılık gelmektedir

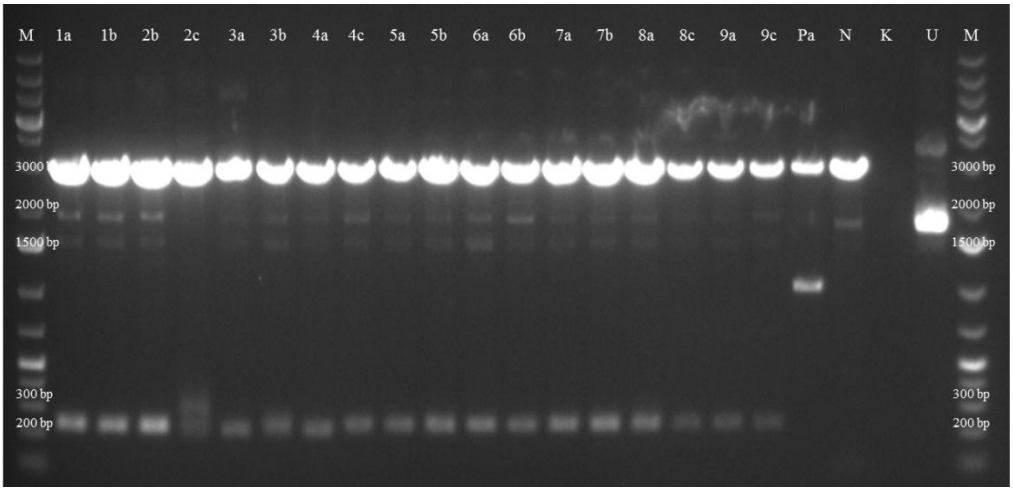
Elde edilen plakalardan her birinden 2'şer adet koloni seçilmiş ve ampisilin içeren LB lennox sıvı besiyerine ekimi yapılarak 37 °C'de inkübe edilmiştir.

Kolonilerin doğru parçayı taşıdığının doğrulanması için koloni PZR yapılmıştır. Bunun için inkübasyonun 6. saatinde sıvı besiyerinden 1 µl alınarak CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, MA, ABD) içinde bulunan pJET 1.2 F ve R dizileme primerleri ile PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.28'de verilmiştir. Ligasyon ürünü ihtiva etmeyen negatif kontolde yaklaşık primerlerin çoğalttığı bölgenin bulunduğu yere bağlı olarak 118 bç uzunluğunda bant beklenirken, ITS bölgeleri klonlanan transformantlardan ise yaklaşık 308 bç (180+118) uzunluğunda bant beklenmektedir. Pozitif kontrol olarak ise uzunluğu bilinen 976 bç uzunluğundaki PZR ürünü kullanılmıştır. Şekle göre 2a, 3c, 4b, 9b klonları hariç diğerleri beklenen şekilde yaklaşık 308 bç büyüklüğünde ürün vermiştir. Bu örneklerden 4b klonunda, PZR ürünlerinin küt uçlu olmasından dolayı PZR ürünlerinin plazmide peşpeşe iki parça şeklinde girmiş olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.28. Koloni PZR agaroz jel görüntüsü. N: negatif kontrol (yalnız plazmid) K: PZR kontol

Koloni PZR sonucuna göre seçilen pozitif klonlardan gece boyu inkübasyon ardından NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel Co., Düre, Almanya) kit ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. Ardından tam doğrulama için her iki taraftan keserek klonlanan PZR ürünün plazmitten düşmesini sağlayan *BglII* enzimi ile kesim yapılmış ve ardından agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.29'da görülmektedir.



Şekil 4.29. Transformasyon yapılmış pJET 1.2 vektörünün *Bgl*II enzimi ile kesimi sonrası elde edilen görüntü. 1a-9c (180 bç ITS bölgesini ihtiva eden plazmid), Pa (pozitif kontrol-976 bç PZR ürünü ihtiva eden plazmid), N (negatif kontrol-yalnız plazmid), U: kesilmemiş plazmid

Buna göre 2c klonu hariç tüm klonlar istenilen parçayı taşımaktadır. 1a (A3 *Serapias* sp.),1b (A3 *Serapias* sp.), 2b (C11 *Gymnadenia stiriaca*), 3a (C13 *Orchis italica*),3b (C13 *Orchis italica*), 4a (C14 *Orchis italica*), 4c (C14 *Orchis italica*), 5a (C18 *Orchis morio*), 5b (C18 *Orchis morio*),6a (C19 *Orchis mascula*), 6b (C19 *Orchis mascula*), 7a (C22 *Ophrys classica*), 7b (C22 *Ophrys classica*), 8a (Y2 *Orchis anatolica*), 8c (Y2 *Orchis anatolica*), 9a SA1 (Y5 *Orchis anatolica*), 9c SA1 (Y5 *Orchis anatolica*) klonları dizilemeye gönderilmiş. Elde edilen klonların, pJET 1.2 F ve R dizileme primerleri kullanılarak dizileme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Plazmidlerin dizilenmesi sonucu elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak olgun diziler elde edilmiş ve bu diziler NCBI veritabanında BLASTn arama motorunda araştırılmıştır. Elde edilen dizi ve değerlendirmesi aşağıda Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Dizileme sonucunda elde edilen veriler DNAMAN programı ile değerlendirilerek Çizelge 4.8'de verilen konsensus diziler elde edilmiş ve bunlar NCBI BLASTn taraması ile araştırılmıştır. ITS2aF/R primer seti ile farklı bireylerden izole edilen DNA kalıpları kullanılarak sentezlenen dizilerin tamamı Orkide türlerinde bulunan ve sadece Orkide türlerinde bulunan dizilerle homoloji göstermiştir. Botanik (morfolojik) özelliklerden yola çıkılarak yapılan tanılama ile NCBI veritabanı kullanılarak ITS2 dizileri üzerinden yapılan tanılama arasında farklılıklar olduğu anlaşılmıştır. Bu durumun NCBI veritabanında bulunan dizilerle kısıtlı olunmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Elde edilen bulgular ITS2 bölgesinin gerçek zamanlı PZR denemeleri için uygun olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle gerçek zamanlı PZR çalışmalarında ITS2a primerleri ile analizlere devam edilmiştir.

Çizelge 4.8. ITS2aF/R amplikonlarını barındıran klonlardan elde edilen dizileme sonuçları ve NCBI BLASTn değerlendirmesi

Klon[1]	Uzunluk (bç)	GenBank kayıt numarası	En yüksek homoloji bulunan tür (organizma/dizi kayıt numarası)	Kapsam (querie coverage) / benzerlik (identity)	E değeri
1a / 1b	188	MG572341	*Orchis italica*/KF499511.1	100/99	8×10^{-89}
2a / 2b	188	MG572342	*Orchis italica*/KF499511.1	100/98	8×10^{-87}
3a / 3b	175	MG572343	*Orchis antropophora*/EU294184.1	100/85	6×10^{-45}
4a	188	MG572344	*Orchis antropophora*/EU294184.1	100/85	4×10^{-45}
4b	188	MG572345	*Orchis antropophora*/EU294184.1	100/92	4×10^{-67}
5a / 5b	187	MG572346	*Orchis spitzelii*/Z94110.1	100/95	5×10^{-76}
6a / 6b	187	MG572347	*Orchis patens* /Z94098.1	100/95	5×10^{-76}
7a / 7b	188	MG572348	*Orchis italica*/KF499511.1	100/99	8×10^{-89}
8a / 8b	187	MG572349	*Orchis patens* /Z94098.1	100/96	6×10^{-80}
9a / 9b	188	MG572350	*Orchis spitzelii*/Z94110.1	100/96	3×10^{-78}

[1] Elde edilen konsensus 2 farklı klon kolonisinden elde edilen plazmitlerin herbiri için çift yönlü okunması sonucunda elde edilen toplam dört dizileme sonucu ile elde edilmiştir.

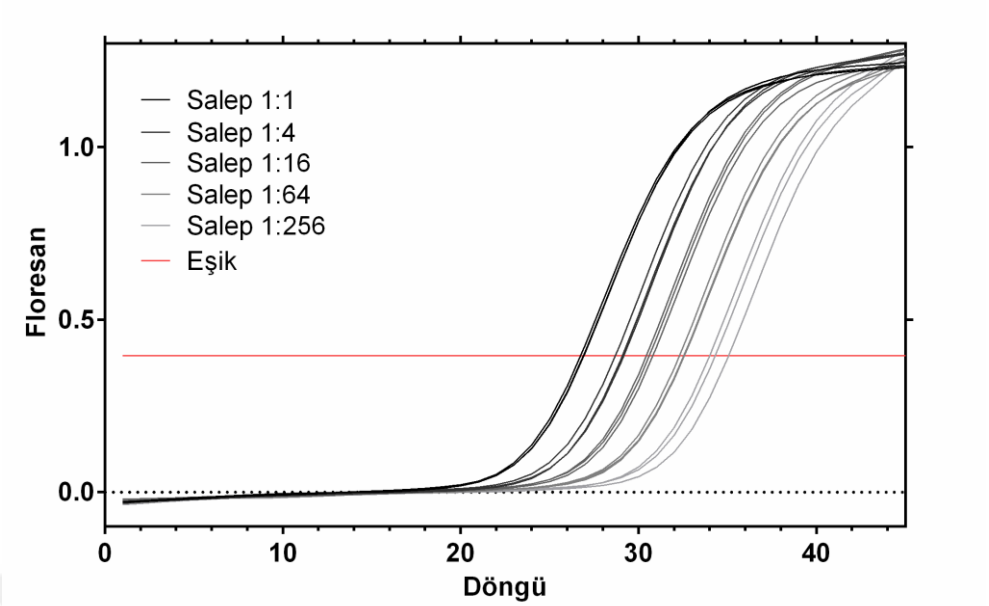
4.4. Gerçek Zamanlı PZR (qPZR)

Salepte teşhis ve miktar tespitinde kullanılabilecek marker bölge arayışında farklı teknikler ve stratejiler değerlendirilmiştir. RAPD primerleri ile yürütülen rastgele genomik amplifikasyon ile türler arasında ortak olarak çoğalan bölgeler gözlemlense de gerçek zamanlı PZR (qPZR) analizleri için ITS2a bölgesinden tasarlanmış olan primerlerin daha uygun olacağı anlaşılmıştır.

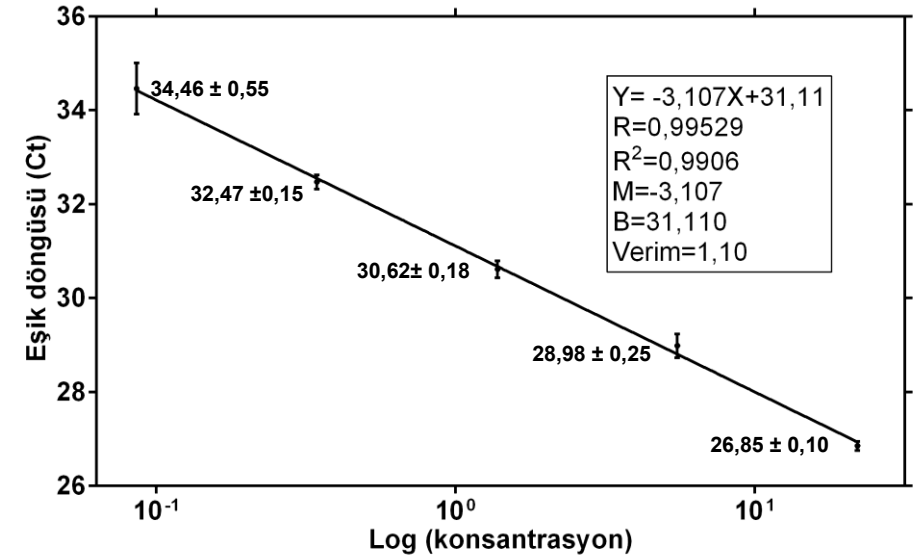
4.4.1. ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftlerinin qPZR reaksiyon verimliliğinin belirlenmesi

Klasik PZR ile karşılaştırıldığında gerçek zamanlı PZR'nin (qPZR) en başta gelen avantajı kantitatif (nicel) ölçüm yapılabilmesine olanak vermesidir. Kantitatif analizlerde içsel bir kontrolün kullanılması özellikle analiz edilecek olan örneklerin karmaşık yapıya sahip işlenmiş ürünler olduğu durumlarda çok önemlidir. Bu çalışmada ITS2 bölgesinin amplifiye edilmesi için çalışma kapsamında tasarlanan ~180 bç fragment oluşturan ITS2a F/R primerleri kullanılarak salep tespiti ve kantifikasyonu hedeflenmiştir. İçsel kontrol olarak ise tüm ökaryot hücrelerde amplifikasyon sağlayan nükleer 18S rRNA genine ait 140 bç uzunluğundaki bir bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir.

ITS2a F/R primer çiftinin qPZR için reaksiyon verimliliğinin belirlenmesi amacıyla C13-*Orchis italica*'dan (taze yumru) elde edilen DNA (22 ng/µl) örneğinden Qiagility cihazında 4'er kat 5 kez seyreltilmesi ile (1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256) seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlar ile elde edilen amplifikasyon grafiği Şekil 4.30'da, standart eğrisi ve reaksiyon verimliliği ise Şekil 4.31'de verilmiştir.



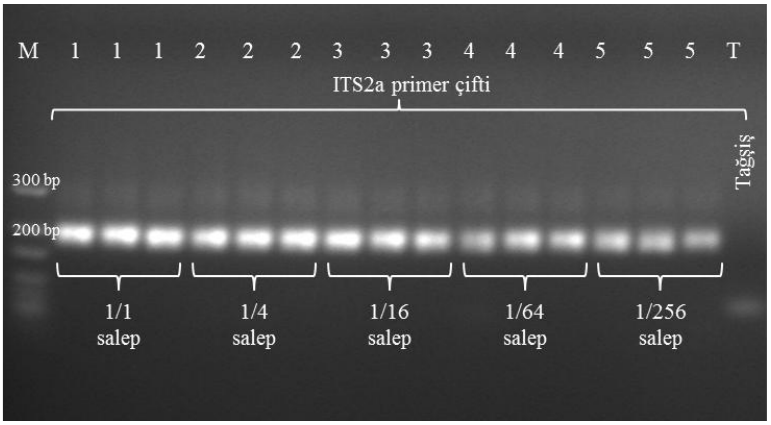
Şekil 4.30. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA seri dilüsyonları ile verdiği amplifikasyon grafiği



Şekil 4.31. ITS2a F ve R primer çifti için qPZR reaksiyon verimliliği ve elde edilen standart eğri

Gerçek zamanlı PZR analizinde keçiboynuzu zamkı tağşiş materyali olarak kontrol edilmiştir. Standart eğri üzerinde de ifade edildiği gibi, R^2 değeri 0,99061 (≥0,98), standart eğrinin eğimi -3,107 (-3,6 ≤ M ≤-3,1), ve verim %110 olarak hesaplanmıştır.

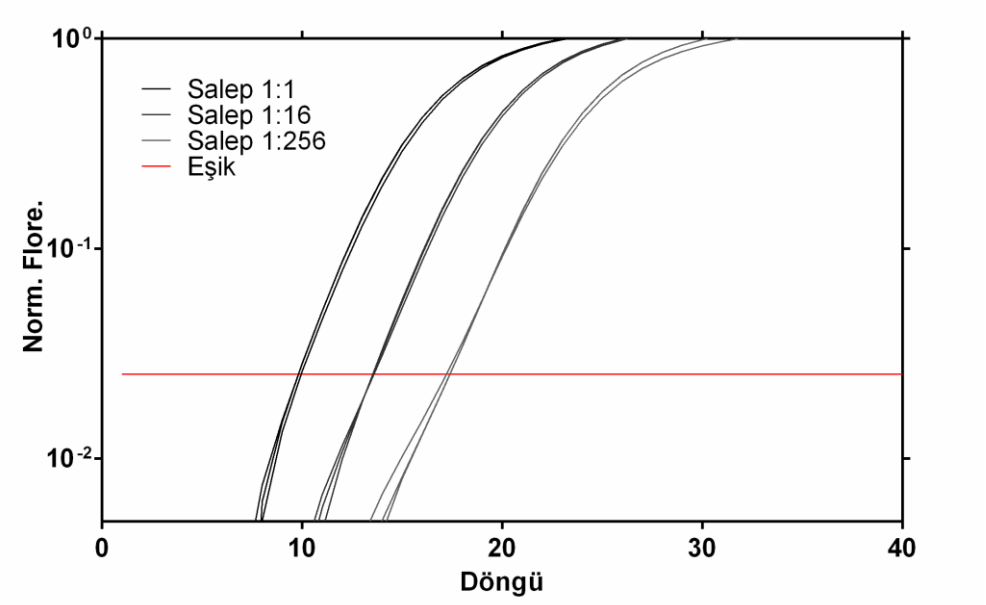
Reaksiyon ürünleri jelde yürütülmüş ve primerlerin spesifitesi kontrol edilmiştir (Şekil 4.32). Reaksiyon ürünlerinin jelde yürütülmesi sonucunda yalnızca spesifik olarak hedeflenen fragmentin amplifikasyonunun gerçekleştiği görülmüştür.



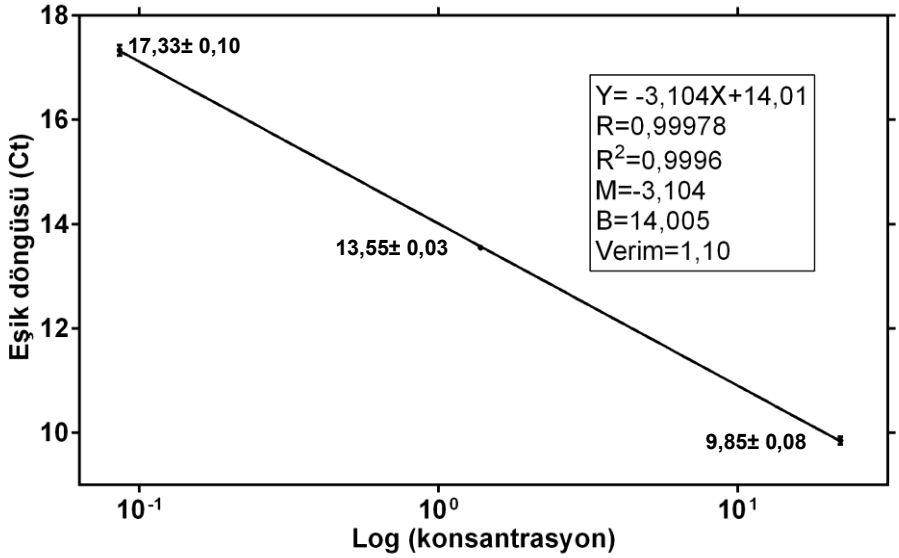
Şekil 4.32. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA dilüsyon serisi ile qPZR reaksiyon sonucunda elde edilen ürünlerinin %4 agaroz jel görüntüsü

Yapılan bu analizler salep DNA'sı kalıp olarak kullanıldığında ITS2a F/R primer çiftinin iyi bir verimlilikle ve spesifik olarak çalıştığını göstermiştir.

Gerçek zamanlı PZR denemelerinde dahili kontrol olarak 140 bç büyüklüğünde PZR ürünü veren 18S rRNA F/R primer çifti kullanılmıştır. Şekil 4.33'te amplifikasyon eğrisi, Şekil 4.34'te ise standart eğri grafiği gösterilmektedir. Standart eğri üzerinde de ifade edildiği gibi, R^2 değeri 0,9996 (≥0,98), standart eğrinin eğimi -3,104 (-3,6 ≤ M ≤-3,1), ve verim %110 olarak hesaplanmıştır.

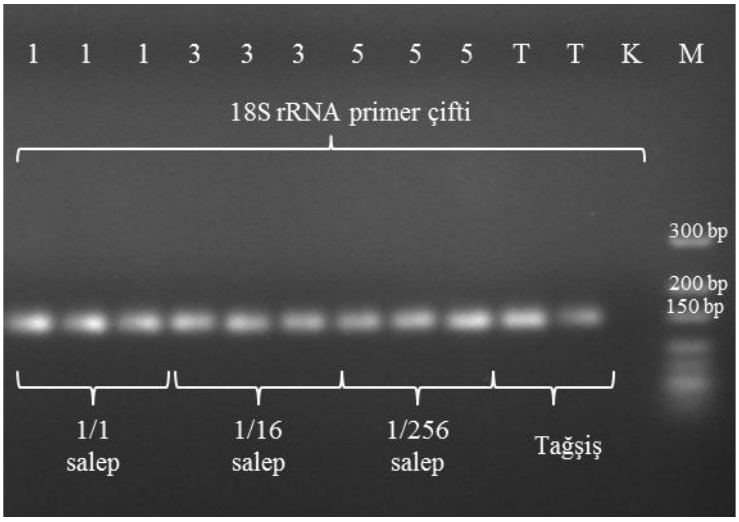


Şekil 4.33. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep DNA seri dilüsyonları ile verdiği amplifikasyon grafiği



Şekil 4.34. 18S rRNA F/R primer çifti için qPZR reaksiyon verimliliği ve standart eğri

Dahili kontrol için elde edilen PZR ürünleri jelde yürütülerek ürünlerin 18S rRNA F/R primer çifti ürünü olduğu kontrol edilmiştir (Şekil 4.35). Reaksiyon ürünlerinin jelde yürütülmesi sonucunda tağşiş materyalinde beklenildiği gibi hedeflenen fragmentin amplifikasyonunun gerçekleştiği görülmüştür. Dahili kontrol primerleri ile yürütülen bu reaksiyonlar tağşiş materyalinde de PZR ürünü verebilecek miktar ve kalitede DNA bulunduğunu doğrulamıştır. Gerçek zamanlı PZR analizinde elde edilen Ct değerleri Ek 5'de verilmiştir.



Şekil 4.35. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep DNA dilüsyon serisi ile qPZR reaksiyon sonucunda elde edilen ürünlerinin %4 agaroz jelde görüntüsü

Primer çiftlerinin reaksiyon verimliliği salep karışım DNA'sı ile ayrı olarak tekrar belirlenmiştir. Bunun için Türkiye'nin farklı bölgelerinden tedarik edilen salep

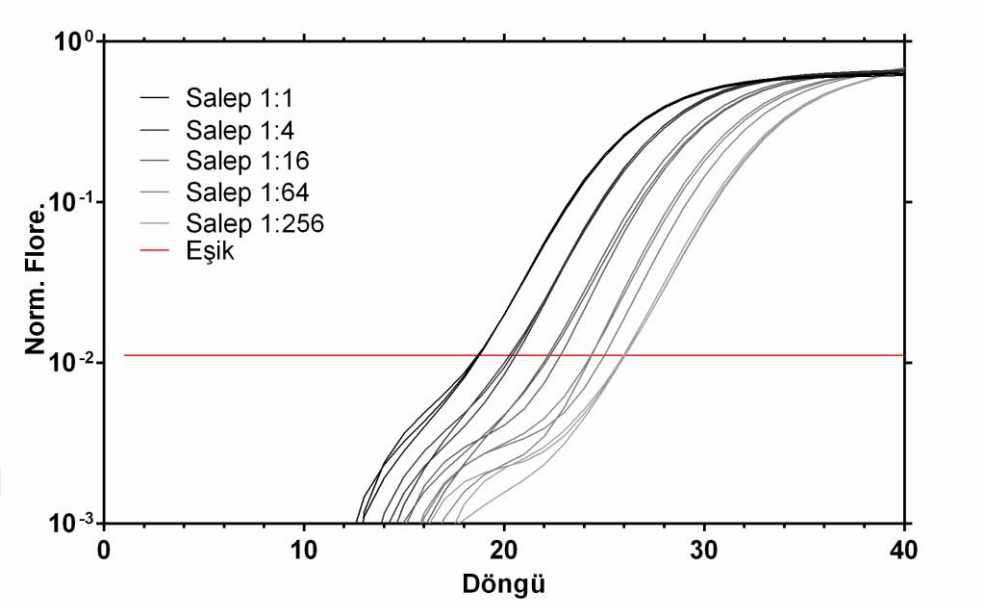
yumru örnekleri kullanılmıştır (Şekil 4.36). Şekilde görülen yumrular salep tüccarından satın alınan, yumruların haşlanması ve kurutulması işlemleri ile elde edilen otantik salep ürünleridir. Bu örnekler TissueLyser II (Quiagen) cihazı ile bilyalı çelik kavanoz adaptöler (Retsch) içinde 30 Hz'de 2 dk süresince öğütülerek temsili toz salep örneği elde edilmiştir. Öğütülen 20 yumrunun herbirinden 800 mg alınmış ve toplam 16 g toz salep karışımı 50 ml'lik tüp içerisinde homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştılmıştır. Elde edilen karışımdan 400 mg örnek alınarak DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA 5 ng/µl olacak şekilde normalize edilmiştir.



