



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN MEYAN TÜRLERİNİN
GENOM BÜYÜKLÜKLERİNİN BELİRLENMESİ VE GLİSİRİZİN
BİYOSENTEZİNDEKİ GENLERİN İFADE ANALİZLERİ**

Sevda ÖZGÜR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
EYLÜL-2015**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN MEYAN TÜRLERİNİN
GENOM BÜYÜKLÜKLERİNİN BELİRLENMESİ VE GLİSİRİZİN
BİYOSENTEZİNDEKİ GENLERİN İFADE ANALİZLERİ**

Sevda ÖZGÜR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
EYLÜL-2015

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

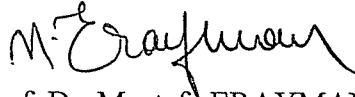
**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN MEYAN TÜRLERİNİN GENOM
BÜYÜKLÜKLERİNİN BELİRLENMESİ VE GLİSİRİZİN
BİYOSENTEZİNDEKİ GENLERİN İFADE ANALİZLERİ**

Sevda ÖZGÜR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

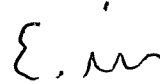
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 01/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN
Başkan

Prof. Dr. Birgül ÖZCAN
Üye



Yrd. Doç. Dr. Emre İLHAN
Üye

Kod No: 865

Prof. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 12046

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

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Sevda ÖZGÜR

ÖZET

DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞEN MEYAN TÜRLERİNİN GENOM BÜYÜKLÜKLERİNİN BELİRLENMESİ VE GLİSİRİZİN BİYOSENTEZİNDEKİ GENLERİN İFADE ANALİZLERİ

Meyan (*Glycyrrhiza* spp.) baklagiller (*Fabaceae*) familyasının bir üyesidir. Ülkemizde meyanın 6 türü bulunmaktadır. Meyan kökünün ana maddesi glisirizin şekerden elli kat daha tatlıdır. Glisirizin meyan kökünün % 6-14'ünü oluşturur. Birçok gen glisirizin biyosentezinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki Hatay ilinin dört farklı coğrafik bölgesinden (Altınözü İskenderun, Kırıkhan, Serinyol) toplanan üç farklı meyan türü için (*G. flavescens* Boiss, *G. glabra* L. var. *glandulifera* ve *G. echinata* L.) genom içerik belirlenmesi ve glisirizin biyosentezinde rol oynayan genlerin ifade analizleri yapılmıştır. Ayrıca bu güne kadar meyan türlerinin genom büyüklüğü hakkında bilgi yetersiz olduğu karşılaştırmalı bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu çalışmada üç farklı *Glycyrrhiza* türünün genomları flow sitometri metoduyla karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Sonuçlara göre *G. flavescence* türü *G. glabra* ve *G. echinata* türlerinden daha büyük genom içeriğine sahip bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları glisirizin sentezi yolağındaki genlerin fonksiyonlarını anlamamıza yardımcı olacağı gibi meyan türlerinin genomik büyüklükleri hakkında bilgi verip daha ileri dizileme çalışmalarına uygunluğu konusunda bilgi verecektir.

2015, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: Meyan, glisirizin, flow sitometri, qRT-PCR, gen ifade oranı

ABSTRACT

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF GLYCYRRHIZIN BIOSYNTHESIS AND GENOME SIZE ANALYSIS OF *GLYCYRRHIZA* SPECIES IN THE EAST MEDITERRANEAN REGION

Licorice (*Glycyrrhiza* spp.) is a member of *Fabaceae* family. Six species of licorice are found in Turkey. Glycyrrhizin, the main component of licorice's root is fifty times sweeter than sugar. The roots of licorice contain 6-14% of glycyrrhizin. Many genes play role in the biosynthesis of glycyrrhizin. In this study, we performed genome content determination and gene expression analysis for the genes in glycyrrhizin pathway of three different licorice species (*G. flavescens* Boiss, *G. glabra* L. var. *glandulifera* ve *G. echinata* L.) collected from four different geographical regions of Hatay Province (Altınözü, İskenderun, Kırıkhan, and Serinyol) in the East Mediterranean Region. In addition, there have been limited reports about the genome sizes of *Glycyrrhiza* species and no information was found about their genome size comparisons. Genome size information is critical before sequencing the whole genome. In this study, genome sizes of three different *Glycyrrhiza* species was comparatively analyzed for the first time by using flow cytometry method. Results showed that *G. flavescens* had larger DNA content than did *G. glabra* ve *G. echinata*. The results of this study will be helpful understanding the function of genes in the Glycyrrhizin pathway and genomic structure of *Glycyrrhiza* species whether they are amenable for further sequencing research.