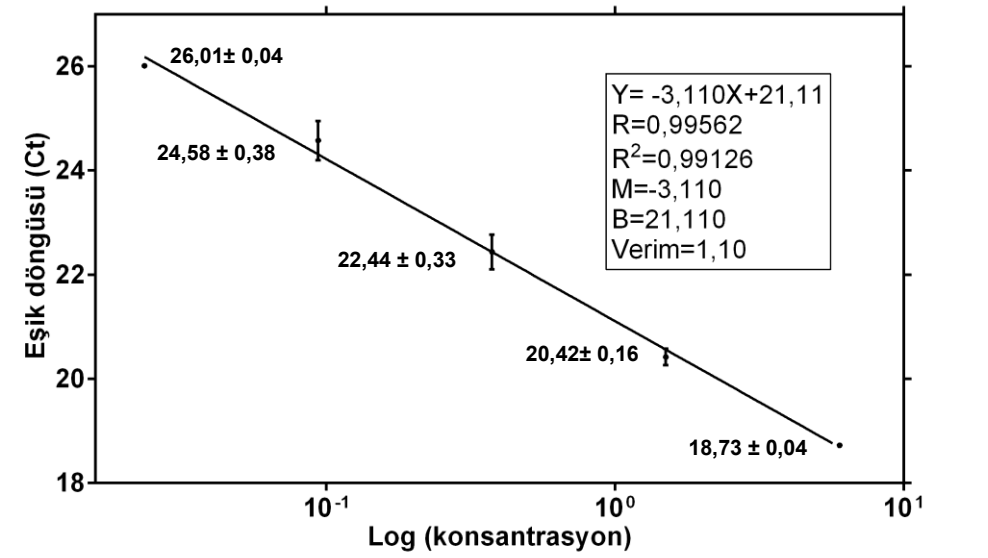
Şekil 4.36. Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen çekirdek salep örnekleri

Elde edilen DNA örneğinden Qiagility cihazında 4'er kat 5 kez seyreltilmesi ile (1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256) seri dilüsyonları hazırlanmıştır. ITS2a F/R primer çifti için, seri DNA dilüsyonları ile elde edilen amplifikasyon grafiği Şekil 4.37'de ise amplifikasyon grafiği, Şekil 4.38'de ise standart eğri ve reaksiyon verimliliğine ilişkin değerler, verilmiştir.

Standart eğride görüldüğü gibi ITS2a F/R primer çifti için R^2 değerinin 0,99126, standart eğrinin eğiminin -3,110 ve veriminin ise %110 olduğu hesaplanmıştır.

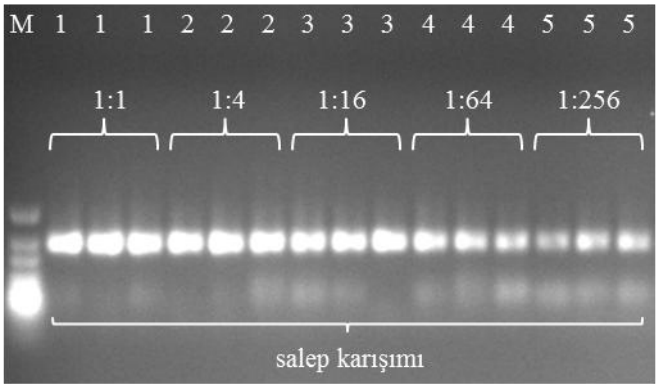


Şekil 4.37. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA'sı ile gerçek zamanlı PZR'de elde edilen amplifikasyon grafiği



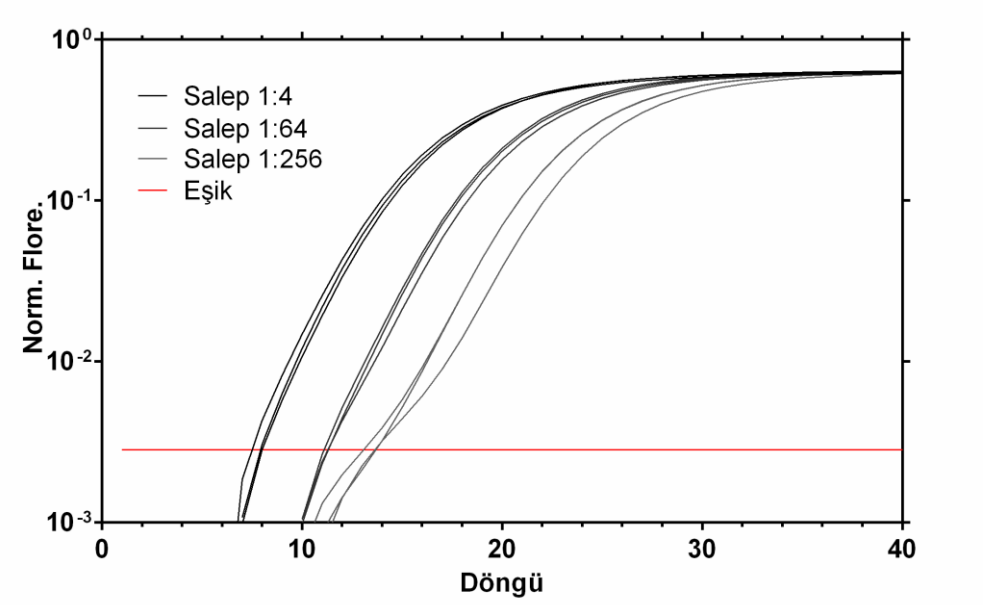
Şekil 4.38. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA seri dilüsyonları ile oluşturduğu standart eğri

Elde edilen PZR ürünleri agar jelde yürütülerek amplifikasyonun kontrolü sağlanmıştır (Şekil 4.39). Beklenildiği üzere, dilüsyona paralel olarak bant parlaklığının azaldığı görülmektedir. Ayrıca ITS2a primer çiftinin yaklaşık 20 pg DNA ile jelde görünür bant vermektedir. Bu durum, klasik PZR ile yapılan var yok analizlerlerinde tasarlanan primerlerin etkin şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

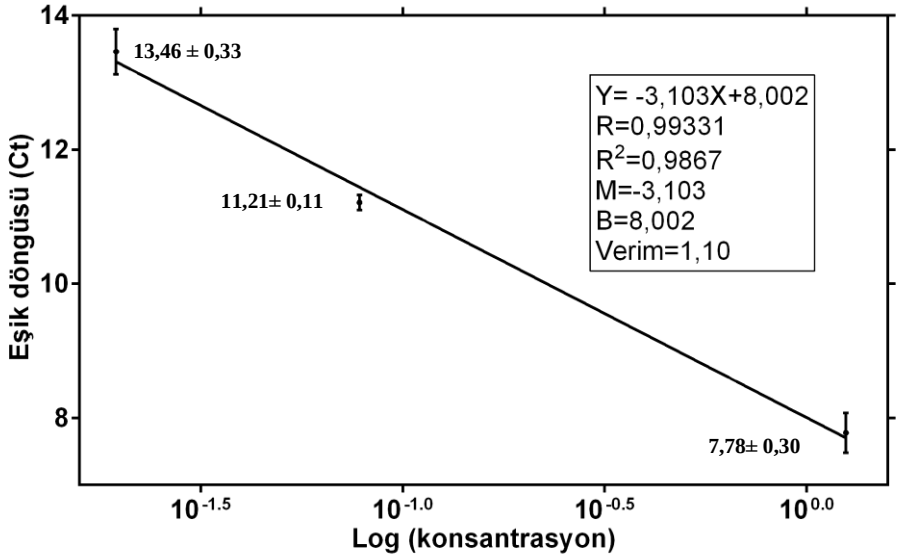


Şekil 4.39. ITS2a F/R primer çiftinin salep DNA dilüsyonu ile oluşturduğu realtime PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

Elde edilen aynı DNA dilüsyon serileri ile 18S rRNA F/R primer çifti için, elde edilen amplifikasyon grafiği Şekil 4.40'ta, standart eğri ve reaksiyon verimliliği ise Şekil 4.41'de verilmiştir. Standart eğride de ifade edildiği gibi 18S rRNA F/R primer çifti için R^2 değerinin 0,9867, standart eğrinin eğimin -3.103 ve amplifikasyon veriminin ise %110 olduğu hesaplanmıştır. Gerçek zamanlı PZR analizinde elde edilen Ct değerleri Ek 6'da verilmiştir.



Şekil 4.40. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep DNA kalıbı ile gerçek zamanlı PZR analizi sonucunda elde edilen amplifikasyon grafiği



Şekil 4.41. 18S rRNA F/R primer çiftinin salep karışım DNA'sı seri dilüsyonu ile yürütülen PZR analizi sonucunda elde edilen standart eğri

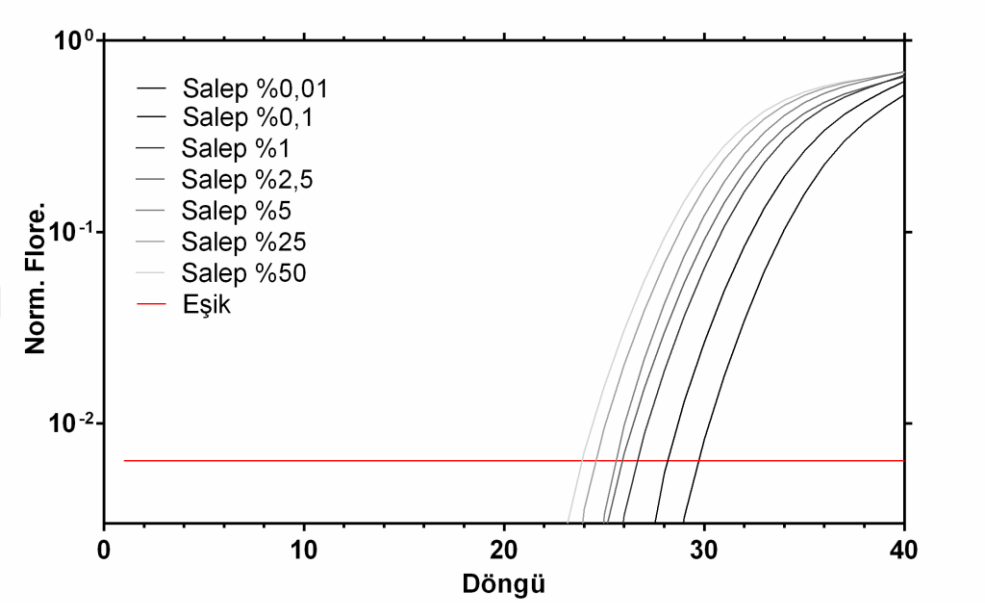
4.4.2. Aynı miktarda salep ve tağşiş materyali (patates nişastası) ile yürütülen qPZR denemesi

Tespit limiti (LOD), gerçek zamanlı PZR analiz metodunun laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük DNA konsantrasyonu; tayin limiti (LOQ) ise miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük DNA konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. LOD değeri DNA konsantrasyonunun başlangıçta ölçülme şeklinede bağlı olup, özellikle çift sarmal DNA'yı ölçen interkalasyon yapan boyaların kullanıldığı yöntemler spektrofotmetrik yöntemlere kıyasla daha güvenilir sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Tespit ve ölçüm limit değerlerinin saptanabilmesi amacıyla patates nişastası ile salep tozu örneklerinde DNA izolasyonu gerçekleştirilerek DNA örneklerinin hacimsel paçalları hazırlanmış ve böylece gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılacak DNA karışımları elde edilmiştir.

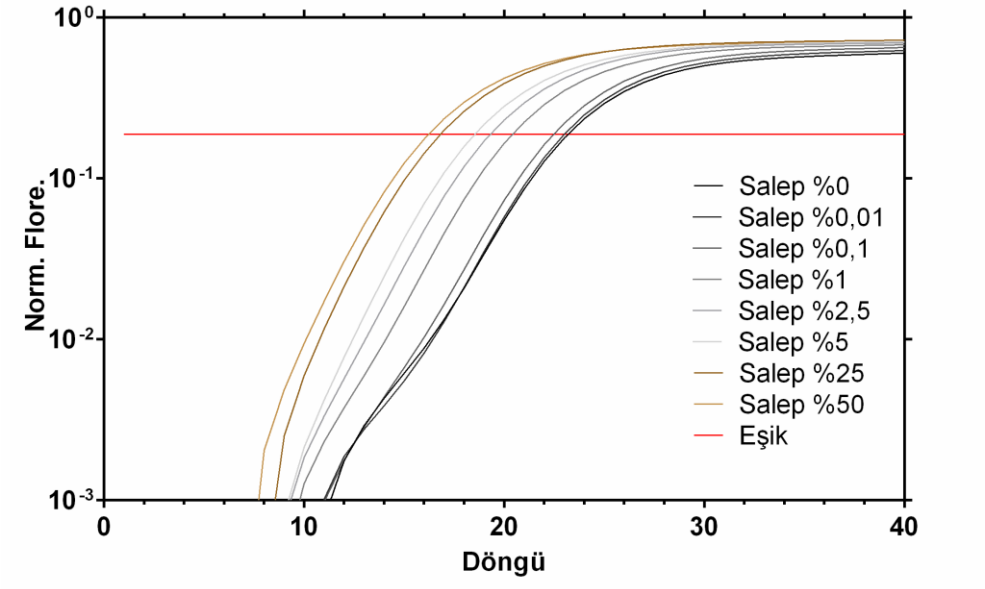
Karışım DNA'larının hazırlanması için öncelikle 200'er mg patates nişastası ve salepten 400 µl elüsyon tamponunda DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasonları ölçülmüştür. Elde edilen salep 5 ng/µl. Aynı miktarda nişastadan izole edilen DNA elüsyonunda ise DNA miktarı tespit edilememiştir. Nişasta işastanı'dan ise ölçüm limiti dışında tespit edilmiştir. Nişasta DNA'sının ölçüm limiti dışında olmasının nedeninin, patates nişastası üretim işlemleri sırasında patatesten gelen DNA'nın çok fazla işleme maruz kalmasından dolayı DNA'nın zarar görmesi, uzaklaştırılan nişasta dışı materyalle birlikte uzaklaştırılması, dolayısıyla nişasta fraksiyonunun içerdiği DNA miktarının hem kalitesiz hemde az miktarda olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak; salep tağşişinde ucuz ve uygun olması sebebiyle tercih edilebilecek bir materyal olduğu için gerçek zamanlı PZR analizinde bu DNA örneğinin kullanılmasına ve hacimsel olarak DNA karışımlarının hazırlanmasına karar verilmiştir. Bunun için örneklerden (%0,01, %0,1, %1, 2,5, %5, %10, %25, %50) salep ve patates nişastası DNA karşımları hazırlamıştır. DNA karışılarının hazırlanması

sonrası hem ITS2a F/R primerleri ile (GOI-gene of interest-ilgili gen) hemde 18S rRNA F/R primerleri (Normaliser-Normalize edici) ile dilüsyon serileri standart eğri oluşturacak şekilde amplifikasyon vermiştir.

Salep karışımı ve patates nişastası DNA'larının karışımından ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri için elde edilen amplifikasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'te verilmiştir.

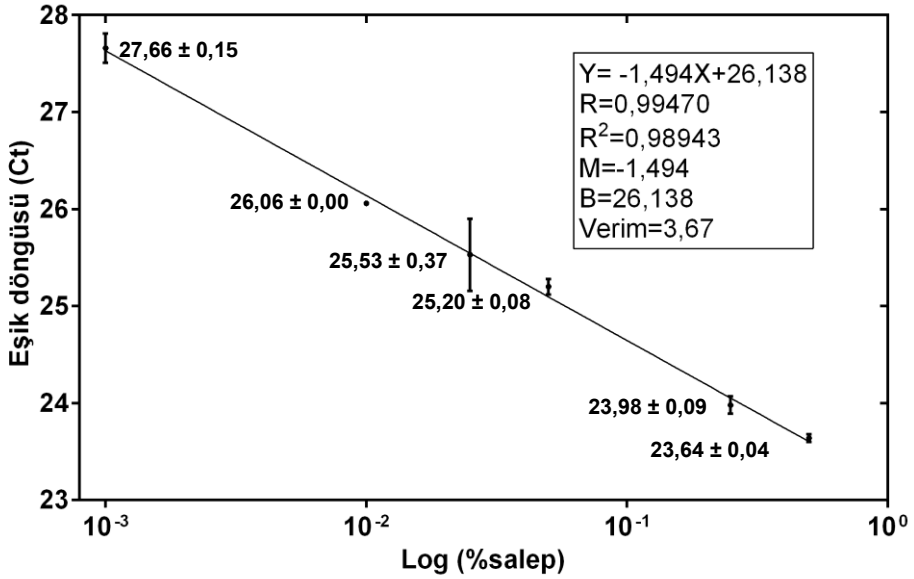


Şekil 4.42. ITS2a F/R primer çifti ile Salep karışımı ve patates nişastası DNA karışımlarından elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon görünümü)

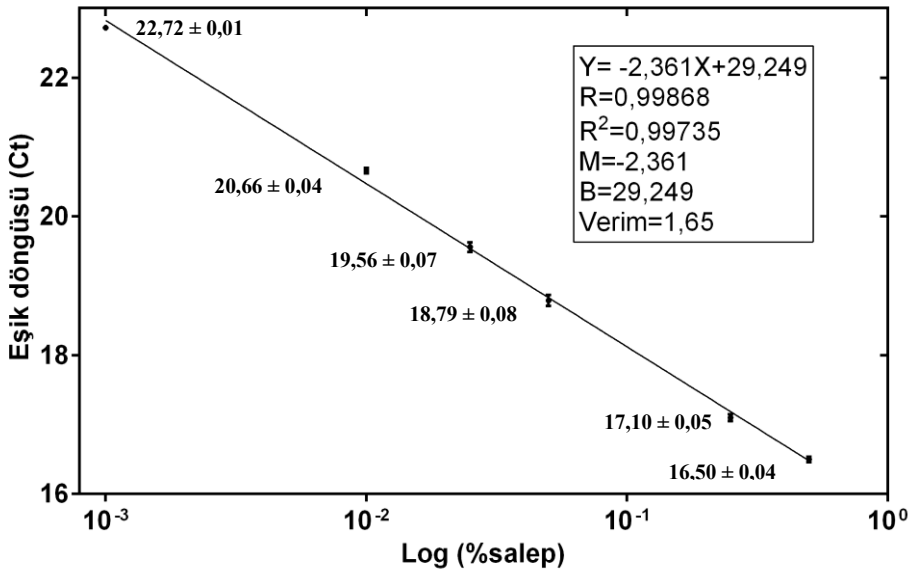


Şekil 4.43. 18S rRNA F/R primer çifti ile salep karışımı ve patates nişastasından izole edilen DNA karışımlarından elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon görünümü)

Salep karışımı ve patates nişastası DNA'larının karışımından ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri için elde edilen starndart eğriler sırasıyla Şekil 4.44 ve Şekil 4.45'te verilmiştir.



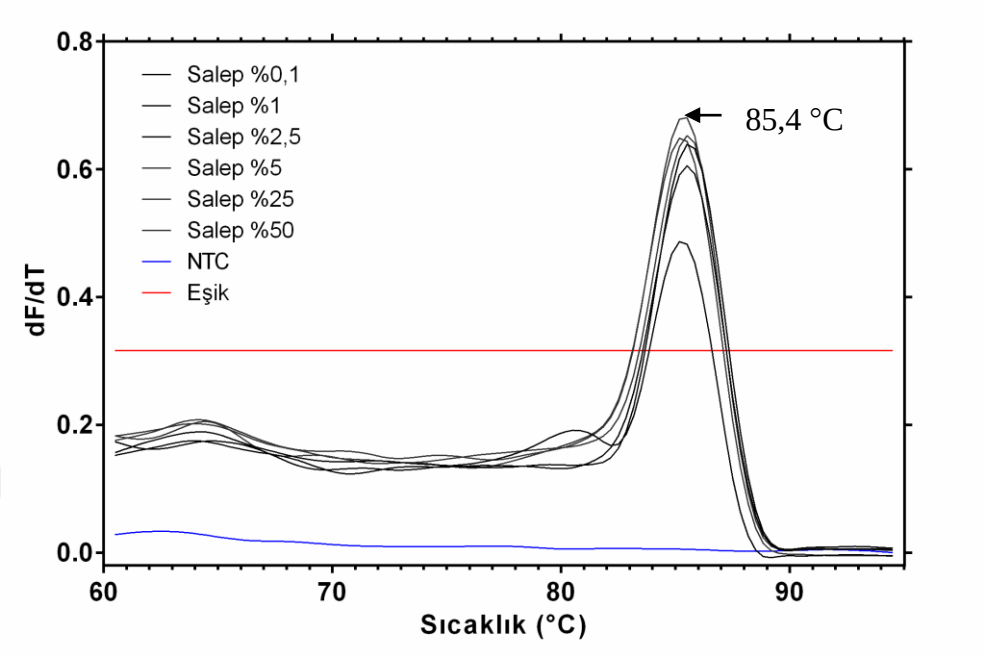
Şekil 4.44. ITS2a F/R primer çifti ile salep ve patates nişastası DNA'ları ile elde edilen paçalların kalıp olarak kullanıldığı PZR sonucunda elde edilen standart eğri



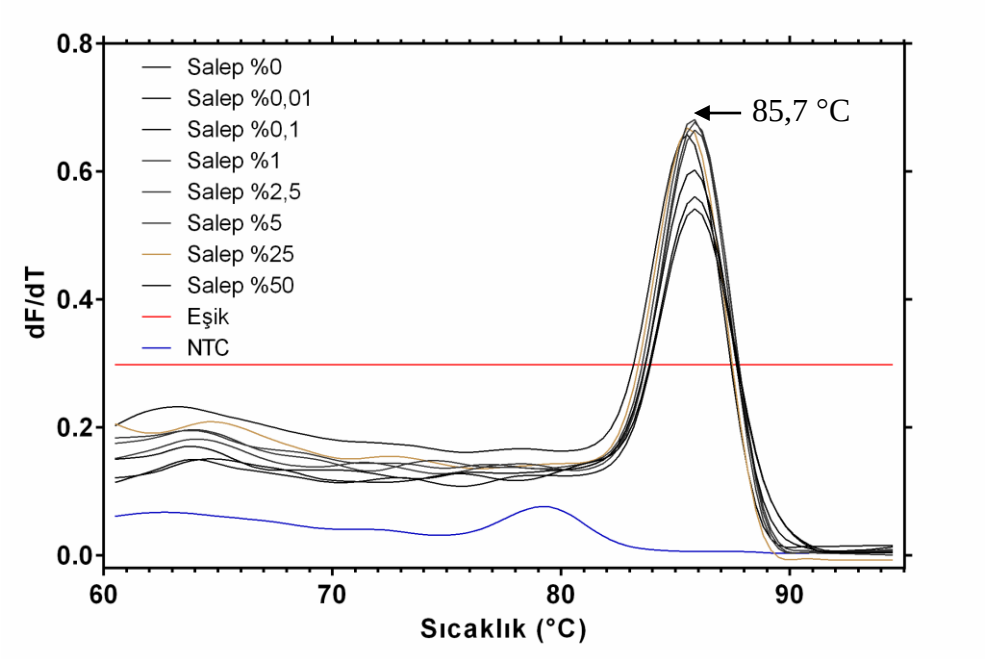
Şekil 4.45. 18S rRNA F/R primer çifti kullanılarak salep karışımı ve patates nişastası DNA karışımların ile elde edilen standart eğri.

Salep ve patates nişastası DNA'larının karışımından ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri için elde edilen erime eğrisi grafikleri sırasıyla Şekil 4.46 ve Şekil

4.47'de verilmektedir. Hem ITS2a hem de 18S RNA primerleri için ürünler 85 °C civarında pik yapmaktadır.