2015, 54 pages

Keywords: Licorice, glycyrrhizin, flow cytometry, qRT-PCR, gene expression rate.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi sırasında bilimsel katkı ve önerileri ile yol gösteren, her türlü maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, büyük titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan saygı değer Danışmanım Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN' a,

Laboratuvar çalışmasında yardımlarını benden esirgemeyen, büyük sabır, özveri ve moral verici destekleri nedeniyle sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Emre İLHAN' a,

Tez çalışmam sırasında arazi çalışmalarında ve değerli katkı ve görüşlerini benden esirgemeyen Arş. Gör. Faruk KARAHAN' a,

Çalışmalarım sırasında değerli görüş, katkı ve bilgileri için Dr. Abdil Hakan EREN ve yüksek lisans öğrencisi Emre İSHAKOĞLU'na,

Tezin yürütülmesi sırasında bana laboratuvarını açarak bu çalışmanın devamını sağlayan Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi saygı değer Prof. Dr. Metin TUNA'ya ve laboratuvar ekibine,

Çalışmamın her aşamasında büyük emeği olan maddi ve manevi desteklerini benden asla esirgemeyen, her zaman moral kaynağım olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM	10
3.1. Bitki Materyalinin Elde Edilmesi	10
3.2. Flow Sitometri İçin Çekirdek DNA İzolasyonu	10
3.3. qRT-PCR için Toplam RNA İzolasyonu ve Saflaştırma	11
3.4. Toplam RNA İzolasyonu	12
3.4.1. RNA Konsantrasyonlarının Tespit Edilmesi	13
3.4.2. cDNA Sentezinin Yapılması.....	13
3.4.3. cDNA'ların GAPDH Geni ile Doğrulanması	14
3.4.4. Çalışmada Kullanılan Primerler	14
3.5. qRT-PCR İle Gen İfade Analizi.....	17
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	20
4.1. Flow Sitometri Analizleri	20
4.2. cDNA Analizi	22
4.2.1. Çalışmada Kullanılan Primerler	23
4.2.2. Gen İfade Oranlarının Tespit Edilmesi.....	24
4.2.3. qRT-PCR Sonuçlarına Göre Tür içi Gen İfade Düzeyleri.....	26
4.2.4. qT-PCR Sonuçlarına Göre Türler Arası Gen ifade Düzeyi	38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Real-time PCR analiziyle meyan bitkisinin farklı organlarından elde edilen sitokrom P450 (A) ve glikoziltransferanz (B) genleri	15
Şekil 4.1. <i>G. glabra</i> ile <i>Vicia sativa</i> bitkisinin floresan yoğunlukları	20
Şekil 4.2. <i>G. echinata</i> ile <i>Vicia sativa</i> bitkisinin floresan yoğunlukları	20
Şekil 4.3. <i>G. flavescens</i> ile <i>Vicia sativa</i> bitkisinin floresan yoğunlukları.....	20
Şekil 4.4. <i>G. glabra</i> , <i>G. flavescens</i> ve <i>G. echinata</i> türlerinin flow sitometri sonucu.....	21
Şekil 4.5. Referans gen primeri olan GAPDH ile cDNA sentezinin kontrolü.....	23
Şekil 4.6. <i>Glycyrrhiza sp.</i> ait türlerinin cDNA'ları ile yapılan touchdown PCR sonuçları	23
Şekil 4.7. GAPDH primerine ait meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analiz sonucu (sağda).....	24
Şekil 4.8. HQGT primerinin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analiz sonucu (sağda)	24
Şekil 4.9. UGT73B2 primerinin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda).....	25
Şekil 4.10. UGT74E2 genine ait primerin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları(solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda).....	25
Şekil 4.11. UGT89 genine ait primerinin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda).....	25
Şekil 4.12. CYP71D7 genine ait primerin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda).....	25
Şekil 4.13. CYP707A7 genine ait primerin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları(solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda).....	26
Şekil 4.14. CYP75B2 genine ait primerin meyan çeşitlerindeki qRT-PCRsonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)	26
Şekil 4.15. CYP88D6 genine ait primerin meyan türlerindeki qRT-PCRsonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda).....	26
Şekil 4.16. UGT73B2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	27
Şekil 4.17. UGT73B2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.	27
Şekil 4.18. UGT73B2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.	28
Şekil 4.19. HQGT geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması	28
Şekil 4.20. HQGT geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması	29
Şekil 4.21. HQGT geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması	29
Şekil 4.22. UGT74E2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması	30
Şekil 4.23. UGT74E2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	30
Şekil 4.24. UGT74E2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	31