Şekil 4.46. ITS2a F/R primer çifti ile elde edilen erime eğrisi analizi



Şekil 4.47. 18S rRNA F/R primer çifti ile elde edilen erime eğrisi analizi

Salep ve patates nişastası DNA'larının karışımından ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftlerinden oluşan amplifikasyon sonucu elde edilen gerçek konsantrasyon ve hesaplanan konsantrasyonlar ile birlikte Ct değerleri ortalaması ve varyasyon katsayısı Çizelge 4.9'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.9 ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri ile salep-patates nişastası DNA karışımlarından elde edilen bazı qPZR verileri

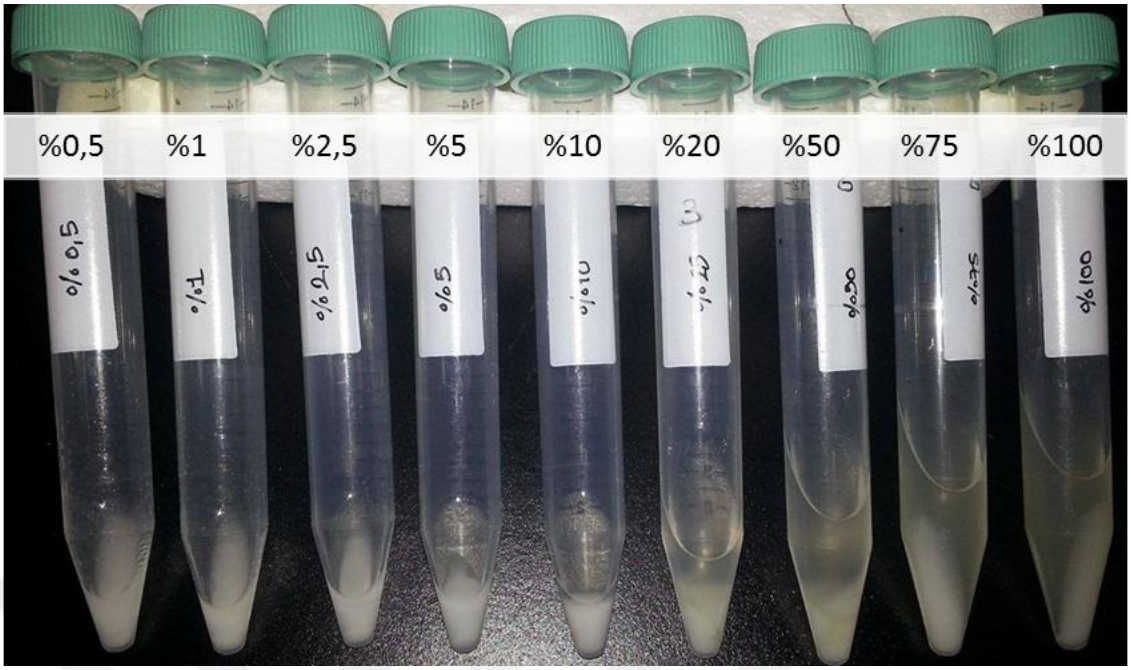
Gerçek konsantrasyon (%)	ITS2a-amplifikasyon konsantrasyonu (%)	Hata[a] (%)	Ct ortalaması ± SS[b]	18S rRNA-amplifikasyon konsantrasyonu (%)	Hata (%)	Ct ortalaması ± SS
0,1	0,10	16,15	27,66 ± 0,15	0,05	51,55	22,72 ± 0,01
1	1,13	13,15	26,06 ± 0,00	0,54	45,65	20,66 ± 0,04
2,5	2,56	33,15	25,53 ± 0,37	1,98	20,70	19,56 ± 0,07
5	4,27	19,25	25,20 ± 0,08	4,90	6,55	18,79 ± 0,08
25	27,92	12,20	23,98 ± 0,09	35,77	32,80	17,10 ± 0,05
50	47,27	5,40	23,64 ± 0,04	71,66	38,80	16,50 ± 0,04

[a] Hata : (gerçek değer-hesaplanan değer)/gerçek değer, [b] SS: Standart sapma

Elde edilen grafikler her ne kadar yüksek lineer uyumluluk gösteriyor olsa da, bu değerler üzerinden bağıl kantifikasyon yapılabilmesi mümkün olmamaktadır. Diğer bir değişle, nişastadan gelen DNA, Ct değerlerinde kayda değer bir değişime neden olmadığı için bağıl kantifikasyon yapılamamaktadır. Nişastadan gelen DNA'nın salepten gelen DNA'ya oranla çok daha az miktarlarda olmasının bu duruma neden olduğu düşünülmektedir. DNA izolasyonundan başlayarak aynı yöntemle aynı miktarda farklı materyaller kullanılarak bu çalışmalar yürütülmüştür. Ancak, hem spesifik hem dahili kontrol amplifikasyonunda lineer modelle uyumlu sonuçlar elde edilse de, nişastadan gelen DNA'nın salep DNA'sına oranla gözardı edilebilecek bir amplifikasyon vermesi ve her iki primer çiftinin mevcut kalıpla (ITS2a için sadece salepte; 18S için hem salep hem nişastada) iyi bir verimlilikle çalışmasından kaynaklanmaktadır.

4.4.3. Salep ve nişasta toz karışımlarından elde edilen DNA örnekleri ile yürütülen qPZR denemeleri

Artan oranda (% 0,5; 1; 2,5; 10; 20; 50; 75 ve 100) salep tozu içeren salep-patates nişastası paçalları hazırlanmış ve bunlardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlarda salep oranı arttıkça gözle görünür şekilde artan musilajlı bir yapı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.48). Bu durumun salepte doğal olarak fazla miktarda bulunan glukamannan bileşiminde zamksı maddelerden kaynaklandığı düşünülebilir. İlerleyen aşamalarda yapılan analizler sonucunda müsilaj yapının artması ile ters orantılı şekilde örneklerin DNA kalitesinde azalma olduğu tespit edilmiştir.



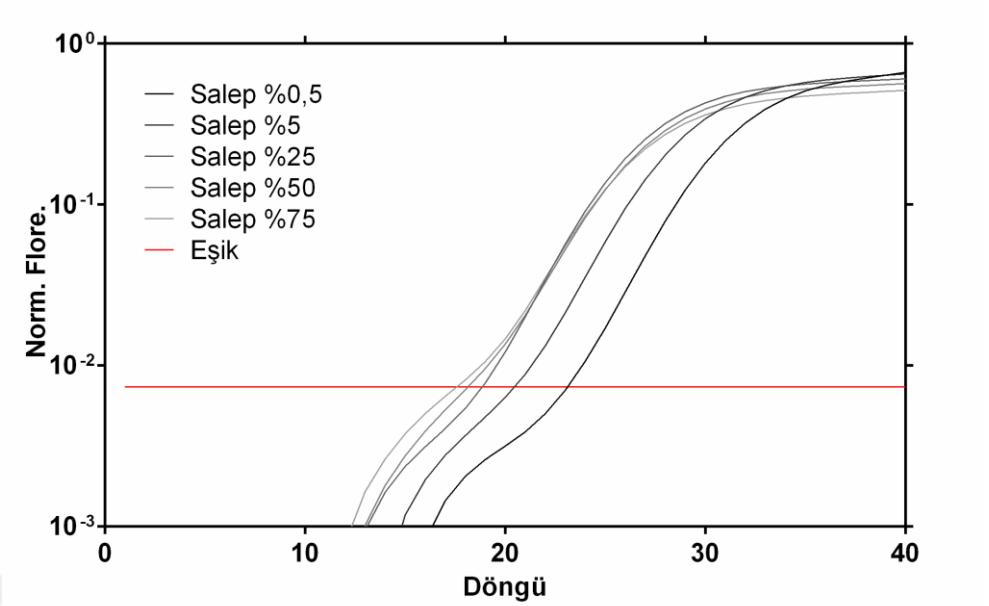
Şekil 4.48. Salep nişasta karışımlarından DNA izolasyonu sırasında alınan bir görüntü. Süpernatan alındıktan sonra kalan zamksı fraksiyon berrak bir sıvı olarak görülebilmektedir

Salep ve nişasta paçallarından elde edilen DNA konsantrasyonları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Daha önce de izah edildiği şekilde, nişastadan ölçülebilecek miktarlarda izolasyon mümkün olmamaktadır, dolayısıyla paçallardan elde edilen DNA'nın neredeyse tamamının salepten kaynaklandığı düşünülebilir. Paçallardan izole edilen DNA örnekleri qPZR analizinde kullanılmıştır.

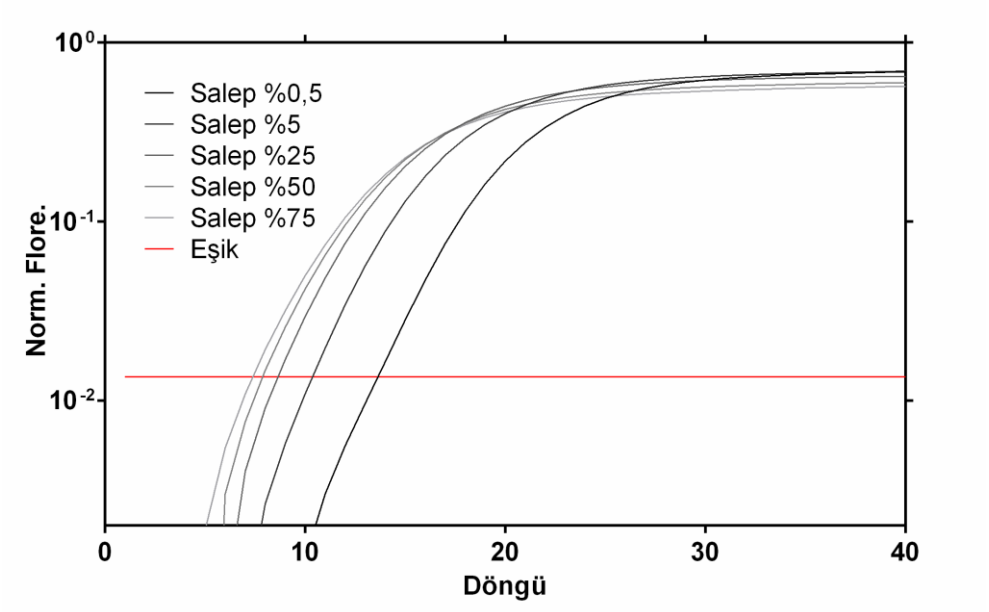
Çizelge 4.10. Salep karışımı ve patates nişastası % karışımları ve konsantrasyonları

Karışım (% salep)	**Salep (mg)**	**Nişasta (mg)**	**DNA konsantrasyonu (ng/µl)**
100	100	-	20,1
75	75	25	15,1
50	50	50	8,76
25	25	75	7,72
5	5	95	2,17
0,5	0,5	99	-
0	0	100	-

Salep ve patates nişastası karışımlarından elde edilen DNA'ların ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri ile elde edilen amplifikasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.49 ve Şekil 4.50'de gösterilmektedir.



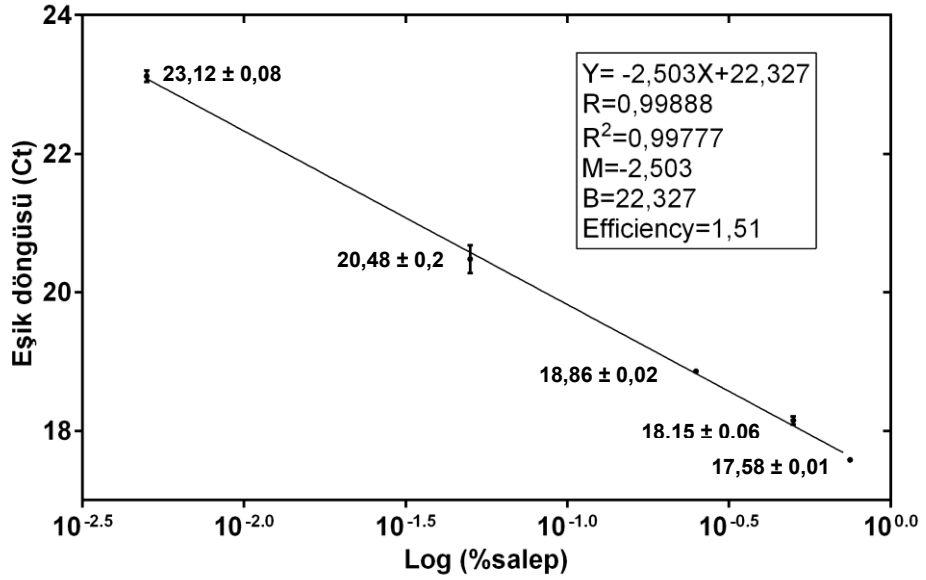
Şekil 4.49. Salep nişasta karışım DNA'larından ITS2a F/R primer çifti ile elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon görünümü)



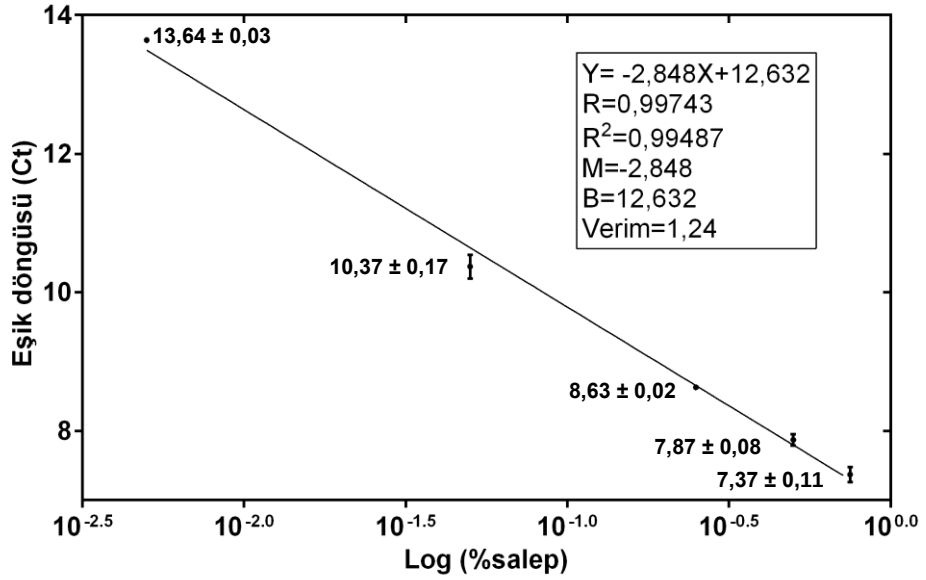
Şekil 4.50. Salep nişasta karışım DNA'larından 18S rRNA F/R primer çifti ile elde edilen amplifikasyon grafiği (replikasyon görünümü)

Salep karışımı ve patates nişastası karışımlarından elde edilen DNA'lar ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri ile elde edilen standart eğriler sırasıyla Şekil 4.51 ve Şekil 4.52'de verilmektedir. Her iki primer çiftiyle elde edilen standart eğrilerde R^2 değerinin >%99 olduğu belirlenmiştir. Buradan, her iki primer çiftinde de amplifikasyonun kalıp DNA oranı ile koralasyonun yüksek olduğu anlamına gelir. Böyle olmasının sebebi DNA izolasyonunda açıklandığı şekilde nişastadan DNA gelmemesi ile açıklanabilir. Bu durumda, paçal karışımları ile elde edilen standart

eğriler kullanılarak, ancak sadece nişasta ile tağşişe uğratılmış toz salepte salep oranının tespitine yönelik bir çalışma yürütmek mümkün olabilir (total DNA'ya katkıda bulunacak bir materyal ile tağşiş yapıldıysa miktar tespiti bu şekilde yapılamayacaktır). Bunun için sadece ITS2a primerleri ile standart eğride kullanılan DNA örnekleri ve tağşiş analiz örneğine ait DNA örneği ile kurulmuş bir qPZR yürütülmesi gerekir. Böyle bir çalışmada DNA izolasyonunun da tüm örneklerde standart şekilde uygulanmış olması önemli olacaktır.

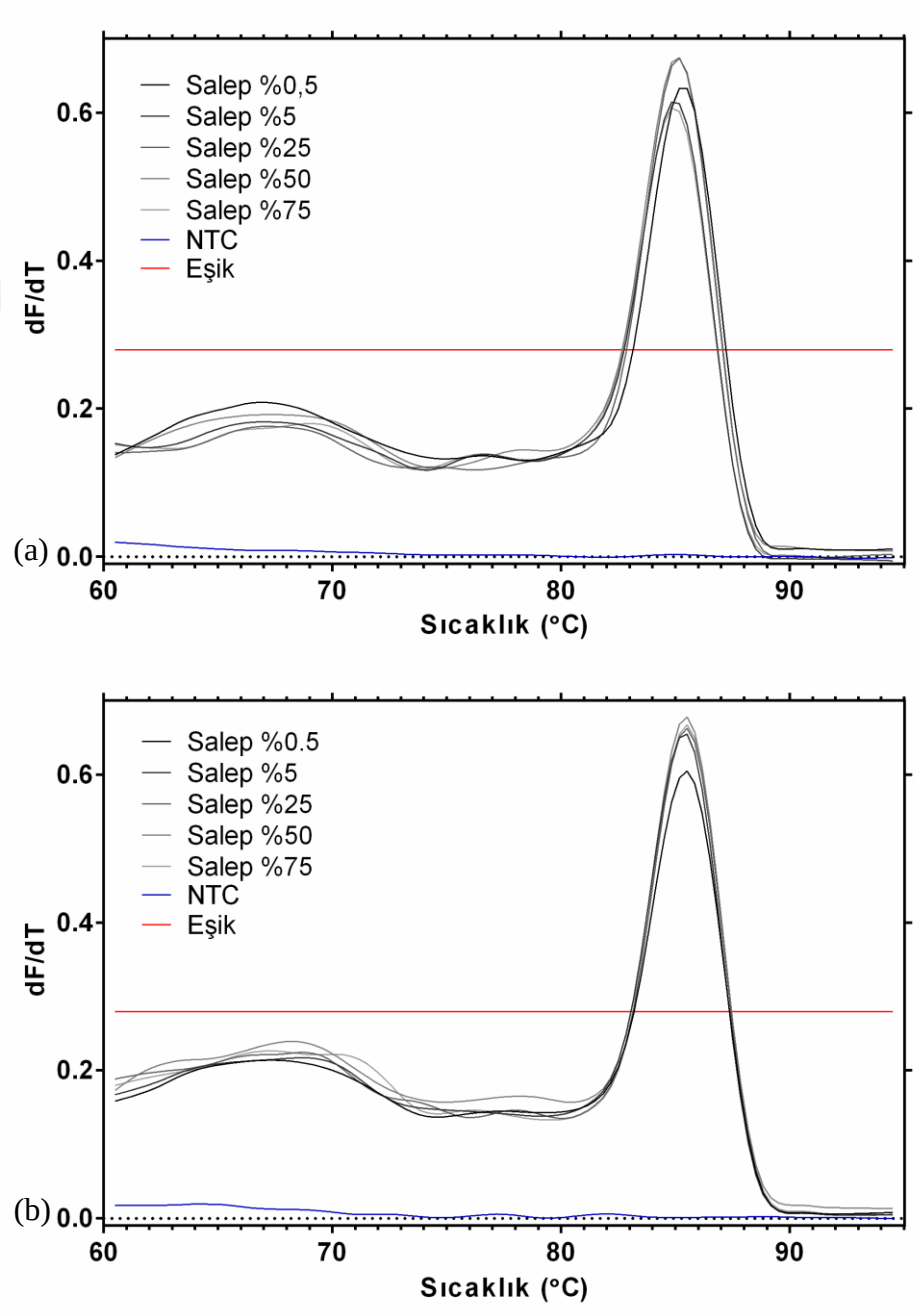


Şekil 4.51. Salep nişasta karışım DNA'larından ITS2a F/R primer çifti ile elde edilen standart eğri



Şekil 4.52. Salep nişasta karışım DNA'larından 18S rRNA F/R primer çifti ile elde edilen standart eğri

Amplifikasyonların spesifitelerinin doğrulanması için erime eğrisi analizleri de yapılmıştır (Şekil 4.53). Erime eğrilerinin analiz edilmesi ile çoğalan fragmentlerin erime sıcaklıkları (T_m değerleri) hesaplanmış spesifik olmayan fragmentlerin reaksiyon sırasında çoğalmadığının doğrulaması yapılmıştır. Elde edilen erime eğrileri yalnızca hedef fragmentin çoğaldığını göstermiş ve ITS2a fragmenti için 85,3 °C, 18S rRNA fragmenti için ise 85,5 °C T_m değerleri elde edilmiştir. Erime eğrilerinden amplifikasyonların spesifik şekilde ürün oluşturduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.53. Salep nişasta karışım DNA'larından **a)** ITS2a F/R (85,3 °C) ve **b)** 18S rRNA F/R primer çiftler (85,5 °C) ile elde edilen PZR ürünlerine ait erime eğrisi (replikasyon görünümü)

Salep ve patates nişastası karışım DNA'larının ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftlerinden oluşan amplifikasyon sonucu elde edilen gerçek konsantrasyon ve hesaplanan konsantrasyonlarla birlikte Ct değerleri ortalaması ve varyasyon katsayısı Çizelge 4.11'de özetlenmiştir.

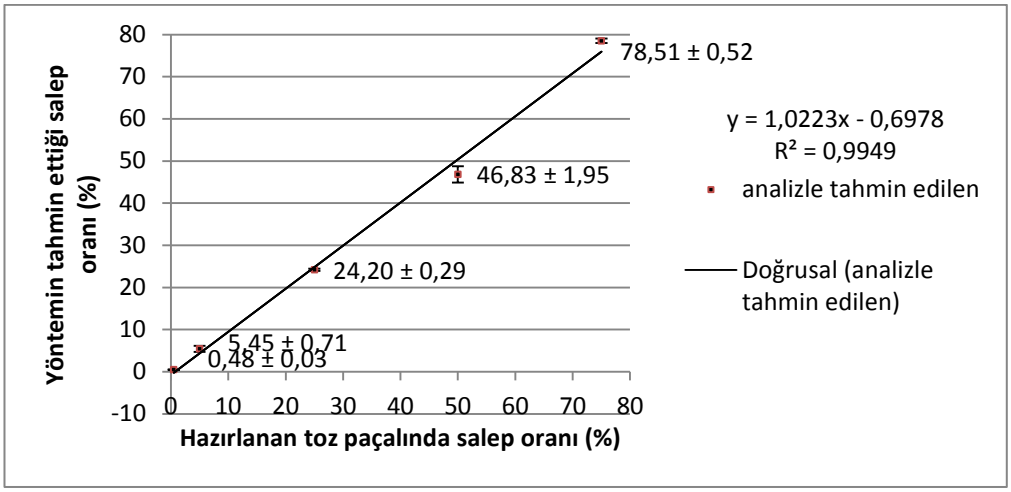
Çizelge 4.11. ITS2a F/R ve 18S rRNA F/R primer çiftleri ile salep-patates nişastası karışım DNA'larından elde edilen bazı qPZR verileri

GK (% salep)	Ct_{ort} ± SS	HK_{ITS2a} (%)	Hata (%)	Ct_{ort} ± SS	$HK_{18S\ rRNA}$ (%)	Hata (%)	HK_{ITS2a}:$HK_{18SrRNA}$
0,5	23,12 ± 0,08	0,48	5,05	13,64 ± 0,03	0,44	11,15	1,09
5	20,48 ± 0,20	5,45	14,10	10,37 ± 0,17	6,23	25,25	0,88
25	18,86 ± 0,02	24,20	3,20	8,63 ± 0,02	25,50	2,00	0,95
50	18,15 ± 0,06	46,83	6,30	7,87 ± 0,08	47,16	5,55	0,99
75	17,58 ± 0,01	78,51	4,20	7,37 ± 0,11	70,44	6,00	1,11

GK: Gerçek konsantrasyon ; HK: hesaplanan konsantrasyon; SS: Standart sapma

Bu noktada yine nişastadan gelen DNA'nın Ct değerlerinde kayda değer bir değişime neden olmadığı görülmektedir. Bu durum 18S rRNA F/R primer çiftlerininde ITS2a F/R primer çiftine yakın bir standart eğri oluşturmasına neden olmuştur. Şekil 4.50'de verilen standart eğride R^2 değerinin >0,99 olabilmesi amacıyla lineer dinamik aralık % 0,5-75 olarak belirlenmiştir. ITS2a ve 18S RNA primerlerinin amplifikasyon ürünlerinin oranına karşılık gelen "bağıl oranın" ise (HK_{ITS2a}:$HK_{18SrRNA}$) her bir örnekte yaklaşık 1 olduğu görülmüştür. Bu durumda tağşiş miktarı saptarken bağıl oranda eğer 1 değerinde anlamlı bir sapma var ise (örneğin <0,8) bu durum bizi tağşiş materyalinden DNA izole edilebildiğinin veya karışımda bulunan saf salepte ITS2a primerlerinin çalışmadığı düşünülebilecektir. Çizelge 4.11'da özetlenen gerçek konsantrasyon değerlerine karşılık yöntem uygulaması ile hesaplanan konsantrasyon (HK_{ITS2a}) lineer modele %99 uyum göstermektedir (Şekil 4.54). bir yöntem olarak değerlendirildiğinde bu analiz için tespit limiti (LOD) değeri %0,09, ölçüm sınırı ise %0,29 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.11'de son sütunda belirtilen belirtilen HK oranının %5'ten itibaren artış eğiliminde olması da nişasta fraksiyonundan artan oranda az miktarda DNA geldiğini ve buradan amplifikasyon olduğunu doğrular niteliktedir.

Bu noktaya kadar yapılan analizlerde %25 ve üzerinde salep içeren örneklerden elde edilen sonuçların daha yüksek doğrusallık sergileyebileceği de öngörülmüştür. Tez çalışmasında amaç esasen tağşiş unsuru olarak saf salebe katılacak kayda değer miktarda nişastanın tespiti yönünde olduğu için, çalışma aralığı bu doğrultuda %25-100 salep olarak belirlenmiştir. Ayrıca %25'in altındaki salep oranları içinde ayrı bir kalibrasyon eğrisi ile miktar belirlemeye yönelik denemeler daha sonra yapılacak çalışmalar arasında düşünülmektedir.

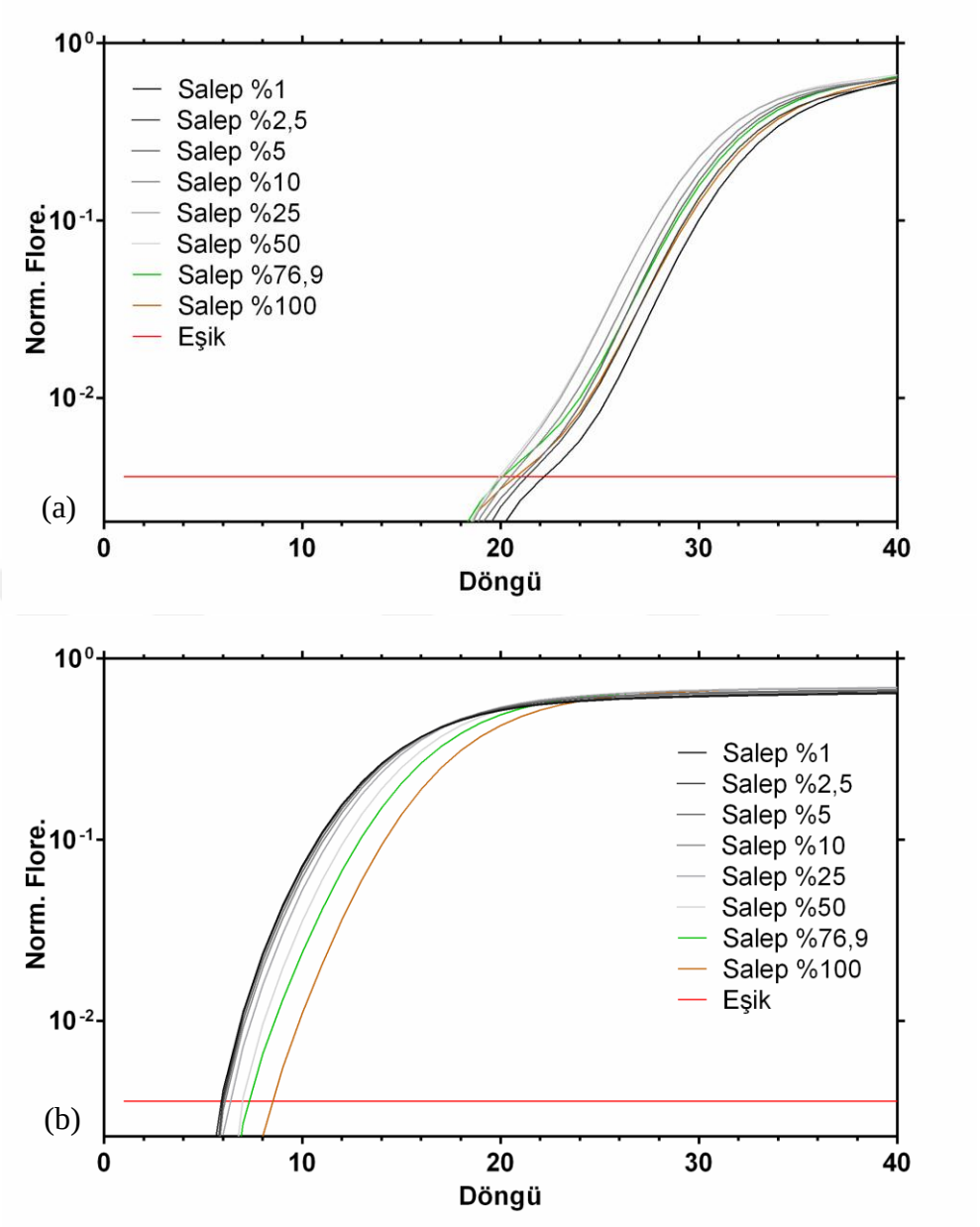


Şekil 4.54. Salep-nişasta karışımında gerçek ve tahmin edilen salep oranları

4.4.4. Mısır unu ve salep DNA'sı kullanılarak kantifikasyon eğrilerinin elde edilmesi

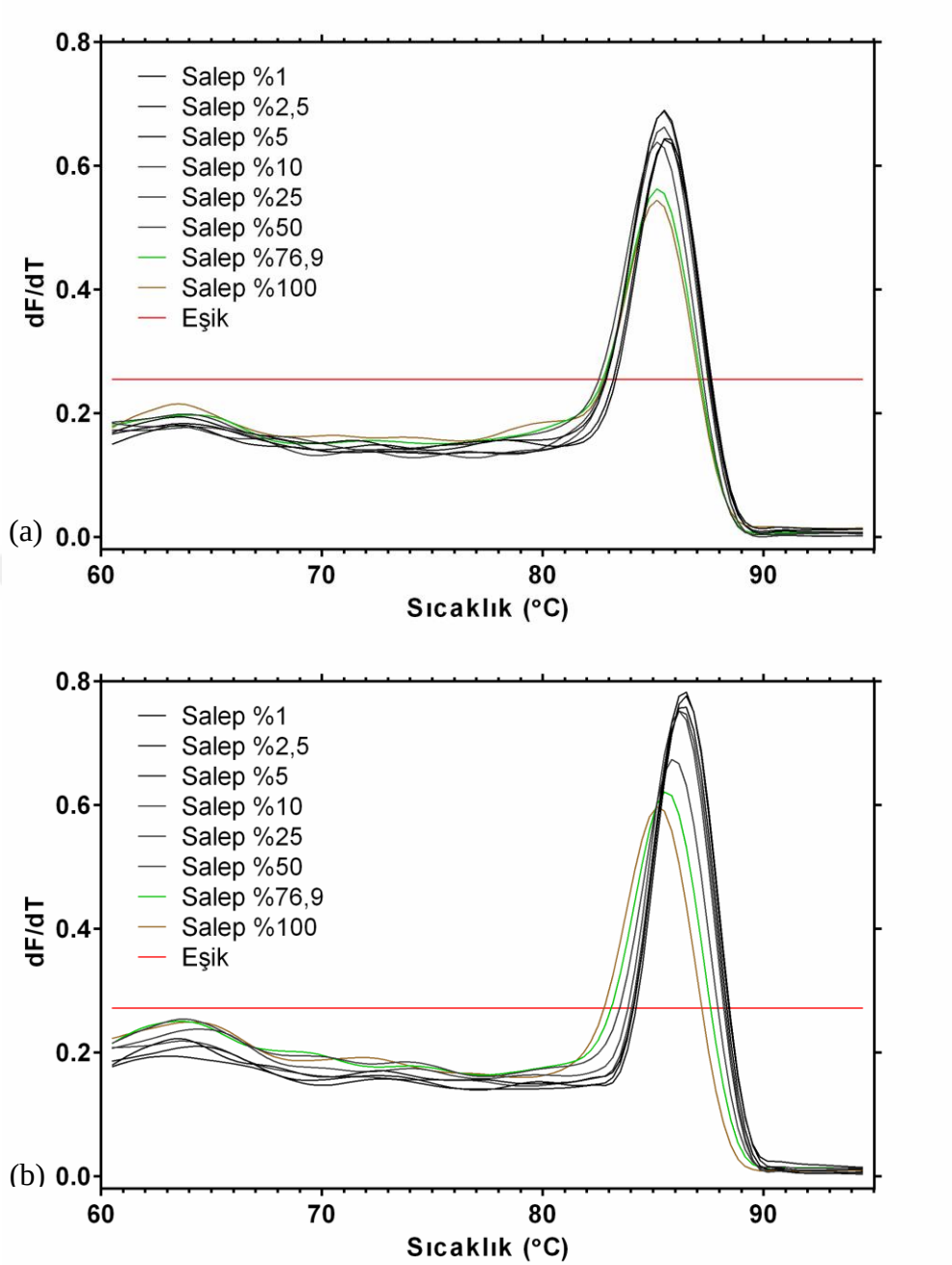
Salep içeceği içeriğinde bulunan ya da salepte tağişiş olarak kullanılabilen bitkisel kaynaklı materyaller genel olarak birbirinden çok farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Bununla beraber bu ürünlerin aşırı işlem görmüş materyaller olması elde edilen DNA kalitesini ve yoğunluğunu önemli ölçüde etkilemektedir. Nişasta elde edilmesi aşamasında görmüş olduğu işlemler, nişastadan gelen DNA'nın kalitesi ve yoğunluğunu önemli orandan azaltmaktadır. Bu nedenle kantifikasyon eğrilerinin oluşturulmasında kullanılabilecek ve daha az işlem görmüş olan mısır unu materyali kullanılarak bazı denemeler yürütülmüştür. Mısır unundan elde edilen DNA ve salep karışımından elde edilen DNA ile miktar belirlemede daha güvenilir sonuçlar veren, DNA ekstraksiyonu sırasında meydana gelen farklılılıkların, DNA kalitesindeki ya da normalizasyondan meydana gelen farklılıkların amplifikasyon verimliliğinde ortaya çıkardığı değişimleri elimine edebilen ΔΔCt metodu kullanılmıştır. Ayrıca dahili kontrolün (18S rRNA F/R primer çiftleri) kullanılması salebe özgü primerlerin amplifikasyon farklılıklarının hedef bölgenin farklı miktarlarda bulunması ya da DNA degredasyonu, PZR inhibisyon gibi DNA'nın kalite ve miktarındaki farklılıkların analiz üzerindeki etkisini anlamamıza olanak vermektedir. Bu amaçla patates nişastasından gelen DNA konsantrasyonunun çok düşük olduğu düşünülerek, mısır unu ve salep karışımından elde edilen DNA'lar farklı oranlarda (%) birbirleri ile karışıtıralarak kullanılarak kantifikasyon eğrileri elde edilmiştir ve ΔΔCt metodu kullanılarak kantifikasyonda kullanılabilecek bir kalibrasyon eğrisi elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu metyoda göre $\Delta\Delta Ct = Ct_{spesifik\ (TS2a\ F/R)} - Ct_{evrensel\ (18S\ rRNA\ F/R)}$ formülüne göre hesaplanmıştır. Ayrıca, dahili standarda ve kalibratöre göre normalize edilmiş hedef miktarı $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ifadesinden hesaplanmıştır.

İkili validasyon için $Ct_{spesifik\ (TS2a\ F/R)}$ ve $Ct_{evrensel\ (18S\ rRNA\ F/R)}$ değerleri sırasıyla mısır unu ve salep karışımlarının türe spesifik ve üniversal primerler ile gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen Ct değerleridir. Şekil 4.55a'da validasyon örneklerinde ITS2a F/R primerleri ile elde edilen amplifikasyon grafiği, Şekil 4.55b'de ise 18S rRNA F/R primerleri ile elde edilen amplifikasyon grafiği gösterilmektedir.



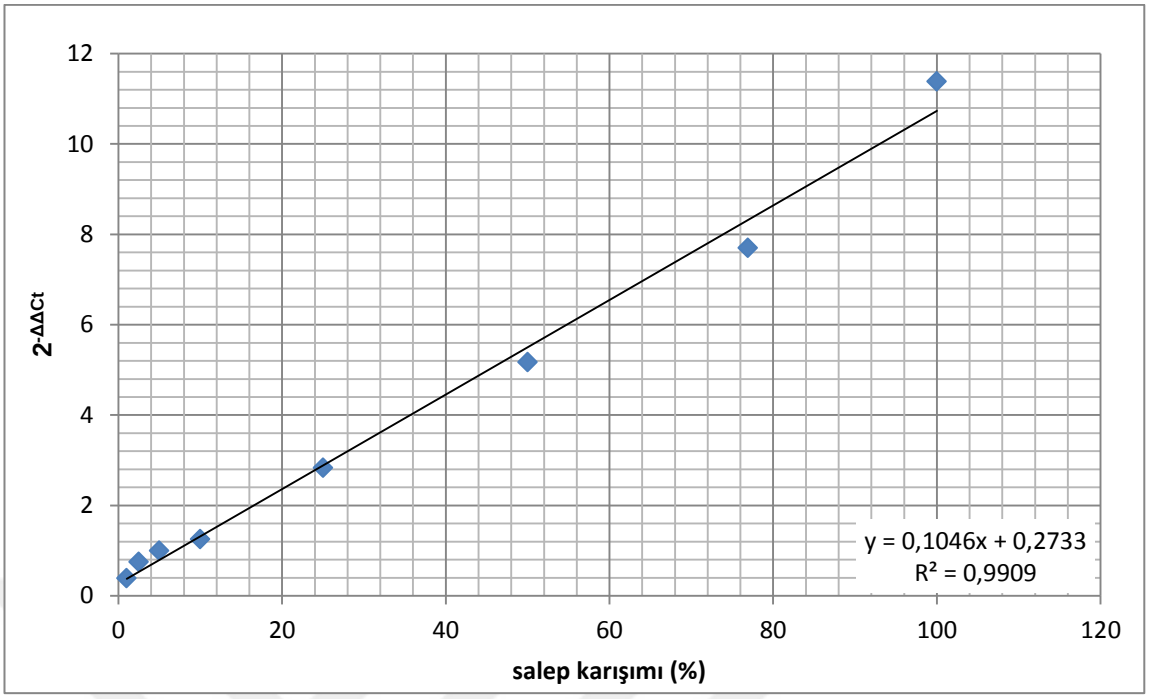
Şekil 4.55. Salep-mısır unu DNA karışımlarının (%1-100 arası salep DNAsı içeren mısır unu DNA'sı) **a)** ITS2a F/R ve **b)** evrensel 18S rRNA F/R primerleri ile qPZR amplifikasyon grafikleri (replikasyon görünümü)

Şekil 4.56'da ise bu reaksiyonlar sonucunda oluşan fragmentlerin erime eğrisi analizlerine ait grafikler verilmiştir.



Şekil 4.56. Salep-mısır unu DNA karışımlarının (%1-100 arası salep DNAsı içeren mısır unu DNA'sı) **a)** ITS2a F/R primer çifti ile ve **b)** 18S rRNA F/R primer çifti ile reaksiyonu sonucu çoğalan fragmentlerin erime eğrisi analizi

ΔΔCt metoduna göre kalibratör olarak seçilen örnek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formulüne göre 1 kabul edilir ve diğer standartlar ve örnekler onun katları şeklinde ifade edilir. Standart eğriler oluşturulurken, %5 salep DNA'sı içeren mısır DNA'sı kalibratör olarak kabul edilmiştir. Şekil 4.57'de yüzde salep-mısır unu DNA'larışımına karşılık $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin çizilmesi ile oluşturulan standart eğri verilmektedir.



Şekil 4.57. Mısır unu DNA'sı içine salep DNA'sı katılarak yapılan hilenin miktarını tahmin etmek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak çizilen kantitasyon eğrisi. Referans gen olarak 18S rRNA F/R kullanılmıştır

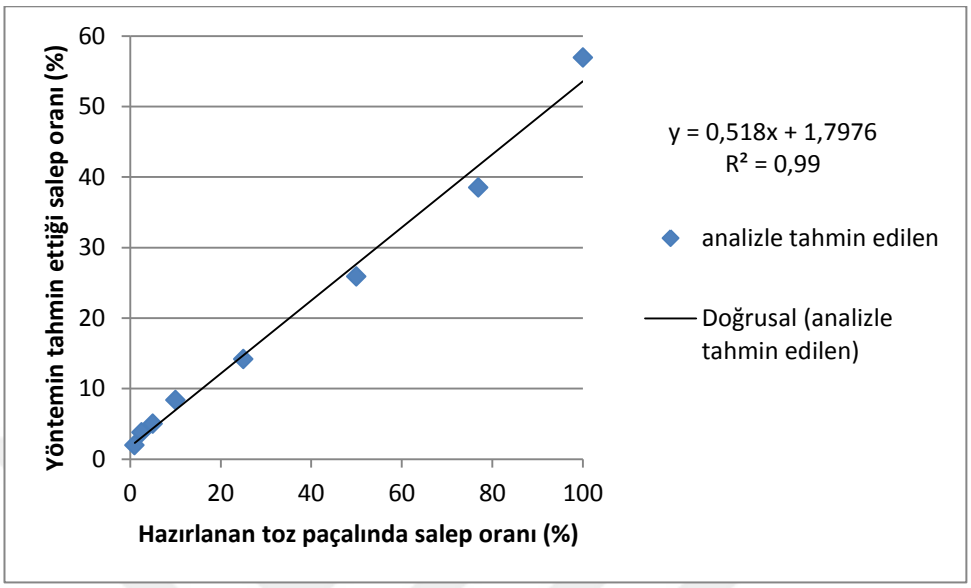
Bilinen miktarlarda salep ve mısır unu DNA'larının ikili karışımlarının salebe özgü ITS2a F/R ve evrensel 18S rRNA F/R primerleri ile analiz edilmesi sonucunda elde edilen Ct değerlerinden, Şekil 4.57'daki kalibrasyon eğrileri kullanılarak miktar tayini gerçekleştirmek üzere hesaplamalar yapılmıştır. Üç paralelli gerçekleştirilen analizler sonucunda analiz yöntemi kullanılarak hesaplanan salep konsantrasyonları (HK) ve hesaplamalarda elde edilen değerler Çizelge 4.12'de özetlenmiştir. Gerçek zamanlı PZR analizinde elde edilen Ct değerleri Ek 7'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Salep DNA miktar tayini için gerçekleştirilen qPZR için kesinlik ve doğruluk değerleri

GK (% salep)	$Ct_{ortITS2a}$ ±SS	$Ct_{ort18SrRNA}$ ±SS	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	HK (% bağıl konsantrasyon)	Hata
1	22,23±0,21	10,44±0,05	11,79	1,37	0,39	1,12	0,12
2,50	21,34±0,48	10,5±0,07	10,84	0,42	0,75	4,56	0,82
5	21,04±0,51	10,62±0,01	10,42	0	1	6,95	0,39
10	20,46±0,17	10,77±0,07	10,1	-0,32	1,25	9,34	-0,07
25	20±0,41	11,08±0,1	8,92	-1,5	2,83	24,44	-0,02
50	19,89±0,69	11,84±0,12	8,05	-2,37	5,17	46,81	-0,06
76,90	20,07±0,2	12,59±0,1	7,48	-2,94	7,7	71,00	-0,08
100	20,78±1,09	13,86±0,38	6,92	-3,5	11,38	106,18	0,06

Tüm değerler 3 paralelli reaksiyon sonuçlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır
Hata = (Hesaplanan-Gerçek değer)/Gerçek değer
GK: Gerçek konsantrasyon
HK: Hesaplanan konsantrasyon
SS: Paralel 3 değerin standart sapması

Çizelge 4.12'de özetlenen gerçek konsantrasyon değerlerine karşılık yöntem uygulaması ile hesaplanan konsantrasyon (HK_{ITS2a}) lineer modele %99 uyum göstermektedir (Şekil 4.58).



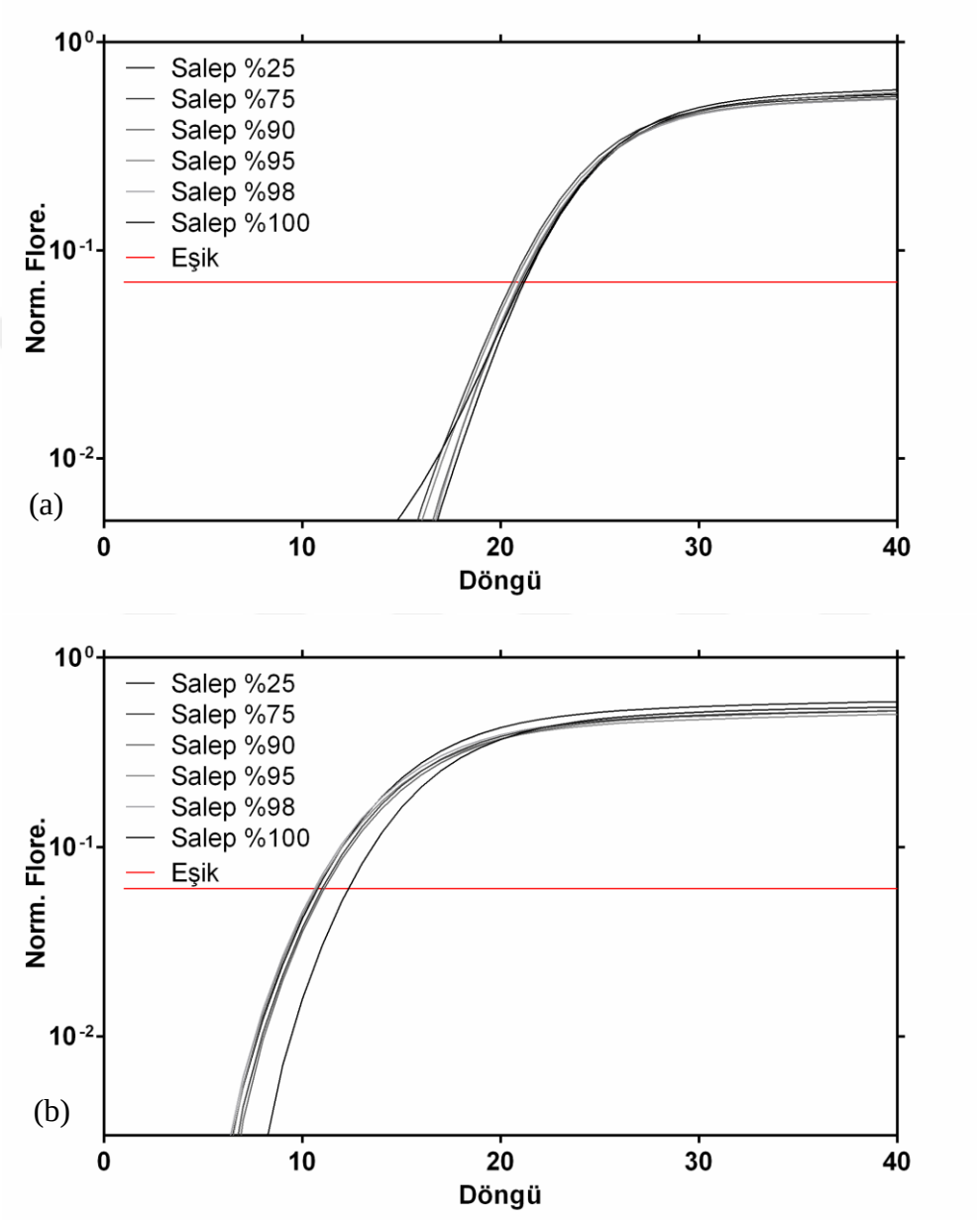
Şekil 4.58. Salep-mısır unu DNA karışımlarına ait gerçek oranlara karşılık analiz yöntemi ile tahmin edilen salep oranları

Buna göre LOD değeri %1,12 (55,93 pg) ve LOQ değeri ise %3,73 (186,44 pg) olarak hesaplanmıştır. Bu deneme, ilave edilen katkı materyalinden kayda değer oranda DNA geldiği durumda yüksek doğrusal uyum sağlayan bir grafiğin elde edilebildiğini ve sağlıklı bir bağıl değerlendirme hesabının yapılabileceğini göstermiştir. Ancak, salebin tağşişi için mısır ununun kullanımı ürünün fiziksel ve duyusal özelliklerinin değişmesine yol açacak ve tağşiş etme amacına uymayacaktır. Bu bakımdan, her ne kadar PZR için dezavantajlı bir durum oluşturuyor olsa da, tağşiş katkısı amacıyla ilave edilmesi ihtimali en yüksek madde olan nişasta ile çalışmaların sürdürülmesi uygun bulunmuştur.