Şekil 4.25. UGT89 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	31
Şekil 4.26. UGT89 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	32
Şekil 4.27. UGT89 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	32
Şekil 4.28. CYP71D7 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	33
Şekil 4.29. CYP71D7 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	33
Şekil 4.30. CYP71D7 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	33
Şekil 4.31. CYP75B2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	34
Şekil 4.32. CYP75B2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	34
Şekil 4.33. CYP75B2 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	35
Şekil 4.34. CYP707A7 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	35
Şekil 4.35. CYP707A7 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.36. CYP707A7 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.37. CYP88D6 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. glabra</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.38. CYP88D6 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. flavescens</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.39. CYP88D6 geninin farklı bölgelerden toplanan <i>G. echinata</i> türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.40. HQT geninin türler arası ekspresyon oranı.....	38
Şekil 4.41. UGT73B2 geninin türler arası gen ifade oranı.....	39
Şekil 4.42. UGT74E2 geninin türler arası gen ifade oranı.....	39
Şekil 4.43. UGT89 geninin türler arası gen ifade oranı.....	40
Şekil 4.44. CYP71D7 geninin türler arası gen ifade oranı.....	40
Şekil 4.45. CYP707A7 geninin türler arası gen ifade oranı.....	41
Şekil 4.46. CYP75B2 geninin türler arası ifade oranı.....	41
Şekil 4.47. CYP88D6 geninin türler arası ifade oranı.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada toplanan meyan türleri	10
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan genotiplere ait nanodrop ölçümleri	13
Çizelge 3.3. cDNA sentez karışımı	14
Çizelge 3.4. P450 gen ailesine ve glikoziltransferaz gen ailesine dâhil ve glisirizin üretimiyle doğru orantılı olarak ifade edilen aday genler	16
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primerler.....	16
Çizelge 3.6. Glisirizin biyosentezinde rol alan genlerin diğer baklagil bitkilerinde bulunma durumu	17
Çizelge 4.1. Her 3 türden 6 bitkinin çekirdek DNA içeriğinin ortalaması	21

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NaCl	Sodyum Klorür
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
ng	Nanogram
pg	Pikogram
EtOH	Etanol
Ct	Eşik Döngü Değeri
PI	Propidium İyodür

KISALTMALAR

bAS	Beta Amyrin Sentaz
BLAST	Temel Lokal Hiza Tarama Aracı
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosidtrifosfat
dsDNA	Çift İplikli DNA
DTT	Dithiothreitol
EST	İfadesi Etiketlenmiş Dizi
P450	Sitokrom P450
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Kantitatif Özellikli Bölge
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
qRT-PCR	Kantitatif Real Time PCR
TE	Tris EDTA
T _m	Erime Sıcaklığı
DTT	Dithiothreitol
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
ISSR	Basit Sekans Tekrarlanmaları Arası Polimorfizm
ITS ₂	Transkripsiyon Ara Bölgesi

1. GİRİŞ

Meyan (*Glycyrrhiza* spp.) baklagiller familyasının bir üyesidir. Dünya üzerinde yayılmış 12 türü bulunan meyanın ülkemizde de 8 takson bulunmakta olup, bu türlerden *Glycyrrhiza. glabra*'ya ait 2 varyete bulunmaktadır (Akan ve Balos, 2008). Meyan (*G. glabra*) $2n=16$ kromozoma sahip diploit bir bitki olduğu belirlenmiştir (Nafanailova, 1989; Li ve Wei, 1992; Ghaffari ve Chariat-Panahi, 1985). Meyan ülkemizin Güney, Orta ve Doğu Anadolu Bölgelerinde doğal olarak yetişmekte olup, özellikle Güney Bölgelerinde endemik bazı türleri bulunmaktadır. Doğu Akdeniz Bölümünde bulunan Hatay ilinde biri endemik olmak üzere üç farklı meyan türü yaygın olarak bulunmakta ve ekonomik olarak değerlendirilmektedir.

Ülkemizde bulunan meyan türleri ve endemizmeleri aşağıda verilmiştir:

G. asymmetrica Hub.-Mor. (Endemik)

G. iconica Hub.-Mor. (Endemik)

G. aspera Pall.

G. flavescens Boiss. (Endemik)

G. echinata L.

G. glabra L. var. *glabra*

G. glabra L. var. *glandulifera* (Waldst. & Kit.) Boiss.

Fabaceae familyası çiçekli bitkiler arasında *Compositae*' den sonra ikinci büyük familyası olmaktadır (Baytop, 1991). *Fabaceae* familyası ekonomik açıdan da en önemli tarımsal ürünlerini içermektedir (Harborne, 1994). Baklagillerin tohumları zengin protein içeriğine sahip olması nedeniyle besin değeri yüksek gıda kaynağı olarak tercih edilmektedir. Genel olarak *Fabaceae* familyası gıda maddesinde, zirai, kimyasal ve tıbbi ilaçlar, kereste, boya, yeşil gübre, süs bitkisi, gıda maddesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Seçmen, 2008).

Doğu Akdeniz Bölgesinde meyan bitkisi Haziran-Temmuz ayları arasında sarı, mavi veya kahverengi çiçekler açan, 0,4-2,0 m yüksekliğe erişen çalimsı bir bitkidir. Yaprakları parçalıdır ve yaprakçıklar 4-7 çiftlidir. Çiçekleri ise başak şeklindedir. Taç ve çanak yaprakları iki dudaklıdır, üst dudak iki kısa dişli, alttaki ucu uzun dişli olduğu belirtilmiştir (Şerbetçi, 2007; Yao ve ark., 2008). Çok yıllık bir bitki olup sulak ve

nemli yerlerde yabani olarak yetişir. Meyveleri koyu kırmızı fasülye kapsülü şeklinde olup içinde 3-6 esmer tohum bulunmaktadır. Kazık şeklindeki kökleri ana gövde ve sürgünlerden oluşur. Kökleri etrafa yayılmış durumdadır (Coates ve ark., 2005).

Meyan bitkisinin tarihi çok eski zamanlara dayanmaktadır. Meyan Hititler ve Sümerler döneminde en önemli droglar arasında olmuştur. Yine Çin’de son 2000 yıldır meyan bitkisi geleneksel ilaç yapımında en fazla kullanılan bitki olmuştur (Akan ve Balos, 2008; Yao ve ark., 2008). Eski Çin’de meyan bitkisinin panzehir olarak kullanıldığı ilaçların olduğu kanıtlanmıştır. Yine *Glycyrrhiza*, Roma İmparatorluğu zamanında askerlerin susuzluğunu gidermek amacıyla kullanılmış olduğu kayıtlarda belirtilmiştir (Oğuz, 1987). Meyan kökleri soyularak veya soyulmadan kurutulularak pazarlanmaktadır (Asımgil, 1997; Baytop, 1999). Meyan bitkisinin kökleri ülkemizde yerel olarak meyan şerbeti yapımında kullanılmakta olup dünyada sigara, şarap, bira, kozmetik, kola, pasta ve şekerleme gibi farklı alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Şerbetçi, 2007; Yao ve ark., 2008; Zengin ve ark., 2013).

Meyan bitkisinin kökü mideyle ilgili sağlık problemlerinde son derece etkili olup en etkili anti-ülser ilaçlarından biridir. Yine meyan kökü cilt problemlerine de iyi gelmekle beraber ciltte oluşan akne tedavisinde etkili olarak kullanılmaktadır (Asımgil 1997; Baytop 1999). Soyulmamış kuru kökleri ve rizomları tıbbi açıdan kullanılmaktadır (Gruenwald, 2000).

Bu çalışmamızın amacı beta-amrin molekülünün oksidasyonunda başlıca görev aldığı düşünülen aday genlerin yanısıra glisirizin yolağındaki moleküllere şeker bağlama işlevini gören ve glisirizin üretimine potansiyel katkıları olduğu düşünülen bazı genlerin türe ve yetiştikleri ortama göre ifade değişimleri incelemektir. Bu amaç için Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak bulunan *G. glabra* ve *G. echinata* ile yine bu bölgeye endemik *G. flavescens* türleri farklı bölgelerden toplanmış ve glisirizin biyosentezinde rol aldığı düşünülen genlerin türe ve bölgeye göre ifade değişimleri real-time PCR metoduyla analiz edilmiştir. Bu enzimlerin ifade oranlarının belirlenmesi glisirizin sentezini daha iyi anlamamızı sağlayacağı gibi değişik meyan türlerindeki değişimlerin incelenmesi de bu türlerdeki etkili maddelerin modifiye edilme imkânlarını araştırabilmemize yardımcı olacaktır. Bu nedenle veritabanları incelenerek elde edilen bu enzimlere ait dizi bilgileri elde edilip bu enzimlerin gen ifadelerinin belirlenmesi Real Time PCR yöntemiyle mümkün olabilmektedir.