4.4.5. Salep ve patates nişastası toz karışımlarından elde edilen DNA örnekleri ile yürütülen qPZR denemeleri ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplamaları

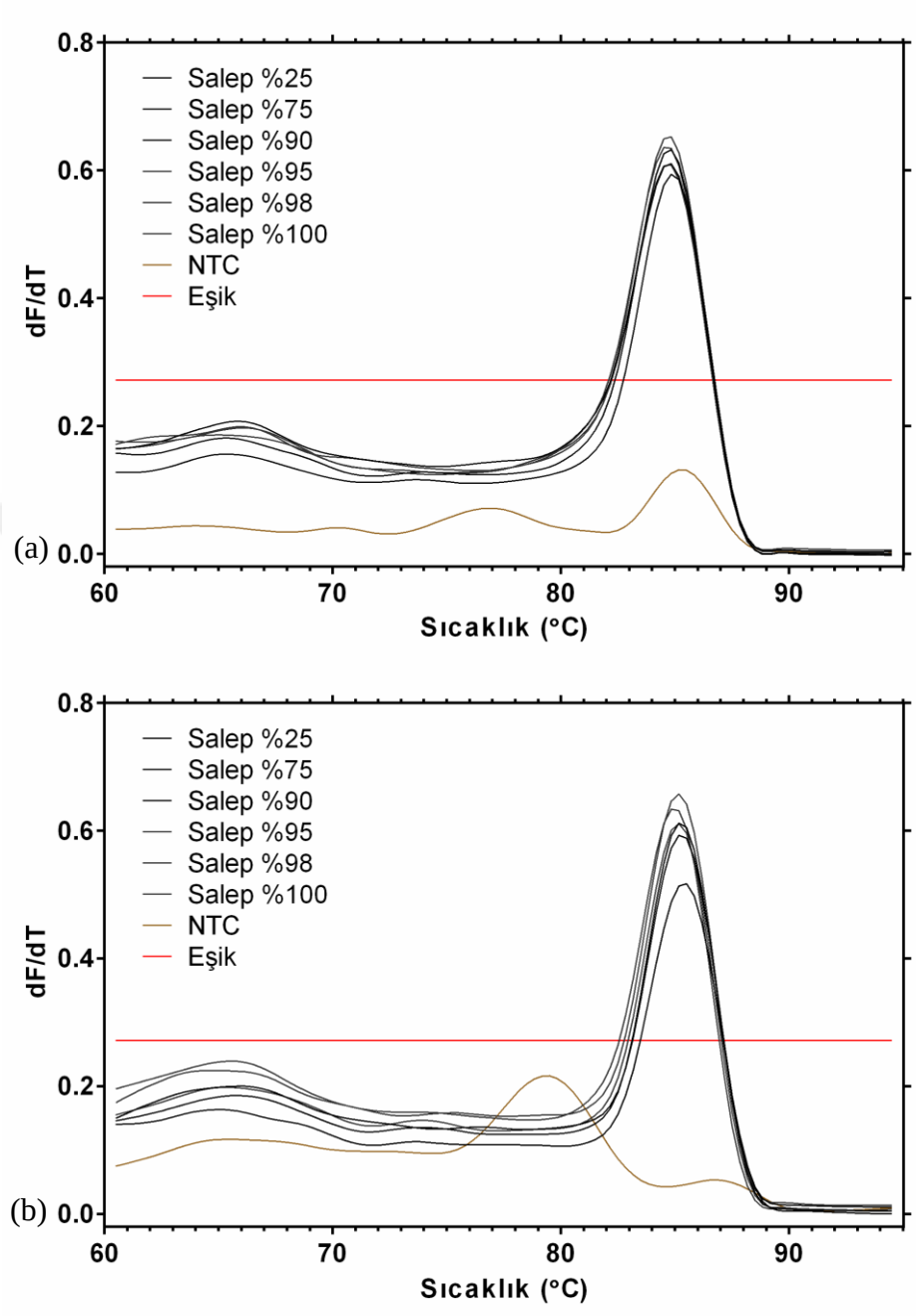
Gerçek zamanlı PZR analizleri, ITS2a ve 18S rRNA evrensel kontrol primer çiftlerine göre kurulmuştur. Salep ve toz patates nişastası örnekleri %100, %98, %95, %90, %75, %25 salep olacak şekilde hazırlanmıştır. DNA izolasyonu farklı miktarda patates nişastası içeren ve salep tozu içeren bu karışımdan yapılmış, ardından elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ölçülmüştür (sırasıyla; 8,21 ng/µl, 10 ng/µl, 9,49 ng/µl, 6,15 ng/µl, 6,12 ng/µl, 1,99 ng/µl). Negatif kontrol olarak %0 salep yani %100 patates nişasta örneği (0,3 ng/µl) kullanılmıştır. Kalibratör olarak ise %100 salep örneği kullanılmıştır. Şekil 4.59a'da salep-nişasta örneklerinde ITS2a F/R primerleri ile elde edilen amplifikasyon grafiği, Şekil 4.59b'de ise 18S rRNA F/R primerleri ile elde edilen amplifikasyon grafiği gösterilmektedir. DNA örneklerinde herhangi bri normalizasyon işlemi yapılmadan qPZR analizi yapılmıştır. Yukarıda gösterildiği gibi kontsantrasyonlar birbirine çok yakındır. Bu nedenle amplifikasyon eğrileri birbirleri

üstünde çakışmaktadır. Ancak bu durum bağıl hesaplama (ΔΔCt metodu) yapıldığından bir engel teşkil etmemektedir. Bu metodun diğer önemli avantajlarından biride nişasta-salep karışımlarında normalizasyon yapılmasına gerek kalmamasıdır. Ancak şunu da belirtmek gerekir ki nişastadan gelen DNA'nın çok düşük olması zaten normalizasyon yapılmasına da engel teşvik eden diğer bir durumdur. Bu durum mutlak metotların nişasta gibi çok düşük DNA elde edilen örneklerde uygulanmasını zorlaştırmaktadır.



Şekil 4.59. Salep-patates nişastası toz karışımlarından elde edilen DNA'ların (%25-100 arası salep içeren patates nişastası) **a)** ITS2a F/R ve **b)** 18S rRNA F/R primerleri ile qPZR amplifikasyon grafikleri (replikasyon görünümü)

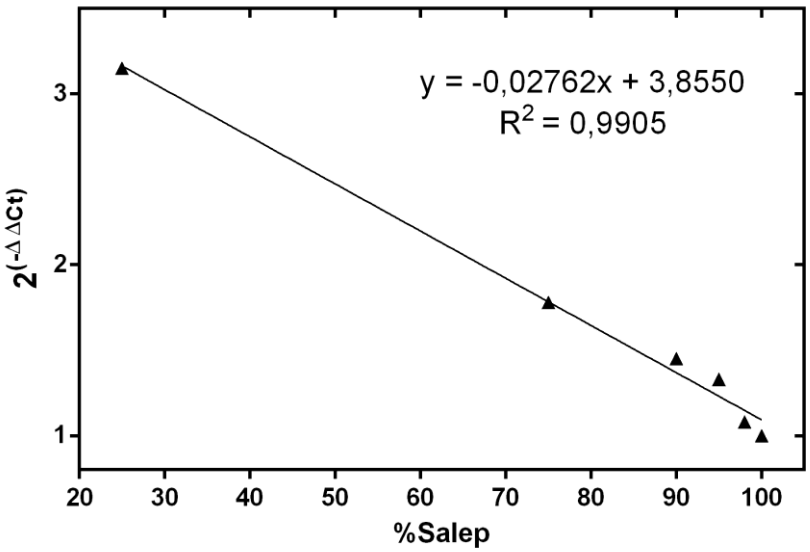
Şekil 4.60'da ise bu reaksiyonlar sonucunda oluşan fragmentlerin erime eğrisi analizlerine ait grafikler verilmiştir. Grafiklerde her iki primerde 85 °C civarında tepe yapmıştır.



Şekil 4.60. Salep-patates nişastası toz karışımlarından elde edilen DNA'ların (%25-100 arası salep içeren patates nişastası) **a)** ITS2a F/R primer çifti ile ve **b)** 18S rRNA F/R primer çifti ile reaksiyonu sonucu çoğalan fragmentlerin erime eğrisi analizi

Kalibrasyon eğrisi gerçek zamanlı PZR programında elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.61). Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması ile DNA kantifikasyon analizi için gerekli olan ve iyi uyum gösteren lineer regresyon modeli (R^2=0,99) elde edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.13'de özetlenmiştir. Ayrıca elde edilen ham rapor Ek 8'de verilmiştir. Elde edilen Ct değerleri birbirine çok yakın olmasına karşın bağıl hesapma yapıldığından bu durumun bir engel

teşvik etmediği görülmektedir. Bu noktada önemli olan spesifik ve evrensel primerlerdeki Ct değerlerinin her bir örnekte birbirlerine ve kalibratör örneğin Ct'sine bağlı olarak farklılık göstermedir. Özetle nişastadan gelen çok az DNA Ct'de bu farklılığa neden olmuştur ancak bu farklılık bağıl hesaplama yapılması ile anlamlı hale gelmiştir.



Şekil 4.61. Nişasta-salep karışımlarının analizi sonucu hesaplanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine karşılık %salep konsantrasyonlarının çizilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.13. Nişasta-salep karışımlarının analizi sonucu elde edilen değerler

Salep (%)	$Ct_{ortITS2a}$ ±SS	$Ct_{ort18SrRNA}$ ±SS	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	HK (% bağıl konsantrasyon)	Hata
25%	21,09±0,15	12,32±0,23	8,77	-1,65	3,15	25,52	0,021
75%	20,58±0,06	10,98±0,07	9,6	-0,82	1,78	75,13	0,002
90%	20,98±0,10	11,1±0,05	9,88	-0,54	1,45	87,07	-0,033
95%	20,71±0,15	10,7±0,30	10,01	-0,41	1,33	91,42	-0,038
98%	20,92±0,08	10,6±0,02	10,32	-0,1	1,08	100,47	0,025
100%	21,18±0,07	10,76±0,04	10,42	0	1	103,37	0,034

Metot validasyonunun değerlendirilmesi, kalibrasyon eğrisini (Şekil 4.61) elde etmek için değerlendirilmemiş olan veri noktalarına karşılık gelen üç örnek kullanılarak yapılmıştır. Değerlendirme sonuçları çizelge 4.14'te özetlenmiştir. Buna göre analizin daha yüksek salep konsantrasyonunda daha hassas olduğu (diger bir değişle %50 ve üzeri) görülmektedir. Bu durumun, nişasta yoluyla karışıma katkıda bulunan DNA'nın salepten daha az miktarda ve kalitede olduğu gerçeğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Nişasta oranının yüksek olmasına bağlı olarak sınırlayıcı bir faktör ortaya çıkmaktadır. Buna göre nişasta ilavesiyle %50'ye varan oranlar bu metot ile tespit edilebileceği ve daha yüksek seviyedeki bulaşmanın, ışık mikroskopu veya

taramalı electron mikroskopisi gibi muayene gibi alternatif tekniklerle tespit edilebileceği düşünülmektedir. Villa vd. (2017)'de yaptığı bir çalışmada safran baharatı içinde tağşiş materyali olarak katılan aspir bitkisinin gerçek zamanlı PZR analizleri ile kantifikasyon eğrisi oluşturulmuş ve doğruluk hesaplarında sapma miktarlarının %16 civarında olduğu görülmüştür. Soares vd. (2014)'te kümes hayvanları eti ürünleri içindeki domuz etinin miktarının belirlendiği bir çalışmada varyasyon katsayısının %3,3-15,9 arasında değiştiği bildirilmiştir.

Çizelge 4.14. Analiz edilen örneklerin hesaplanan değerleri ve verilerin değerlendirilmesi

Örnekler	Gerçek değer (% nişasta)	Hesaplanan değer	Varyasyon katsayısı (%)	Sapma (%)
Nişasta içeren salep	7,5	1,34 ± 3,83	3,78	9,55
Nişasta içeren salep	15	22,88 ± 5,14	6,67	9,27
Nişasta içeren salep	50	42,18 ± 28,35	49,03	15,73

4.4.6. Ticari salep örneklerinin analizleri

Bu çalışmada gerçekleştirilen son nokta (end-point) ve gerçek zamanlı (real-time) PZR analizleri ile ticari örneklerin bir değerlendirmesi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.15'te özetlenmektedir. Otantik salep olarak satılan örneklerin hepsi kalitatif analiz olan son nokta PZR ile salep olarak ya da salep içeren toz olarak tanımlanmıştır. Kantitatif analiz için, Çizelge 4.13'te kullanılan salep-nişasta karışımlarının standart kurve (R^2=0.998) oluşturmada kullanıldığı gerçek zamanlı PZR analizi yürütülerek, gerçek salep tozu olarak tüccarlardan sağlanan dört toz örneğin %96-86 salep içeridiği tespit edilmiştir. Sonuçlarda gözlemlenen varyasyonun, uygulanan test koşullarından ziyade, test edilen materyalle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Farklı salep tozlarının bileşiminde değişen oranlarda farklı tür ve cinslere ait yumruların kullanıldığı düşünüldüğünde farklı kaynaklardan sağlanan salebin bileşimini oluşturan kaynak organizmaların da üründe kayda değer varyasyona yol açacağı öngörülebilir. Diğer bir deyişle, DNA ekstraktının bileşimine katkıda bulunan değişik cins/türlere bağlı olarak, gerçek zamanlı PZR analizlerinde primer eşleşmesinde oluşan farklılıklar nedeniyle (primer bağlanma verimliliğinin değişmesi sonucunda) örnekler arası varyasyon artabilir.

Çizelge 4.15. Ticari toz salep örneklerinin kantitatif analiz sonuçları

Salep örnekleri	Kalitatif analiz	Kantitatif analiz (%tağşiş)
Ticari 1	+	10.09 ± 0.99
Ticari 2	+	13.74 ± 3.19
Ticari 3	+	4.19 ± 3.69
Ticari 4	+	6.50 ± 1.3

5. SONUÇ

Salep doğadan toplanan, henüz kayda değer miktarlarda üretimi yapılacak şekilde kültüre alınamamış bir gıda ürünüdür. Türkiye'nin hemen her yerinde toplanan salep yumruları kaynatılarak kurutulur, salep tüccarlarına satılır ve gıda amaçlı kullanım için ise çekirdek salep öğütülerek toz salep elde edilir. Bu bağlamda salebin genetik olarak farklı cinslere mensup bitkilerin yumruları olduğu, bunların ısıl işlem, kurutma ve öğütme gibi DNA hasarına sebep olabilen işlemler ile muamele edildiği ve DNA izolasyonunda zorluklara sebep olan zamksı bileşenleri (glukomannan ve nişasta) fazlaca içerdiği bilinmektedir. Tez kapsamında yürütülen DNA izolasyon çalışmalarında materyal olarak salebin DNA izolasyonunda zorluklar yaşandığı, elde edilen DNA miktar ve kalitesinin diğer biyolojik materyallerden daha düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, kullanılan bir ticari kit yardımıyla yapılan izolasyon ile PZR amplifikasyonunda başarılı sonuçlar elde edilmiş ve tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmesi planlanan marker bölge tespiti çalışmaları sürdürülmüştür.

Genel bir yaklaşım olarak ele alınan RAPD primerleri kullanılarak salebe özgü genetik bölgelerin belirlenmesi için PZR denemeleri kurulmuş, elde edilen jellerde gözlemlenen ortak (monomorfik) bantlar izole edilerek bunlara ait diziler belirlenmiştir. Bu şekilde, salep karışımı içinde tüm türleri kapsayan bir ortak bant olmasa da, cinse spesifik olabilecek bazı bantlar gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar cinse spesifik bantlar üzerinden marker geliştirilebilirliğine işaret etmektedir. Bu hedefe odaklanacak çalışmaların gerçekleştirilmesi ile farklı orkide cinslerine özgü primerler tasarlanarak spesifik orkide türlerinin tespit edilebilmesine yönelik yöntem geliştirilebilecektir.

ITS2a bölgesinden tasarlanmış olan primerler ile yürütülen denemelerde bu primerlerin seçici şekilde salepte amplifikasyon sağladığı ve genel olarak kullanılması muhtemel tağşiş maddelerinde çalışmadığı gözlemlenmiştir. Bunun üzerine, tez çalışması kapsamında planlanan gerçek zamanlı PZR denemelerinde bu primerlerin kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmişir.

Yapılan analizlerde 20 pg kadar az salep DNA'sının tespit edilebildiği ve agaroz jelde görüntülenebildiği belirlenmiştir. Görülmektedir ki ITS2 primer çifti ve klasik PZR ile salep içeceği ya da maraş dondurması gibi çok az salep içeren gıda ürünlerinde salep olup olmadığı tespit edilebilecektir. Ayrıca yurt dışına ihracatı yasak olan salebin tozunun gerçekten salep olup olmadığı yine bu yöntemle tespit edilebileceği öngörülmektedir.

Gerçek zamanlı PZR analizleri ile salebi tespit etmeye ve miktar belirlemeye yönelik denemeler kurgulanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda, kullanılan salep karışımı ile yürütülen qPZR denemelerinde elde edilen Ct değerlerinin salep oranları ile uyumlu bir artış sergilediği gözlemlenmiştir. Kontrol amplifikasyon amacıyla 18S RNA bölgesi ile yürütülen PZR denemelerinde hem salep hem de pek çok tağşiş örneğinde amplifikasyonun sağlanması için yeterli miktar ve kalitede DNA olduğunu göstermiştir. Ancak, nişasta ile hazırlanan salep karışımlarından izole edilen DNA ile qPZR yoluyla miktar belirlemek nişastadan izole edilebilen DNA miktarının çok az olması zorluklara neden olduğu gözlemlenmiştir. Yürütülen denemeler, $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri kullanılarak salep miktarının tespitinde kullanılabilecek bir yöntemin geliştirilebileceğini göstermiş ve %25-100 salep oranlarında kantifikasyon gerçekleştirilebilmiştir. Yapılan analizler

neticesinde %25 ve altı salep içeriğinde farklı bir kalibrasyon eğrisi oluşturularak %25 altı salep içeren market örneklerine yönelik miktar belirlemede kullanılabilecek bir metodun geliştirilebileceği görülmüştür. qPZR ile $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ hesaplamalarının kullanıldığı miktar tespiti için kullanılabilecek yöntem bazı ticari örneklerin analiz edilmesinde kullanılmıştır.

Bu tez çalışması ile ileride ITS2 bölgesine uygun prob(lar) da tasarlanabileceği gibi, salebe özgü primerlerle birlikte tağşiş materyaline özgü primerlerin kullanıldığı çeşitli çalışmalar yapılmasına imkan sağlayacaktır. Bu bakımdan tez kapsamında elde edilen bilgi ve bulguların salebin gıda maddesi olarak analizi ve kontrolü açısından yenilikler getireceği, ileride yapılacak bilimsel çalışmalara ışık tutacağı umut edilmektedir.

6. KAYNAKLAR

Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. 2007. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27: 617–631.

Altan, S., Altan, T., Ortaş, İ., Sandal, G. ve Akpınar, Ç. 2007. Çukurova Bölgesin'de saleplerin doğal yayılış alanlarının ve yetişme ortamı koşullarının saptanması üzerine araştırmalar. TÜBİTAK TOVAG Proje 104O132, 88 s.

Anonim. 2017. www.hammaddeler.com; son erişim 20.03.2017

Anonim. 1989. Resmi Gazete, 20.09.2089-20288, Ankara.

Anonim. 2011a. Türk Gıda Kodeksi Yönemeliği, Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme Yönetmeliği, Resmi Gazete, 29.11.2011-28157, Ankara.

Anonim. 2011b. Doğal Çiçek Soğanlarının 2012 İhracatı Listesi, 25.11.2011-28123, Ankara.

Anonim. 2013. Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği, Resmi Gazete Tarihi: 10.04.2013 Resmi Gazete Sayısı: 28614, Ankara.

Arı, E., Karagüzel, O., Onal, K., Polat, I. and Göcmen, M. 2004. Philogenetic Relationship of Turkish Terrestrial Orchids. IXth International Symposium on Flower Bulbs (19-22 April 2004, Niigata, Japan), *Acta Horticulturae*, 673, 1, 155-160. (sözlü sunum ve kişisel iletişim).

Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Al Sadoon, M. and Shobrak, M. 2010. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 2079-2096.

Arslan, N. 2011. Salep Orkideleri. *Gıda Hattı Dergisi*, 34: 68-69.

Aybeke, M., Sezik, E. and Olgun, G. 2010. Vegetative anatomy of some Ophrys, Orchis and Dactylorhiza (Orchidaceae) taxa in Trakya region of Turkey. *Flora*, 205: 73-89.

Balasbramani, S.P., Seethapathy, G.S. and Venkatasubramanian, P. 2011. Nuclear ribosomal DNA-ITS region based molecular markers to distinguish botanical entities traded as ‘vidari’. *Journal of Herbal Medicine*, 1: 83-89.

Bardakçı, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology*, 25: 185-196.

Chaudhary, A.A., Yadav, D., Hemant Jamil, S.S. and Asif, M. 2012. Real Time Sequence Characterized Amplified Region (RT-SCAR) marker: Development and its application for authentication and quantification of *Catharanthus roseus* L. Don. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (32): 4748-4754.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y. and Leon, C. 2010. Validation of the ITS Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*, 5 (1): 1-8.

Çağlayan, K., Özavcı, A. ve Eskalen, A. 1998. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın Olarak Yetişen Bazı Salep Orkidelerinin Embriyo Kültürü Kullanılarak *In Vitro* Koşullarda Çoğaltılmaları. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22: 187-191.

Devey, D.S., Bateman, R.M., Fay, M.F. and Hawkins, J.A. 2008. Friends or Relatives? Phylogenetics and Species Delimitation in the Controversial European Orchid Genus *Ophrys*. *Annals of Botany*, 101: 385-402.

Dhanya, K. and Sasikumar, B. 2010. Molecular Marker Based Adulteration Detection in Traded Food and Agricultural Commodities of Plant Origin with Special Reference to Spices. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4 (1): 454-489.

Dhanya, K., Syamkumar, S. and Sasikumar, B. 2009. Development and Application of SCAR Marker for the Detection of Papaya Seed Adulteration in Traded Black Pepper Powder. *Food Biotechnology*, 23: 97-100.

Dhanya, K., Syamkumar, S., Siju, S. and Sasikumar, B. 2011b. SCAR Markers for Adulterant Detection in Ground Chilli. *British Food Journal*, 113 (5): 656-668.

Dhanya, K., Syamkumar, S., Siju, S. and Sasikumar, S. 2011a. Sequence Characterized Regional Markers: A reliable Tool for Adulterant Detection in Turmeric Powder. *Food Research International*, 44: 2889-2895.

Doyle, J.J. and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem. Bull*., 19: 11–15.

Dyaneshwar, W., Preeti, C., Kalpana, J. and Bushan, P. 2006. Development and Applicability of RAPD-SCAR Marker for Identification of *Phyllanthus emblica* Linn. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (11): 2313-2316.

Erzurumlu, G.S. ve Doran, İ. 2011. Türkiye'de Salep Orkideleri ve Salep Kültürü. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* 15(1): 29-34.

Focke, F., Haase, I. and Fischer M. 2010. DNA-based identification of spices: DNA isolation, whole genome amplification, and polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(2): 513-520.

Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Pang, X., Xu, H. and Chen, S. 2010. Identification of Medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 116-121.

Ghorbani, A., Gravendeel, B., Selliah, S., Zarré, S. and de Boer, H. 2017. DNA barcoding of tuberous Orchidoideae: a resource for identification of orchids used in Salep. Molecular Ecology Resources, 17(2): 342–352.

Gönülşen, N., Önal, M.K., Ercan, N., Yıldızgördü, K., Şekeroğlu, E., Biçici, M. ve Eskalen, A. 1996. Ege ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren Orchidaceae familyasına ait bazı türlerin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK TBGAG Proje No. 52, 33 s.

Grant, K. ve Amar, C. 2013. Real-time PCR Detection of Food-borne Pathogenic Clostridia Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications. Caister Academic Press, Norfolk, 285 s.

Gümüş, C. ve Ellialtıoğlu, Ş. 2012. Salep Bitkisinin Doku Kültürüyle Çoğaltımı ve Arazi Koşullarına Aktarım Çalışmaları. Türkiye 2. Orkide ve Salep Çalıştayı, 25-26 Nisan 2012, Menemen, İzmir.

Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M ve Babaç, M.T. (edlr.). 2012. Türkiye Bitki Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezehat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul, 1290 s.

Hossain, M.M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances – An overview. *Fitoterapia*, 82: 102-140.

Ikten, H., Mutlu, N., Gulsen, O., Kocatas, H. and Aksoy, U. 2010. Elucidationg genetic relationships, diversity and population structure among the Turkish female figs. *Genetica*, 138: 169-177.

Kasparek, M. and Grimm, U. 1999. European Trade in Turkish Salep with Special Reference to Germany. *Economic Botany*, 53 (4): 396-406.

Kreutz, K. ve Çolak, A.H. 2011. Türkiye Orkideleri (Botanik Özellikleri, Ekolojik İstekleri, Doğal Yayılış Alanları, Yaşam Tehditleri, Koruma Önlemleri). Rota Yayınları, 855 s.

Lin, T.C., Yeh, M.S., Cheng, Y.M., Lin, L.C. and Sung, J.M. 2012. Using ITS2 PCR-RFLP to generate molecular markers for authentication of *Sophora flavescens* Ait. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 892-898.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402–408.

Lockley, A.K. and Bradsley, R.G. 2000. DNA Based Methods for Food Authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 67-77.

McDermott, J.M., Brändle, U., Dutly, F., Haemmerli, U.A., Keller, S., Müller, K.E. and Wolfe, M.S. 1994. Genetic Variation in Powdery Mildew of Barley: Development of RAPD, SCAR, and VNTR Markers. *Phytopathology*, 84(11): 1316-1321.