Meyan türlerinin çok önemli tıbbi ve ticari değere sahip olmasından dolayı özellikle tüm genom dizilemesinin yapılması bu türe ait genom bilgilerinin deşifre edilmesi açısından son derece önemli olacaktır. Ancak bu türe ait genom büyüklüklerinin bilinmesi öncelikli bir adımdır ve dizileme çalışmasının fizibilitesinin yapılması buna dayanmaktadır. Şu ana kadar meyan türlerinin genom büyüklüklerini pikogram ya da megabaz çifti açısından belirleyen herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamış olup bu çalışmanın sonuçları uluslararası alanda da yayınlanma potansiyeline sahip olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ress ve Walters (1965); Southern (1967); Price ve Bachmann (1975); Ohri (1998); Özkan ve ark. (2003), türler arasında çekirdek DNA içeriği bakımından önemli farklılıklar gösterdiği için DNA içerik bilgisi taksonomik ve evrim çalışmaları için oldukça önemli olduğu belirtilmiştir.

Takino ve ark. (1979); Okada ve ark. (1981); Bradley (1992), yaptıkları çalışmalarda meyan kökünün 2-9% civarını glisirizik asitin potasyum ve kalsiyum tuzlarının bir karışımı olan glisirizini oluşturduğu belirlenmiştir.

Forkmann ve Stotz (1981); Stotz ve ark. (1985), CYP75B ailesinin enzimatik aktivitesini süs bitkisi türlerinin çiçek özütlerinde belirlenmiştir.

Bozan (1988), *G. glabra* diğer türlere oranla daha yaygın geniş alana sahip olduğu ve köklerinin tatlı olmasından dolayı drog etmek amacıyla sadece *Glycrrhiza glabra* L. türü kullanılacağı belirlenmiştir.

Bozan (1988), yapılan çalışmalara göre meyan kökünde yaklaşık %1 ile %24 arasında glisirizin maddesi belirlenmiştir. Analiz yöntemine bağlı olarak glisirizin miktarı önemli ölçüde farklılıklar göstermiştir.

Arumunathagan ve Earl (1991), genom büyüklüğünü ölçmede en etkili metotlardan birisi de flow sitometri yöntemi olup bu yöntemle birçok bitkinin genom büyüklükleri tespit edilmiştir.

Dolezel ve ark. (1992), flow sitometri yöntemi ile yaprak dokularındaki çekirdek DNA içeriği tespit edilebilmekte ve DNA miktarıyla kromozom sayısı karşılaştırılarak bitkinin ploid seviyesi belirlendiği ifade edilmiştir.

Greilhuber ve Ebert (1994), *Fabaceae* familyasına ait olan *Glycine max* (soya) flow sitometri analizi ile çekirdek DNA içeriği 1.134 pg olarak bulunmuştur.

Bennett ve Leitch (1995), çekirdek DNA içeriği hem bitki hücreleri arasında hem de aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeden sabit kaldığı belirlenmiştir.

Jaroszeski ve ark. (1998), lazer ışığı akan hücreleri aydınlatmak için hücrelere odaklanır ve hücrelerden floresan ışık yayıldığı gözlenmiştir. Bir hücrede farklı sayılarda ışınım miktarı, ışığın hızına ve odaklanan ışığın büyüklüğüne bağlı olarak değişebileceği ifade edilmiştir. Hücrelerden yayılan floresan ışığı her yere yayılarak bir yerde toplanır ve saçılan lazer ışınları filtre edildiğini ve bu sayede 100 bin hücre analiz edildiği belirtilmiştir.

Bishop ve ark. (1999); Shibuya ve ark. (2006); Fujita ve ark. (2006); Seki ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmada glisirizin meydana gelmesindeki birden fazla oksidasyon ve glikolizasyon, sırasıyla P450 (Sitokrom P450=CYP) ve glikoziltransferaz süper ailesi tarafından katalize edildiği belirlenmiştir. Ayrıca triterpen ve steroller üzerine etkili olduğu bilinen tüm sitokrom P450'ler iki klanda toplandığını, CYP71 ile CYP85 klanları ve bu klanlar sırasıyla CYP93 ve CYP88 içerdiği belirlenmiştir.

Hayashi ve ark. (1999); Hayashi ve ark. (2001), CYP88D6, *in vitro* enzimatik aktiviteyle karakterize olduğunu ve 11-oxo- β -amyrin üretmek için β -amirin oksidasyonunun katalizlendiği belirlenmiştir.

Ormerod (2000), flow sitometri analizi yapılacak hücrelerin hacmi yaklaşık olarak 10^3 den küçük olması gerektiği ifade edilmiştir. Yine örneklerin konsantrasyonu da çok önemli olduğunu, örnek çok fazla ama hedef dışı partikül varsa sinyal değerlendirme sırasında bazı hedef hücreler kaçabildiği ifade edilmiştir.

Ralston ve ark. (2001); Wust ve ark. (2001), CYP71D, CYP71 klanının bir üyesi olup monoterpenoidlerin oksidasyonunda rol oynadığı gözlenmiş olup, CYP71D ailesi yüksek derecede farklı fonksiyonlara sahip olduğu ifade edilmiştir. CYP71D ailesinden olan CYP71D353 en son belirlenmesi CYP71D ailesinin sıradışı bir büyüklüğü olduğunu belirtilmiştir.

Danielson (2002); Sigel ve ark. (2007), sitokrom P450 çok geniş ve çeşitli bir hemoprotein süper ailesi olduğunu ve tüm yüksek yapılı organizmalarda bulunduğu belirlenmiştir.

Kim ve Tsukaya (2002), bitkilerde P450, terpenoidler dâhil sekonder metabolitlerin biyosentezi ile çok farklı reaksiyonları katalize ettiği belirlenmiştir.

Herzenberg ve ark. (2002); Kumaraguru ve ark. (2004); Ibrahim ve Engh. (2007); Kima ve ark. (2008), önceleri sadece hematoloji laboratuvarlarında kullanılan flow sitometri cihazı günümüzde immünoloji, onkoloji, viroloji, bakteriyoloji, mikoloji, patoloji, histoloji, biyokimya, gibi klinik laboratuvarlarda ve deniz bilimi araştırmaların da yaygın olarak kullanıldığı belirtilmiştir.

Vlaciłova ve ark. (2002), *Glycyrrhiza* ile aynı familyada olan *Cicer arietinum* L. (Nohut)'da flow sitometri analizi ile türün fiziksel genom büyüklüğü belirlenmiştir.

Davidson ve ark. (2003); Shibuya ve ark. (2006); Seki ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmalarda CYP88 ve CYP93 ailelerinin bazı üyeleri kendine has bir

reaksiyon hassasiyetiyle β -amyrin veya ilgili triterpenlerin substratları üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

Shapiro (2003), flow sitometri ile ilgili ilk çalışmalar 1980' lerin başında o dönemin gizemli hastalığı olan HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü) in tespiti sırasında yapılmıştır.

Davidson (2003); Shibuya (2006); Seki ve ark. (2008), yapmış oldukları çalışmalarda sitokrom P450 gen ailesi içerisinde bulunan genlerden bazılarının beta-amrin molekülü üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

Dunphy (2004), flow sitometri hücre veya partiküllerin karakteristiklerin ölçümü olduğu ifade edilmiştir. Hücre veya partiküller lazer ışığı ile aydınlatılarak bir bölmeden geçtiğini ve hücrelerin ışığın önünden geçerken yaydıkları sinyaller toplandığı gözlenmiştir. Oluşan sinyal kaynakları hücrenin büyüklüğünü, DNA içeriğini, enzim aktivitelerini, hücre membran potansiyelini, canlılık gibi çeşitli özellikler hakkında bilgi verdiği belirtilmiştir.

Dunphy (2004), flow sitometrinin çalışma prensibi 1870 yıllara dayanmakta olup, 1969 yılında argon lazerinin kullanılmaya başlanmasıyla günümüze kadar geldiği ifade edilmiştir.

Daniel (2004), flow sitometri cihazının en güçlü özelliği hücreleri fiziksel olarak birbirinden ayırt edebilmesi olduğunu, böylece spesifik hücreleri elde etmek mümkün olduğu belirtilmiştir.

Kubalakova ve ark. (2005), flow sitometri yöntemiyle buğday genomunun bir seferde kromozom kollarına göre ayrışması imkânı bu metot kullanılarak sağlamış olduğu belirtilmiştir.