Meyer, K., Rosa, C., Hischenhuber, C. and Meyer, R. 2001. Determination of Locust Bean Gum and Guar Gum by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, *Journal of AOAC International*, 84 (1): 89-99.

Mutlu, N., Boyacı, F.H., Göçmen, M. and Abak, K. 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR Markers Linked with a Fusarium Wilt Resistance Gene in Eggplant. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 1303-1312.

Oliveira, L.V.R., Faria, R.T., Ruas, C.F, Ruas, P.M., Santos, M.O. and Carvalho, V.P. 2010. Genetic analysis of species in the Genus Catasetum (Orchidaceae) using RAPD Markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53 (2): 375-387.

Pafundo, S., Agrimonti, C., Maestri, E. and Marmiroli, N. 2007. Applicability of SCAR Markers to Food Genomics: Olive Oil Tracability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6052-6059.

Paran, I. and Michelmore R.W. 1993. Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Teoretical and Applied Genetics*, 85 (8): 985-993.

Parent, J.G. and Pagé, D. 1998. Identification of Raspberry Cultivars by Sequence Characterized Amplified Region DNA Analysis. *HortScience*, 33 (1): 140-142.

Polashock, J.J. and Vorsa, N. 2002. Development of SCAR Markers for DNA Fingerprinting and Germplasm Analysis of American Cranberry. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 127 (4): 677-684.

Primrose, S., Woolfe, M. and Rollinson, S. 2010. Food Forensics: Methods for Determining the Authenticity of Foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 582-590.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z. and Lin, X. 2013. An improvement of the 2ˆ(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics, 3*(3): 71–85

Remya, R., Syamkumar, S. and Sasikumar, B. 2004. Isolation and Amplification of DNA from turmeric powder. *British Food Journal*, 106 (9): 673-678.

Semagn, K., Bjørnstad, Å. and Ndjiondjop, M.N. 2006. An Overview of Molecular Marker Methods for Plants. *African Journal of Biotechnology*, 5 (25): 2540-2568.

Sezik, E. 1984. Orkidelerimiz; Türkiye'nin Orkideleri. Sandoz Kültür Yayınları, No.6, 166 s.

Sezik, E. ve Özer BY. 1983. Maraş Salebinin Menşei ve Maraş Civarı Orkideleri. TÜBİTAK TBAG No. 664, 64 s.

Sezik, E. ve Özer, B.Y. 1983. Kastamonu Salebinin Menşei ve Kastamonu Civarı Orkideleri. TÜBİTAK TBAG No. 424, 60 s.

Sezik, E., İşler, S., Güler, N., Orhan, Ç., Aybeke, M., Deniz, İ.G. ve Üstün, O. 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi. TÜBİTAK TBAG-Ç.SEK./23, No. 103T008, 125 s.

Soares, S., Amaral, J.S., Oliveira, M.B.P.P. and Mafra I. 2013. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, 94(1): 115–120.

Solivia, M., Kocyan, A. and Widmer A. 2001. Molecular Phylogenetics of the Sexually Deceptive Orchid Genus *Ophrys* (Orchidaceae) Based on Nuclear and Chloroplast DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20 (1): 78-88.

Sucher, N.J. and Carles M.C. 2008. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Med*, 74: 603-623.

Sucher, N.J., Hennel, J.R. and Carles M.C. (Eds.). 2012. Plant DNA Fingerprinting and Barcoding. Springer Science Business Media, New York, 202 s.

Swetha, V. P., Parvathy, V. A., Sheeja T. E. and Sasikumar B. 2014. Isolation and amplification of genomic DNA from barks of *Cinnamomum* spp. *Turk J Biol*, 38: 151-155.

Tamer, C.E., Karaman, B. and Çopur, U. 2006. A Traditional Turkish Beverage: Salep. *Food Reviews International*, 22: 43-50.

Tanker, N., Koyuncu, M. ve Coşkun M. 2007. Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi Eczacılık Yayınları, Ankara, No.93, 434 s.

Taverniers, I., Loose, M. D. and Bockstaele, E.V. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, 23 (8): 535-552

Tekinşen, K. K. and Güner, A. 2010. Chemical Composition and Physicochemical Properties of Tubera Salep Produced from some Orchidaceae Species. *Food Chemistry*, 121: 468-471.

Vasile, M.E., Daniela, B.N., Irina, P., Giancarla, V., Gabriela, G., Lavinia, S. and Adriana, C. E. 2014. Efficiency of RAPD molecular markers in assessment of genetic diversity in species of Orchidaceae family across southwestern Romania. *Journal of Biotechnology*, 185: 113-114.

Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., and Mafra, I. (2017). Novel quantitative real-time PCR approach to determine safflower (Carthamus tinctorius) adulteration in saffron (Crocus sativus). *Food Chemistry*, 229: 680–687.

Weisling, K., Nybbom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, Boca Raton, 322 p.

Wendel, J. F. and Álvarez, I. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogeneiics and Evolution*; 29: 417–34

Woolfe, M. and Primrose, S. 2004. Food Forensics: Using DNA Technology to Combat Misdescription and Fraud. *Trends in Biotechnology*, 22 (5): 222-226.

Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P. and Chen, S. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE*, 5 (10): 1-9 (2010).

7. EKLER

Ek 1. Çalışmada kullanılan primerler

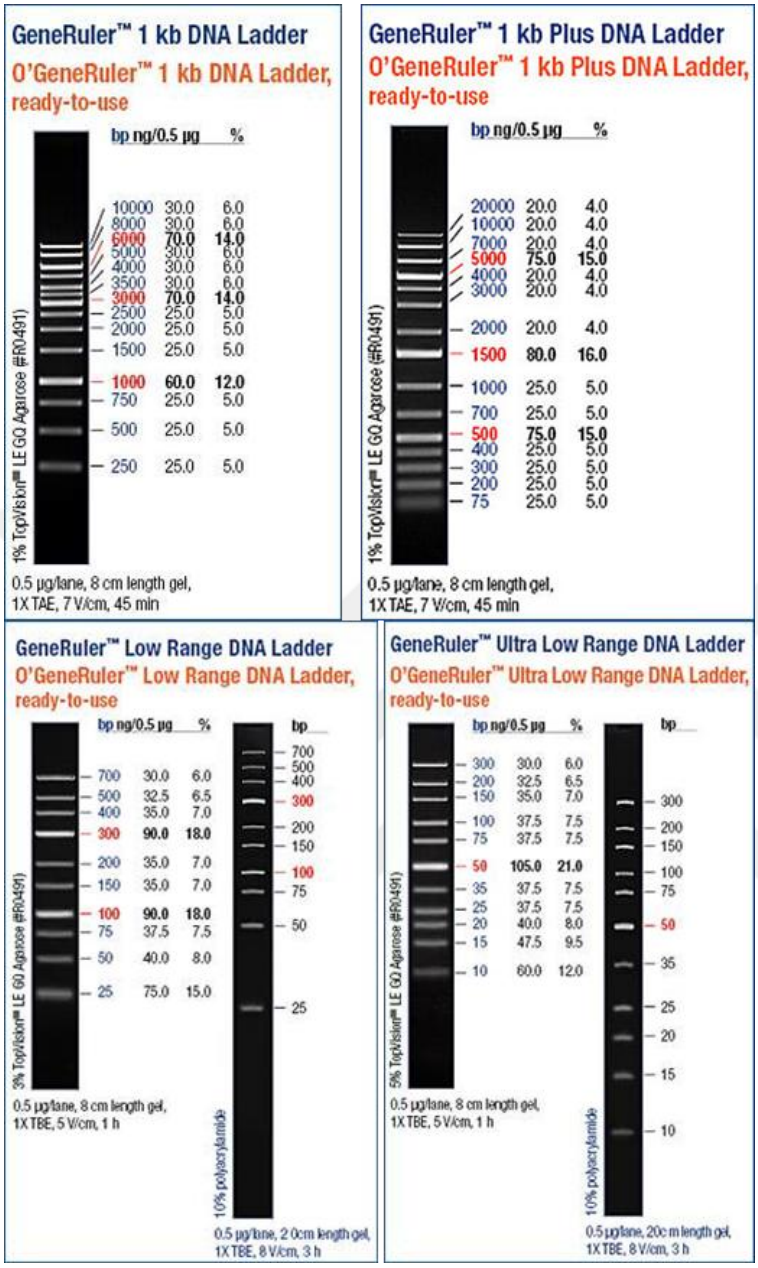
(a) RAPD analizlerinde kullanılan primerlerin listesi

OPA serisi		**OPB serisi**	
Primer adı	**Primer dizisi**	**Primer adı**	**Primer dizisi**
OP A-01	CAGGCCCTTC	OP B-01	GTTTCGCTCC
OP A-02	TGCCGAGCTG	OP B-02	TGATCCCTGG
OP A-03	AGTCAGCCAC	OP B-03	CATCCCCCTG
OP A-04	AATCGGGCTG	OP B-04	GGACTGGAGT
OP A-05	AGGGGTCTTG	OP B-05	TGCGCCCTTC
OP A-06	GGTCCCTGAC	OP B-06	TGCTCTGCCC
OP A-07	GAAACGGGTG	OP B-07	GGTGACGCAG
OP A-08	GTGACGTAGG	OP B-08	GTCCACACGG
OP A-09	GGGTAACGCC	OP B-09	TGGGGGACTC
OP A-10	GTGATCGCAG	OP B-10	CTGCTGGGAC
OP A-11	CAATCGCCGT	OP B-11	GTAGACCCGT
OP A-12	TCGGCGATAG	OP B-12	CCTTGACGCA
OP A-13	CAGCACCCAC	OP B-13	TTCCCCCGCT
OP A-14	TCTGTGCTGG	OP B-14	TCCGCTCTGG
OP A-15	TTCCGAACCC	OP B-15	GGAGGGTGTT
OP A-16	AGCCAGCGAA	OP B-16	TTTGCCCGGA
OP A-17	GACCGCTTGT	OP B-17	AGGGAACGAG
OP A-18	AGGTGACCGT	OP B-18	CCACAGCAGT
OP A-19	CAAACGTCGG	OP B-19	ACCCCCGAAG
OP A-20	GTTGCGATCC	OP B-20	GGACCCTTAC

(b) Çalışmalarda kullanılan spesifik ve kontrol primerleri

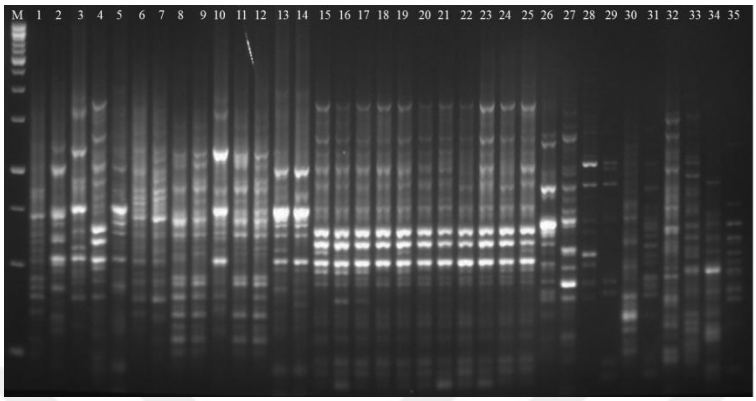
Primer adı	Dizi	Sıcaklık (°C)	Hedef amplikon büyüklüğü (kbç)
C22-f	5'- TTACTGCGAGTCAAGCCGAG -3'	61.6	~166
C22-r	5'- TGTTCTCAGATGTTCCGAGC -3'	59,0	
C17-1-f	5'- AGCGTAATGGTTTGAGGG -3'	56,1	~206
C17-1-r	5'- ATAGAGAGCGGGAAAGGAG -3'	56,1°	
C17-2-f	5'- TTTATGAGTGGCGAGTTGC -3'	57,4°	~344
C17-2-r	5'- AAAGATGGAGTTGAGGGTCTC -3'	57,3°	
ITS2a F	5'- GCTATGCGGTGGCCTTATCT -3'	61,5	~200
ITS2a R	5'- GTGAGTTAGGTTAGCCCGGGAT -3'	62,7	
18S rRNA F	5'- TCTGCCCTATCAACTTTCGATGG -3'	64,6	~140
18S rRNA R	5'- TAATTTGCGCGCCTGCTG -3'	64,4	
EI2F	5'- CTGAAGAGCGGGATGATT -3'	56,2	~74
EI2R	5'- TGATAGGATAAACCGAGGCT -3'	56,4	
EI2F	5'- CTGAAGAGCGGGATGATT -3'	56,2	~76
EI2R2	5'- GATGATAGGATAAACCGAGGC -3'	57,7	
ITS-3a-F	5'- TCGCTCCATAAGACCTTCG -3'	59,0	~148
ITS-3a-R	5'- TCAACCGAGGCTTTCATC -3'	57,2	

Ek 2. Tez çalışmasında kullanılan DNA standartları.

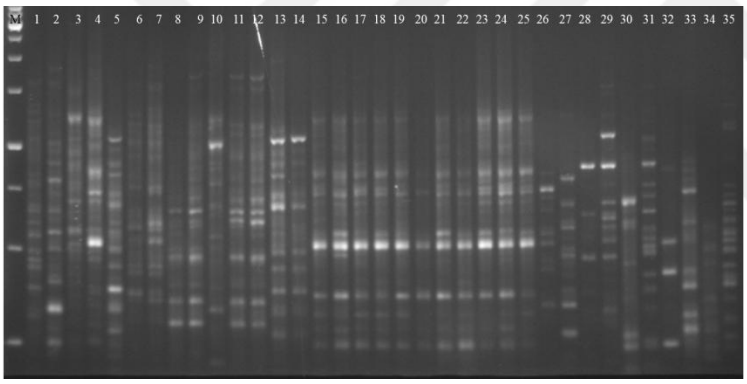


Ek 3. OPA primer seti ile Çizelge 4.2'de verilen DNA kalıpları kullanılarak yürütülen RAPD-PZR çıktıları.

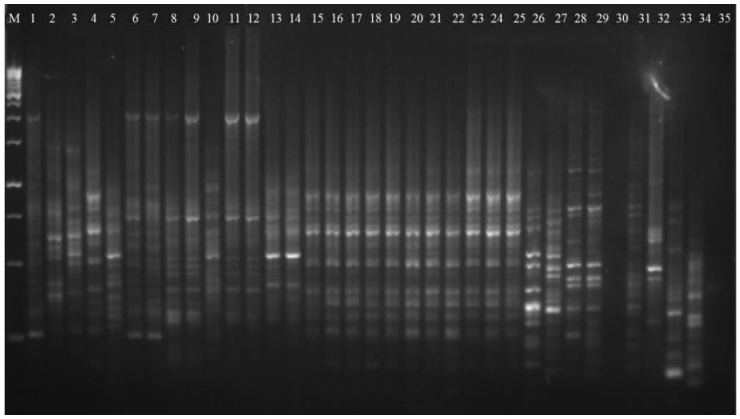
(a) OPA01 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



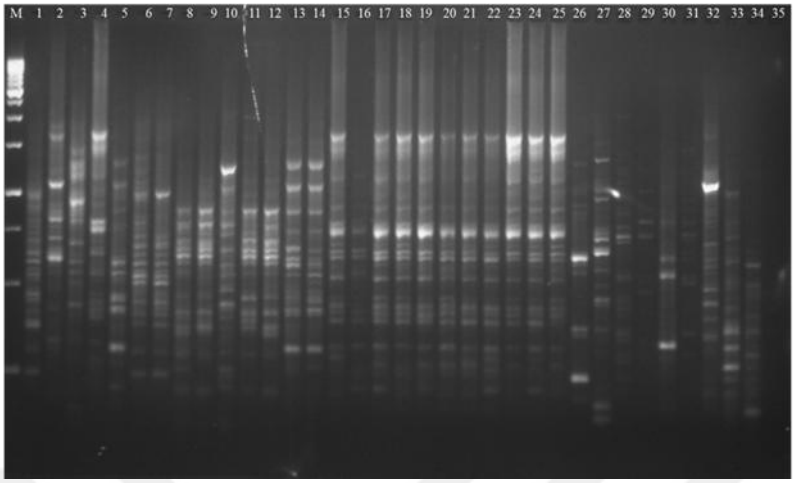
(b) OPA02 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



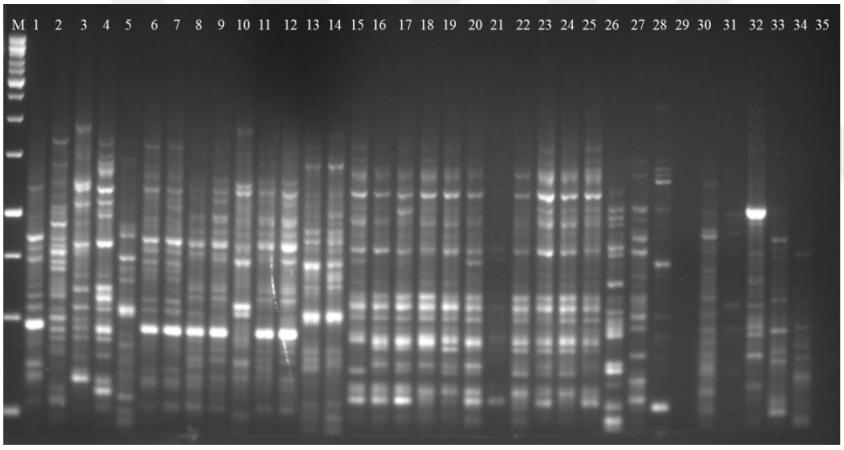
(c) OPA03 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



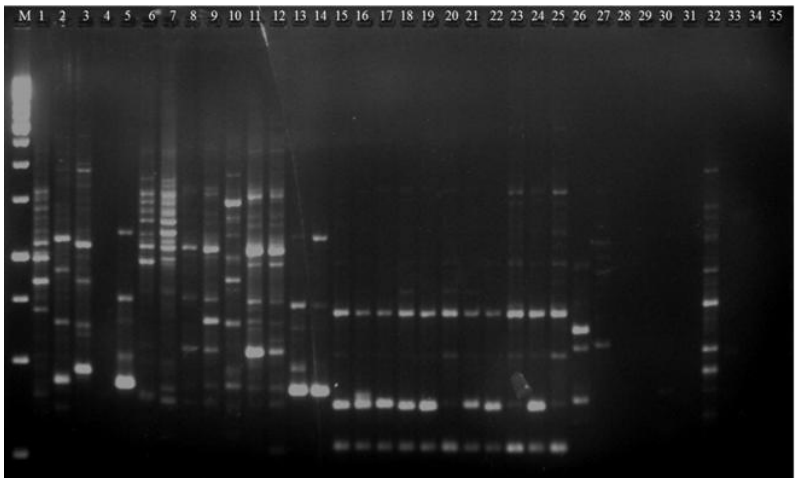
(d) OPA04 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



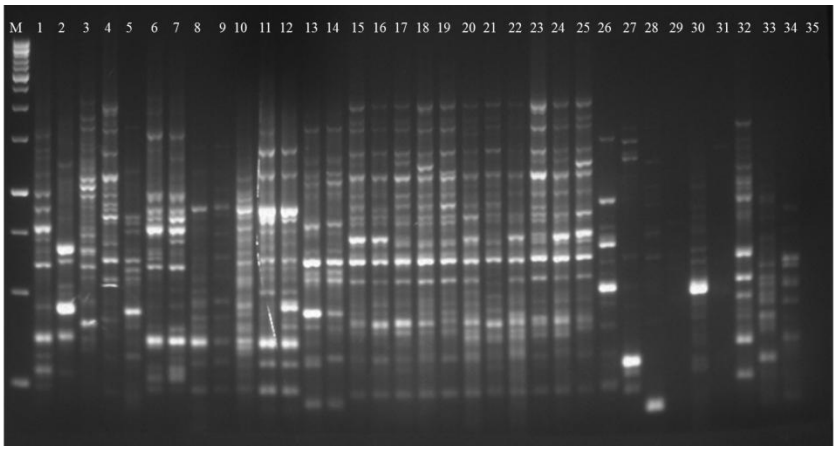
(e) OPA05 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



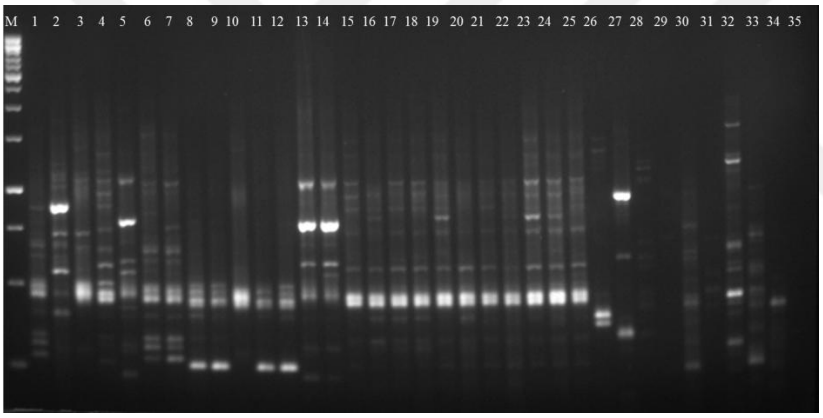
(f) OPA06 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



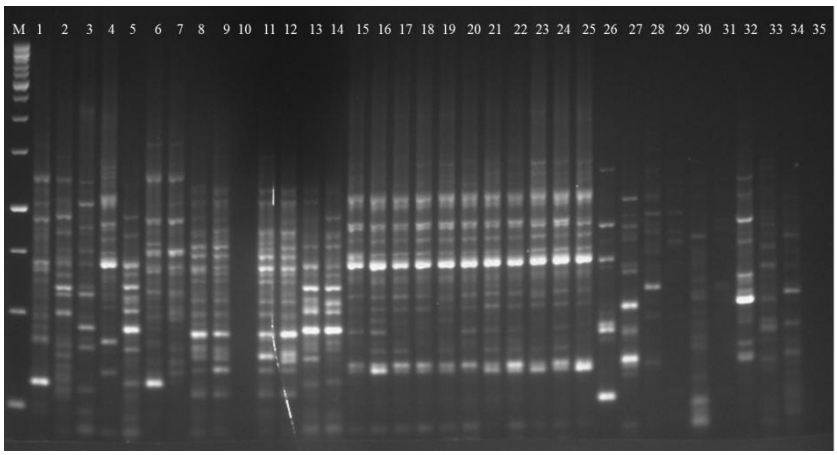
(g) OPA07 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



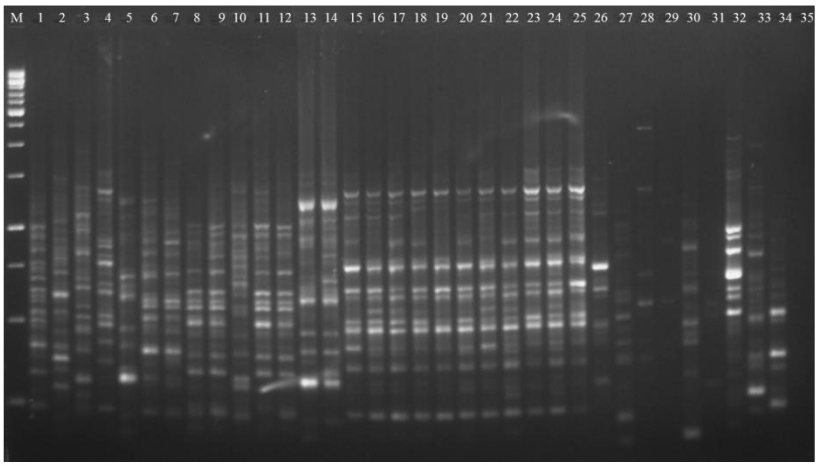
(h) OPA08 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



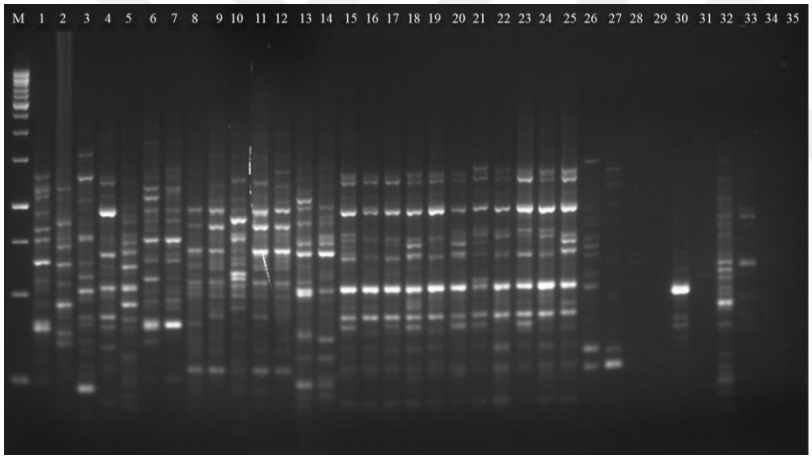
(i) OPA09 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