Gachon ve ark. (2005), glikoziltransferazların çok yaygın bir enzim ailesi olduğunu ve çoklu gen ailesi tarafından kodlandığı bildirilmiştir.

Rahman (2006); Deniz (2007), sitometri, hücrelerin veya biyolojik parçacıkların fiziksel veya kimyasal karakterlerinin incelenmesi olup, flow ise akan bir sıvının içerisinde hücrelerin özelliklerinin belirlendiği açıklanmıştır.

İbrahim ve Engh (2007), flow sitometri cihazı son derece hızlı olmakla birlikte çok kısa bir sürede binlerce hücreyi analiz edebildiği açıklanmıştır.

Dolezel ve ark. (2007), flow sitometri analizi ile *Fabaceae* familyasına ait olan *Pisum sativum* (Bezelye) bitkisinin çekirdek DNA içeriği 9.09 pg olarak belirlenmiştir.

Flow Cytometry Report (2008), flow sitometri cihazı dünya pazarındaki satış hacmi, 2008 yılından itibaren 15 Milyar ABD doları olduğu tespit edilmiş olup, dünyada yaklaşık olarak yedi bin adet flow sitometri cihazı olduğu raporlarda belirtilmiştir.

Yao ve ark. (2008), genetik çeşitliliği belirlenmek amacıyla *G. uralensis* türünde ISSR (Basit sekans tekrarlanmaları arası polimorfizm) markörü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 14 ISSR markörü ile 4 yabancı *G. uralensis* bitkisine ait 70 bireyden 249 polimorfik bant elde edilmiştir.

Lu ve ark. (2008), CYP93 ve CYP88 bu iki sitokrom P450 geninin dizilenmesi geleneksel EST (İfadesi Etiketlenmiş Dizi) dizileme metoduna dayanarak *G. uralensis*’den elde edilmiştir.

Seki ve ark. (2008), sitokrom P450 genlerden kökte daha fazla üretilen CYP88D6’nın beta-amrin molekülünü c-11 atomunu okside ederek 11-oxo-beta-amrin molekülünü ürettiği gözlenmiştir.

Lu ve ark. (2008), triterpen yapısıyla ilişkili *G. uralensis*’deki glisirizin çeşitli kimyasal ve farmakolojik özellikleri yoğun bir şekilde çalışılmasına rağmen, bileşiğin biyosentetik yolu tam anlaşılmadığı belirtilmiştir.

Yao ve ark. (2008), yapmış olduğu çalışmada meyan bitkisi kökü glisirizin adı verilen bir glikozit içerdiğini belirtmiştir. Bu glikozit şeker olmayan bir tatlandırıcı olup, meyan kökünün % 6 ila %14’ünü oluşturduğu gözlenmiştir.

Seki ve ark. (2008), sitokrom P450 monooksijenaz olan CYP88D6, CYP88 enzimlerinin bir alt kolu olup *Fabaceae* familyasında sınırlı olarak görülmüştür.

Seki ve ark. (2008), CYP88D6 enzimi glisirizin biyosentezinden sorumlu olan 11-oxo- β -amyrin için amyrin sentezleme işlemlerini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. CYP88D6 ekspresyon seviyesi glisirizin maddesinin miktarıyla orantılı olup gen ifade seviyesi yaprak ve gövdeden daha çok köklerde meydana geldiği belirlenmiştir.

Dewick (2009), yapmış olduğu çalışmada yaklaşık 120 glikoziltransferaz genini *Arabidopsis*’de belirlenmiştir. Glikoziltransferazlar glikolizasyon sırasında sıkça kullandığı çok özel substratların sekonder metabolitlerin sentezlenmesi için çok uygun olduğunu fakat *Glycyrrhiza*’da ilgili glikoziltransferazları kodlayan genlerin henüz belirlenmediği ifade edilmiştir.

Dewick (2009), CYP88D6 geni ifadesi ile 6 adet glikoziltransferaz unigenleri olan HQGT, UGT74, UGT89, UGT74E2, UGT73B5, UGT73B2 genlerinin ifadeleri birbirine benzer olduğunu, bu genlerin glikoziltransferaz aday genleri olup glisirizin biyosentezinde görevli enzimlerden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Glikoziltransferazlar nükleotidle aktive olan bir şeker molekülünü başka moleküle transfer ederek sekonder metabolitlerin üretiminde önemli görev aldığı ve glikoziltransferaz uni-genlerinin gen ifade profilinin CYP88D6 geni ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Li ve ark. (2010), *G. uralensis* ile yapılan bir başka çalışmada real- time PCR yöntemiyle glisirizin biyosentezinin oluşmasında etkili olan aday genlerin vejetatif organlarındaki ifade düzeylerine bakılmıştır.