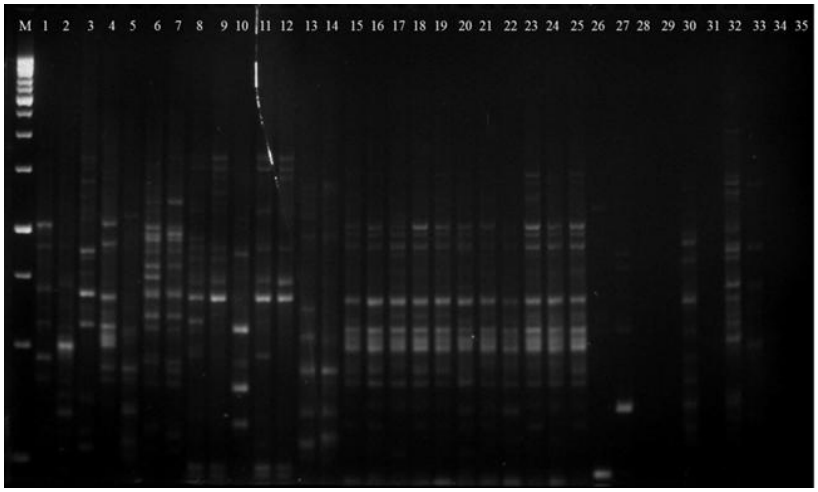
(j) OPA10 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



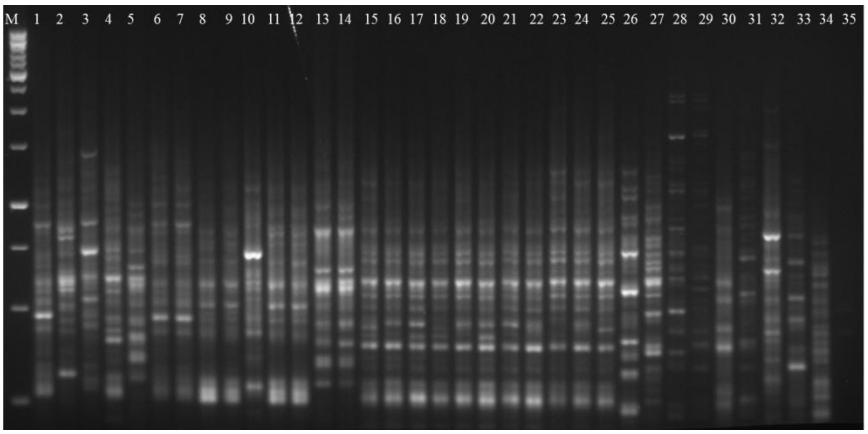
(k) OPA11 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



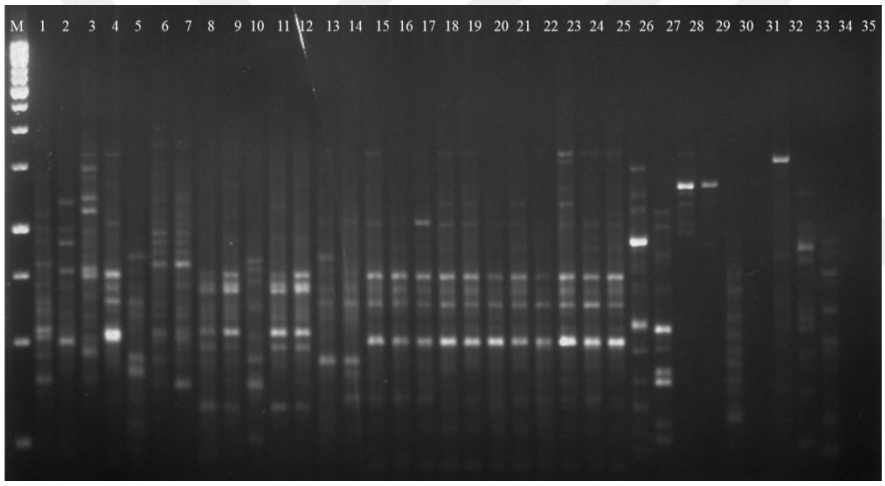
(l) OPA12 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



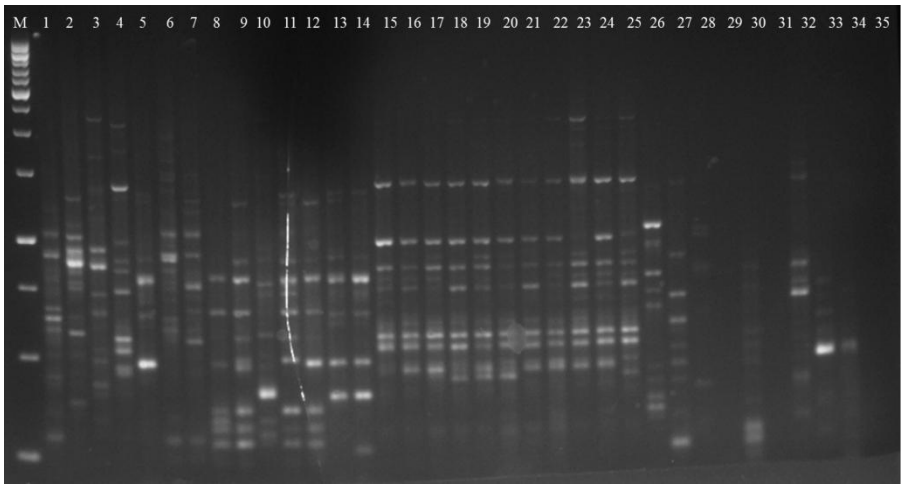
(m) OPA13 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



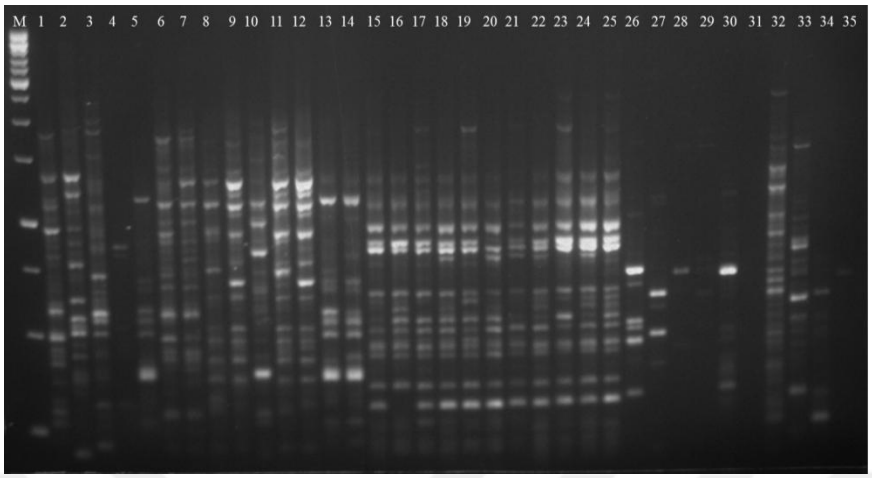
(n) OPA14 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



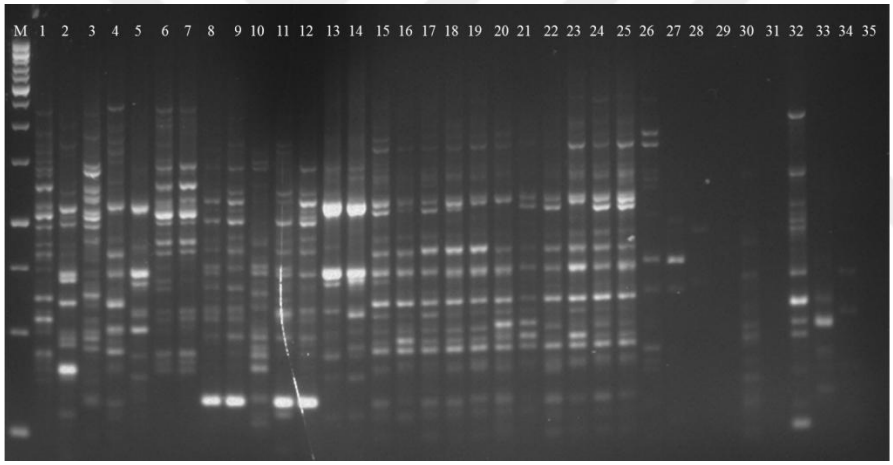
(o) OPA15 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



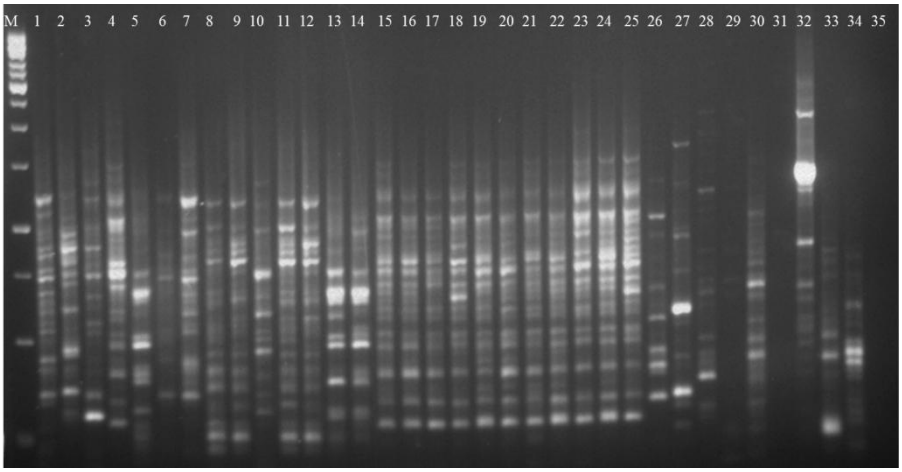
(p) OPA16 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



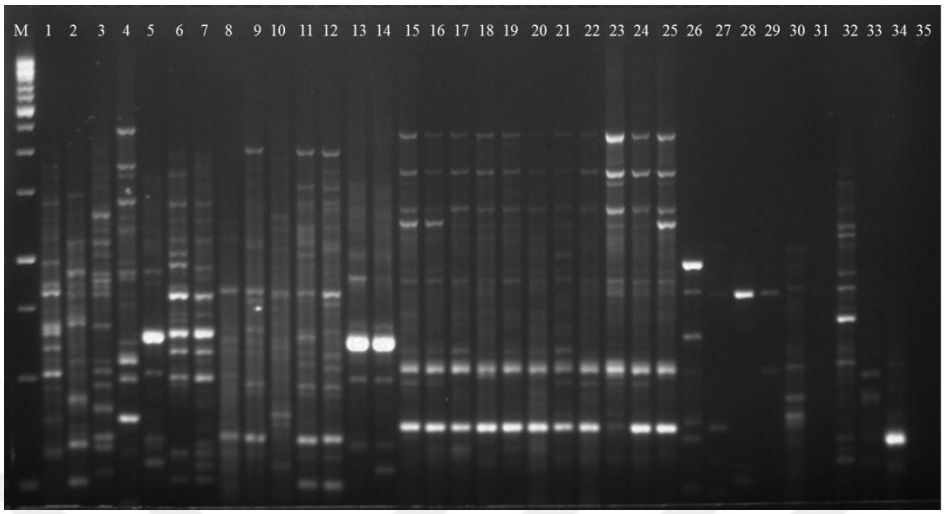
(q) OPA17 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



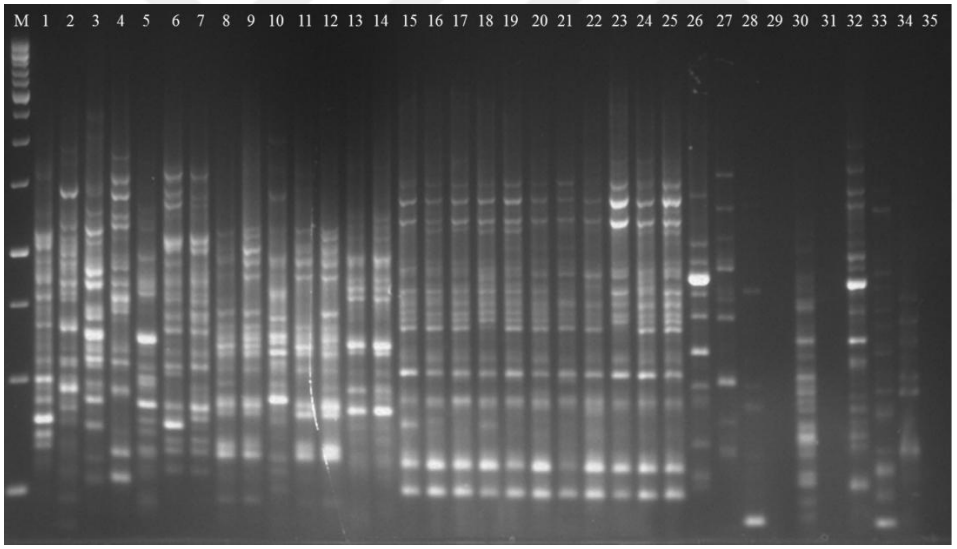
(r) OPA18 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü



(s) OPA19 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü

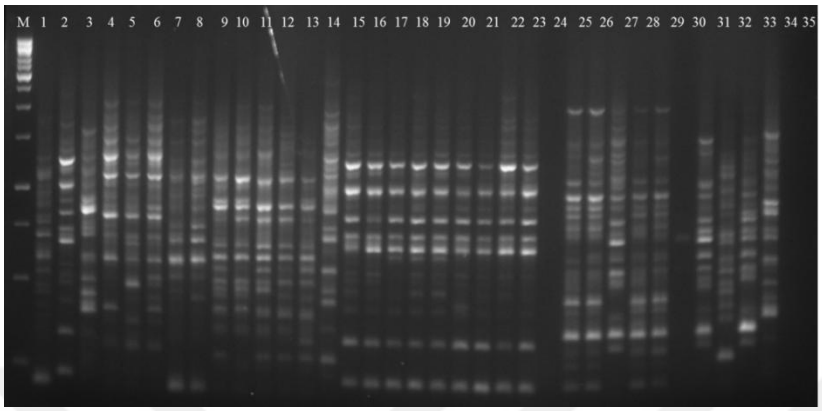


(t) OPA20 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü

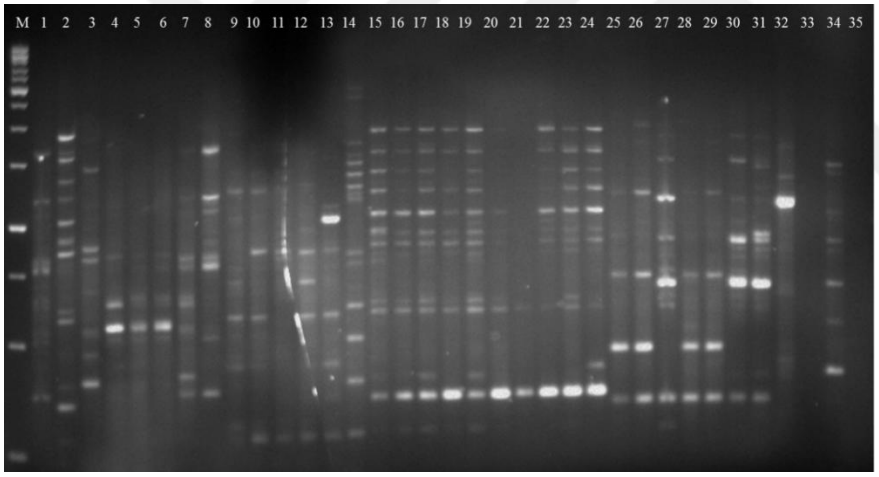


Ek 4. OPB primer seti ile Çizelge 4.4'de verilen DNA kalıpları kullanılarak yürütülen RAPD-PZR çıktıları.

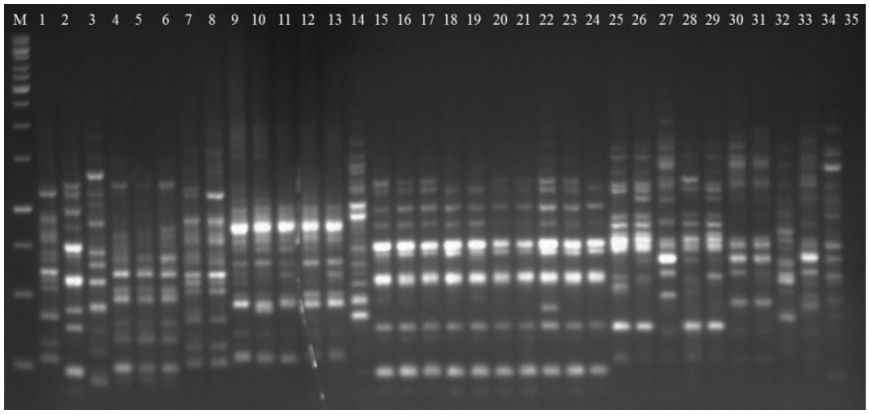
(a) OPB01 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



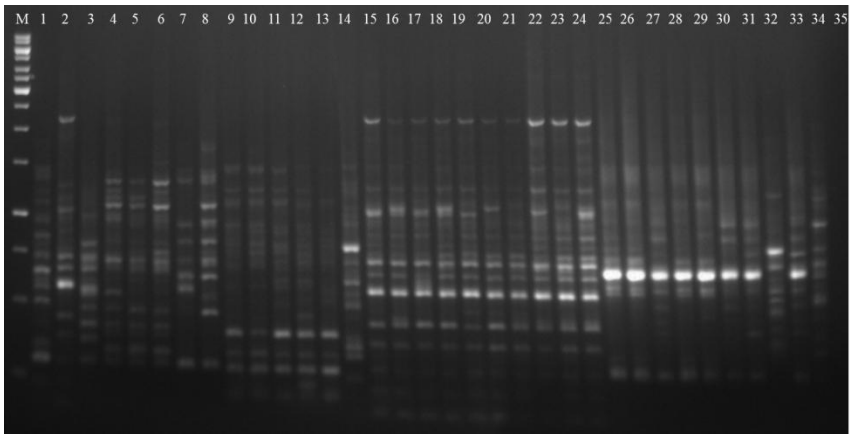
(b) OPB02 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



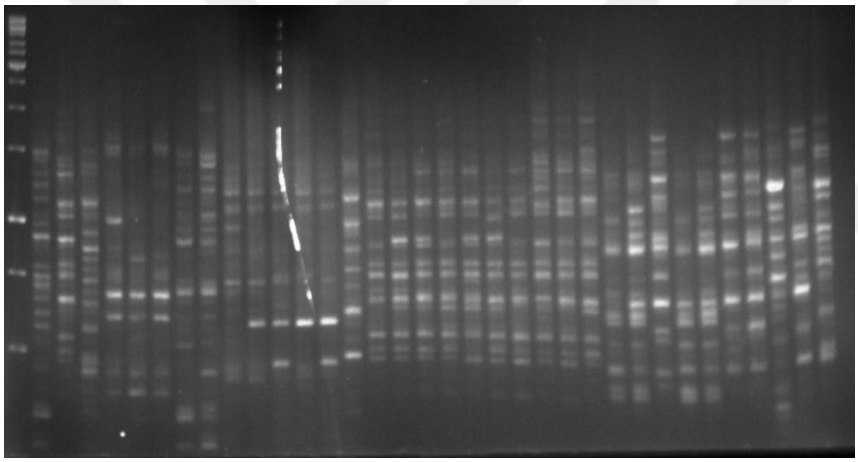
(c) OPB03 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



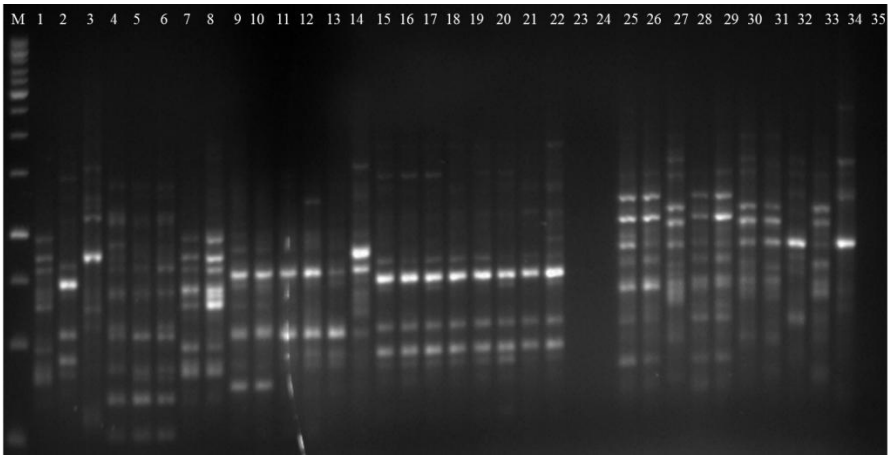
(d) OPB04 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



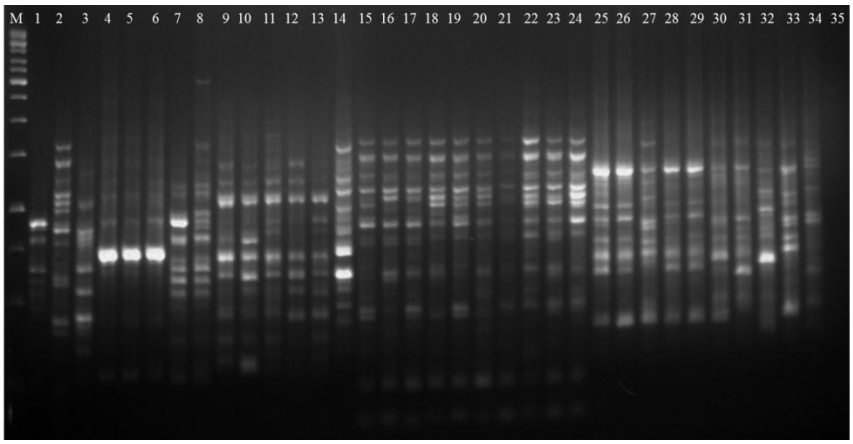
(e) OPB05 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



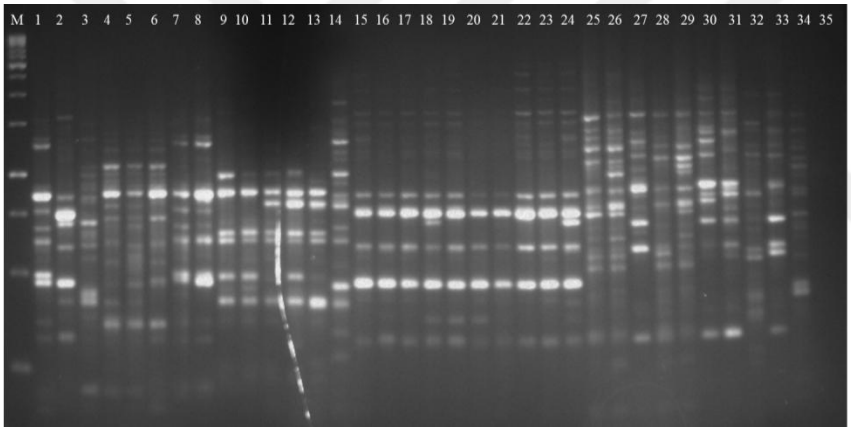
(f) OPB06 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



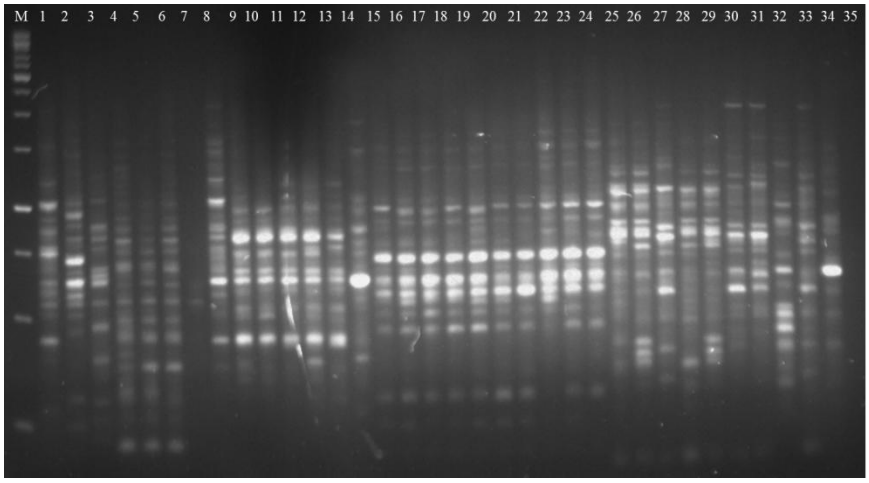
(g) OPB07 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



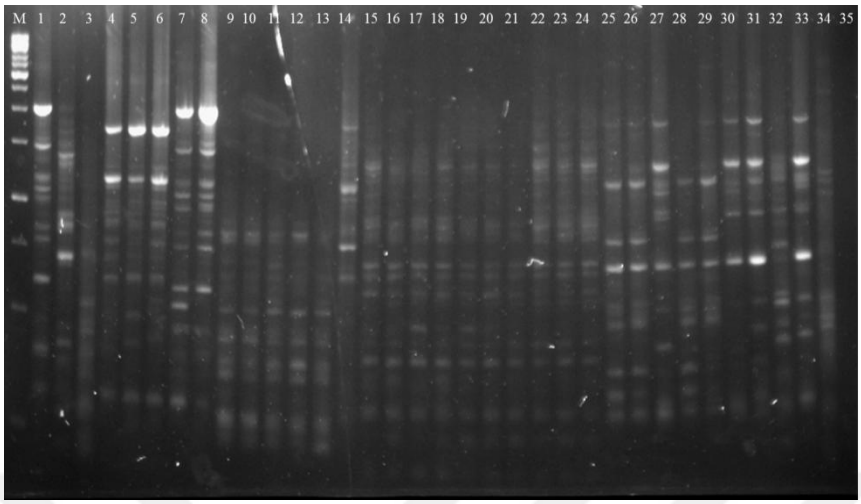
(h) OPB08 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



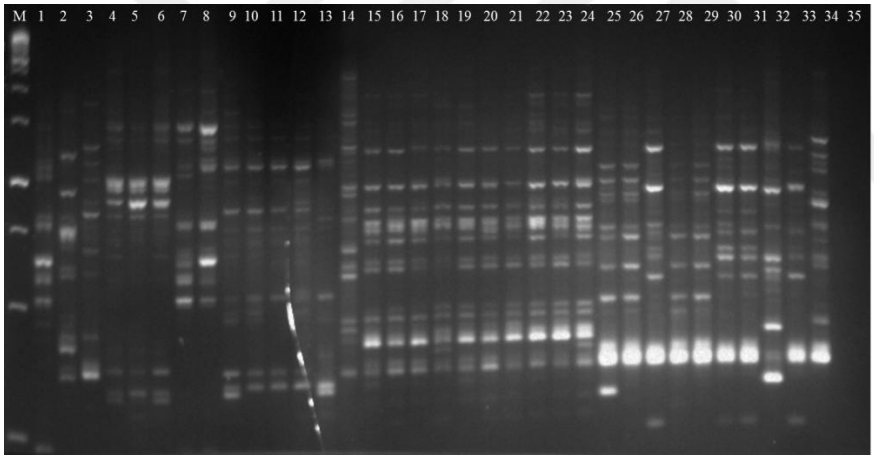
(i) OPB09 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



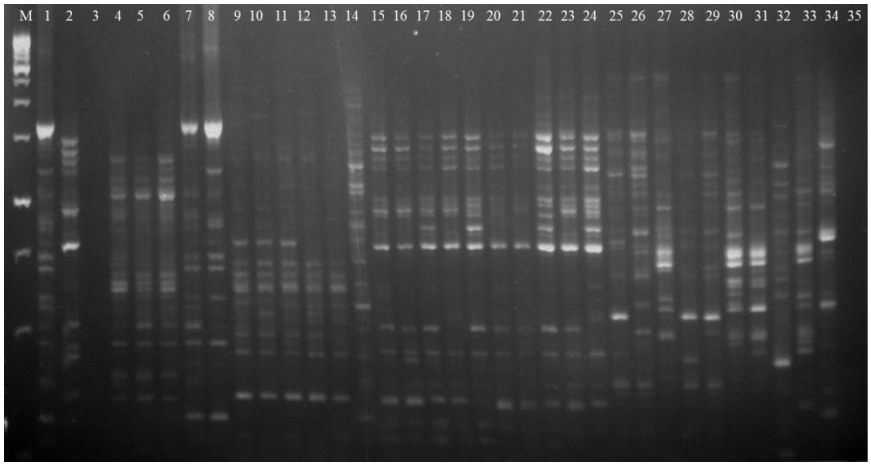
(j) OPB10 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



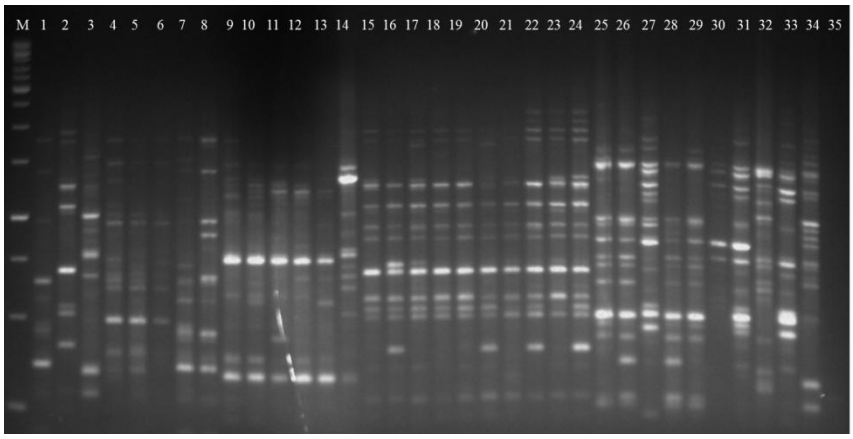
(k) OPB11 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



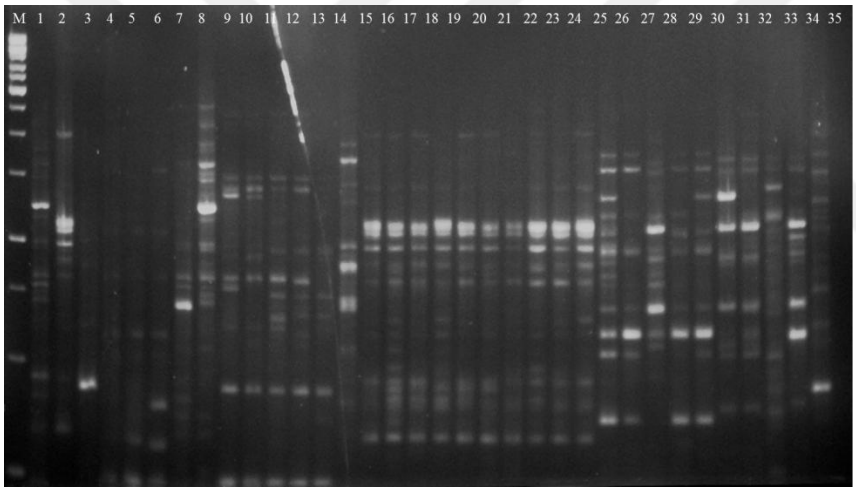
(l) OPB12 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



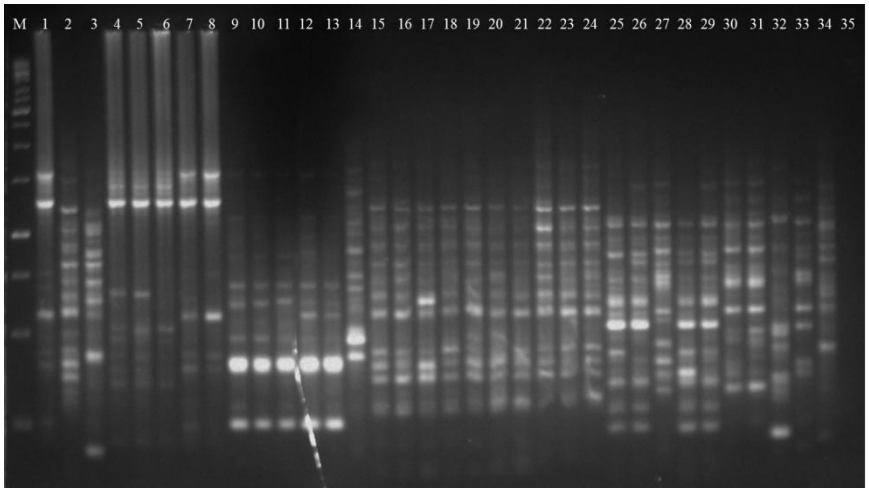
(m) OPB13 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



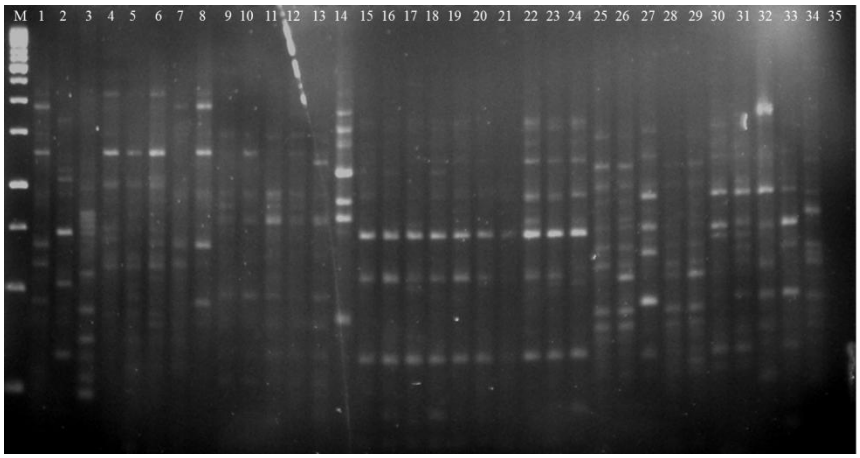
(n) OPB14 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



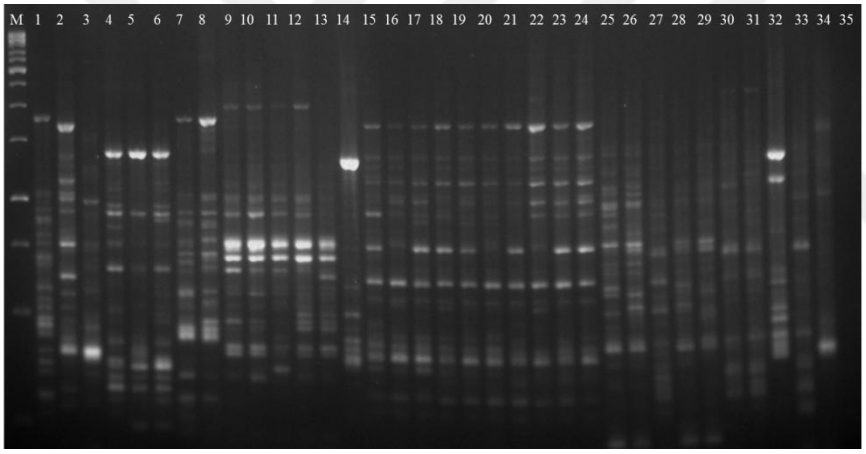
(o) OPB15 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



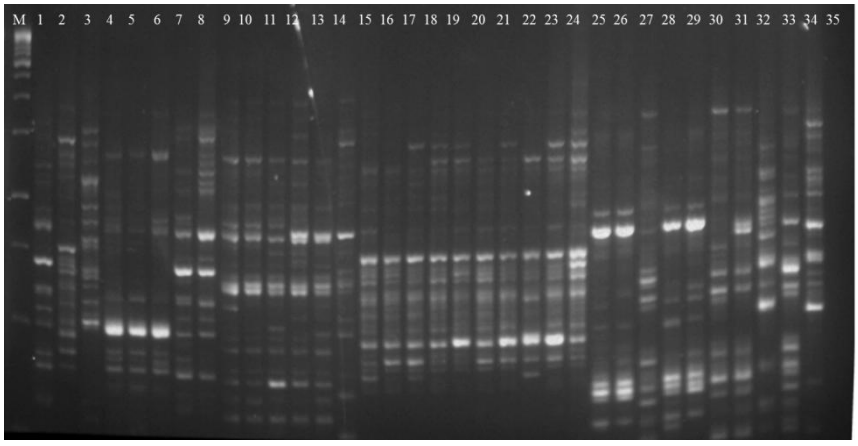
(p) OPB16 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



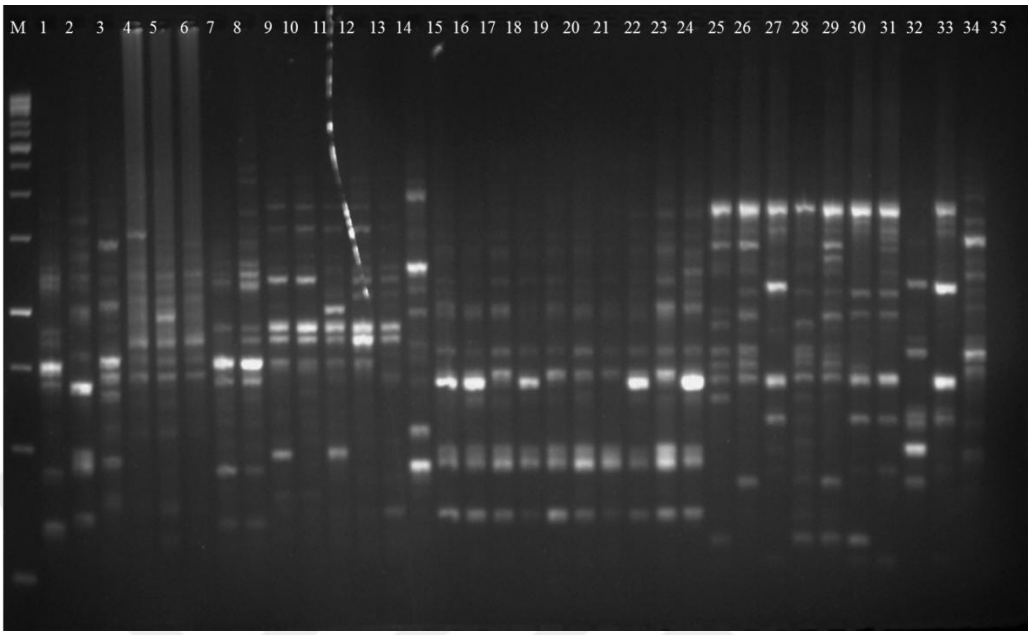
(q) OPB17 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



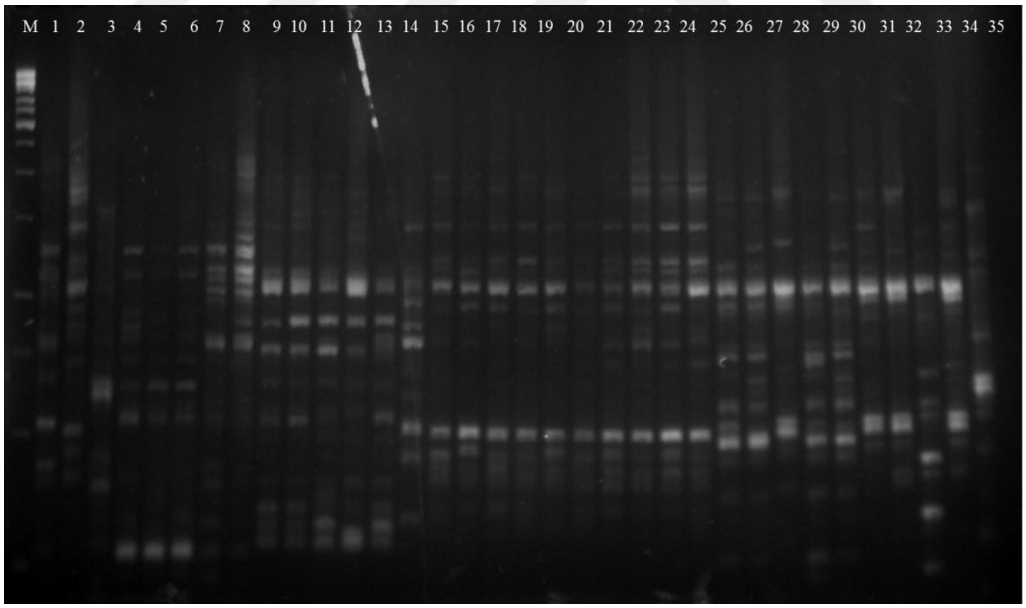
(r) OPB18 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



(s) OPB19 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



(t) OPB20 primeri ile yürütülen RAPD PZR denemesine ait ürünlerin jel elektroforez görüntüsü.



Ek 5. Deney veri ve standart sapma değerleri

*Orchis italica*seyreltme oranları	Konsantrasyon (ng/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon (ng/ul)	Varyasyon (%)	Ct	Ct ort ± SS
1:1	22	25,416	15,50	26,74	26,85 ± 0,1
1:1	22	22,683	3,10	26,9	
1:1	22	22,247	1,10	26,92	
1:4	5,5	5,966	8,50	28,7	28,98 ± 0,25
1:4	5,5	4,487	18,40	29,08	
1:4	5,5	4,213	23,40	29,17	
1:16	1,38	1,452	5,20	30,6	30,62 ± 0,18
1:16	1,38	1,641	18,90	30,44	
1:16	1,38	1,252	9,30	30,8	
1:64	0,344	0,346	0,50	32,54	32,47 ± 0,15
1:64	0,344	0,413	20,00	32,3	
1:64	0,344	0,337	2,10	32,58	
1:256	0,0859	0,117	36,30	34	34,46 ± 0,55
1:256	0,0859	0,053	38,00	35,06	
1:256	0,0859	0,093	8,00	34,32	

ITS2a primer çifti için *Orchis italica* örneği ile yapılan realtime analizi verileri

Orchis italica seyreltme oranları	Konsatrasyon (ng/ul)	Hesaplanan Konsantrasyon (ng/ul)	Varyasyon (%)	Ct	Ct ort ± SS
1:1	22	22,5259	2,4	9,81	9,85 ± 0,08
1:1	22	22,6497	3,0	9,80	
1:1	22	20,3193	7,6	9,94	
1:16	1,38	1,4120	2,3	13,54	13,55 ± 0,3
1:16	1,38	1,4361	4,1	13,52	
1:16	1,38	1,3671	0,9	13,58	
1:256	0,0859	0,0819	4,7	17,38	17,33 ± 0,10
1:256	0,0859	0,0925	7,8	17,21	
1:256	0,0859	0,0814	5,2	17,39	

18s rDNA primer çifti için *Orchis italica* örneği ile yapılan realtime analizi verileri

Ek 6. Deney veri ve standart sapma değerleri

Salep Seyreltme Oranı	Konsantrasyon (ng/ul)	Hesaplanan Konsantrasyon (ng/ul)	Varyasyon (%)	Ct	Ct ort ± SS
1:1	5,00000000	5,9929553	0,1	18,69	18,73 ± 0,04
1:1	5,00000000	5,8779053	2,0	18,72	
1:1	5,00000000	5,6643618	5,6	18,77	
1:4	1,25000000	1,4790454	1,4	20,58	20,42 ± 0,16
1:4	1,25000000	1,8598262	24,0	20,27	
1:4	1,25000000	1,6791293	11,9	20,41	
1:16	0,31250000	0,4470263	19,2	22,20	22,44 ± 0,33
1:16	0,31250000	0,2817220	24,9	22,82	
1:16	0,31250000	0,4129467	10,1	22,30	
1:64	0,07812500	0,0896121	4,4	24,37	24,58 ± 0,38
1:64	0,07812500	0,0910446	2,9	24,35	
1:64	0,07812500	0,0556351	40,7	25,01	
1:256	0,01953125	0,0272759	16,4	25,97	26,01 ± 0,04
1:256	0,01953125	0,0258714	10,4	26,05	
1:256	0,01953125	0,0265644	13,3	26,01	

ITS2a primer çifti için salep örneği ile yapılan realtime analizi verileri

Salep Seyreltme Oranı	Konsantrasyon (ng/ul)	Hesaplanan Konsantrasyon (ng/ul)	Varyasyon (%)	Ct	Ct ort ± SS
1:4	1,25000000	1,517407	21,40	9,36	7,78 ± 0,3
1:4	1,25000000	1,007097	19,40	7,44	
1:4	1,25000000	1,080852	13,50	7,99	
1:64	0,07812500	0,087302	11,70	7,9	11,21 ± 0,11
1:64	0,07812500	0,101629	30,10	11,29	
1:64	0,07812500	0,088858	13,70	11,08	
1:256	0,01953125	0,015617	20,00	11,26	13,46 ± 0,33
1:256	0,01953125	0,014707	24,70	13,61	
1:256	0,01953125	0,0232	18,80	13,69	

18s rDNA primer çifti için salep örneği ile yapılan realtime analizi verileri

Ek 7. Deney veri ve standart sapma değerleri

ITS2a No	Gerçek konsantrasyon (%)	Ct	Ct_{ort} ± SS	18s rDNA No	Gerçek konsantrasyon (%)	Ct	Ct_{ort} ± SS
1	1	21,99	22,23 ± 0,21	1	1	10,4	10,44 ± 0,05
2	1	22,39		2	1	10,49	
3	1	22,29		3	1	10,43	
4	2,5	20,87	21,34 ± 0,48	4	2,5	10,52	10,5 ± 0,07
5	2,5	21,82		5	2,5	10,43	
6	2,5	21,34		6	2,5	10,55	
7	5	20,58	21,04 ± 0,51	7	5	10,62	10,62 ± 0,01
8	5	20,96		8	5	10,63	
9	5	21,59		9	5	10,61	
10	10	20,58	20,87 ± 0,73	10	10	10,69	10,77 ± 0,07
11	10	20,34		11	10	10,79	
12	10	21,71		12	10	10,83	
13	25	20,45	20 ± 0,41	13	25	10,98	11,08 ± 0,1
14	25	19,92		14	25	11,07	
15	25	19,63		15	25	11,18	
16	50	19,12	19,89 ± 0,69	16	50	11,72	11,84 ± 0,12
17	50	20,1		17	50	11,83	
18	50	20,45		18	50	11,96	
19	76,9	20,3	20,07 ± 0,2	19	76,9	12,48	12,59 ± 0,1
20	76,9	19,97		20	76,9	12,62	
21	76,9	19,96		21	76,9	12,68	
22	100	20,06	20,78 ± 1,09	22	100	13,43	13,86 ± 0,38
23	100	20,23		23	100	13,98	
24	100	22,03		24	100	14,16	

ITS2a F/R ve 18s rDNA primer çifti ile salep/mısır unu karışımı örnekleri ile yapılan realtime analizi verileri

Ek 8. Bağıl kantifikasyon analizi raporu

Relative Quant. Analysis

Delta Delta CT

Experiment Information

Run Name	Run 2017-07-20 (1) patates nisastasi salep 20 07 1017-copy-%99 kurve (SON)
Run Start	20.07.2017 17:30:54
Run Finish	20.07.2017 18:29:29
Operator	Eda Kabacaoglu
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.0.3.2
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5,

Colour	Replicate Name	GOI CT	Norm. CT	Relative Conc.	Calibrator
	NTC	31,96	32,25	1678,27	
	%100	29,58	13,47	0,02	
	%75	21,09	12,32	3,15	
	%25	20,58	10,98	1,78	
	%10	20,98	11,10	1,45	
	%5	20,71	10,70	1,33	
	%2	20,92	10,60	1,08	
	%0	21,18	10,76	1,00	Yes

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.0.3 (Build 2)
Copyright © 2008 Corbett Life Science, a QIAGEN Company. All rights reserved.
ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

ÖZGEÇMİŞ



EDA KABACAOĞLU

edakabacaoglu@gmail.com

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2010-2012	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans 2004-2009	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırmacı 2015-2017	"Salda Gölünden İzole Edilen Alkalifilik Bakteri Suşlarının Siklodekstrin Glukoziltransferaz (SGTaz) Enzimi Üretme Yetenekleri Ve SGTaz Geni Üzerine Araştırmalar" Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Proje numarası: 2011.01.0102.008
Araştırmacı 2011-2014	"Salep İçeriğinin Tespiti için Moleküler Marker Geliştirilmesi Üzerine Araştırmalar" TUBİTAK-Program Kodu: 1001 Proje No: 114O197

ESERLER:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Kabacaoğlu, E., Karakaş Budak, B. (2017). Heterologous expression of β-γ-type cyclodextrin glycosyltransferase of newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. SD5 in *Pichia pastoris*. Starch-Stärke, 69(9–10), 1600365. Doi.org/10.1002/star.201600365

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Kabacaoglu E., Karakas B. (2016). Recombinant Production of Bacterial Cyclodextrin Glycosyltransferase Enzyme in the Yeast Pichia Pastoris, FoodMicro2016, 19-22 July 2016, Dublin, Ireland, p.163.(Poster sunumu)

2- Kabacaoğlu E., Karakaş B. 2016. Exploiting genetic sources from alkali lakes – isolation of alkalophilic bacteria from soda lakes in Turkey and their utilization for production of CGTase, Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB2016), 23-27 May 2016, Antalya, Türkiye, p180.(Sözlü sunum)