Li ve ark. (2010), yapmış olduğu çalışmada CYP88D6, CYP75B2, CYP71D7 ve CYP707A7 transkriptlerinin sitokrom P450 aday genleri olduğu ifade edilmiştir.

Gao ve ark. (2010), *G. glabra*, *G. uralensis* ve *G. inflata* türlerinde ITS₂ (Transkripsiyon ara bölgesi) gen bölgesi araştırılarak moleküler karakterizasyon yapmıştır. Cins ve tür bakımından önemli varyasyonlar tespit edildiği için bu bitkilerde genetik varyasyonu belirlemek amacıyla ITS₂ gen bölgesinin etkin bir belirteç olduğu tespit edilmiştir.

Seki ve ark. (2011), glisirizin 2,3-oxidosqualene maddesinin halkasal hale gelmesiyle oluşan β -amyrin terpenlerinden türevlenmiş bir madde olduğu belirlenmiştir. Glisirizin oluşana dek bir dizi oksidasyon ve glikolizasyon olayı gerçekleştiğini ve bu işlem üç adımda gerçekleştiği belirtilmiştir. İlk adımda bAS (Beta amyrin sentaz) enzimiyle aktifleşen β -amyrin'in oksidasyonu ile 11-oxo β -amyrin meydana gelmesi, ikinci adımda 11-oxo β -amyrin'in oksidasyonu ile glisirizik asit meydana gelir. Son adımda ise glisirizik asite şeker bağlanmasıyla glisirizin oluştuğu ifade edilmiştir.

Nelson ve ark. (2011), CYP75, CYP71 klanının bir alt kolu olup angiosperm ve gymnosperlerde bulunduğunu belirtmişlerdir.

Anonim (2011), ülkemizde meyan kökü bitkisi uzun yıllardan beri Amerika, Avrupa, Afrika, Orta Doğu ve Uzak Doğu ülkelerine ihraç edilmekle birlikte Fırat Kalkınma Ajansı' nın 2011 yılında hazırladığı rapora göre 2010 yılında yaklaşık 300.000 ton meyan kökü yurt dışına ihraç edilmiştir.

Ramilowski ve ark. (2013), *G. uralensis* transkriptomunda yaptıkları RNA-seq çalışmasında çok sayıda sitokrom P450 ailesindeki CYP geninin bAS enzimin kodlanmasında görev aldığını belirlemişlerdir.

Liu ve ark. (2014), glisirizik asit sentezindeki varyasyonların bu maddenin sentezlenmesinde görev alan genlerin kopya sayılarından önemli ölçüde etkilenebileceğini belirlemişlerdir.

Çetin ve ark. (2015), Türkiye’de yetişen meyan türlerinin kromozom sayılarının $2n=16$ olduğunu ve kromozom yapıları arasında varyasyonlar bulunduğunu belirlemişler en küçük haploid genom uzunluğunun *G. assymetrica*, en büyüğünün ise *G. echinata*’da bulunduğunu belirtmişlerdir.

Moghbel ve ark. (2015), *G. glabra* ve aspir bitkisine kolhisin uygulayarak flow sitometri yoluyla DNA içeriklerini belirlemişler ve kolhisin uygulamasının kromozom katlanmasına neden olduğunu gözlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

Araştırmada *Glycyrrhiza* cinsine ait üç taksonun yayılış gösterdiği alanlar Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araş. Gör. Faruk Karahan tarafından tespit edilmiştir Buna göre *G. glabra* Altınözü (ALT), Kırıkhan (KRH) ve Serinyol (SRY) bölgelerinden, *G. echinata* Kırıkhan (KRH) bölgesinden ve *G. flavescens* türü de İskenderun (ISK), ve Serinyol (SRY) bölgesinden toplanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada toplanan meyan türleri

Sıra No	Etiket	Örneğin Adı	Bitki Türü	Coğrafiik Lokasyon	Rakım (m)	Konum
1	SRYG-2	Serinyol-2	<i>G. glabra</i>	37° 25 957 K 40° 28 354 D	200	Dere kenarı- zeytin ağaçlarının kenarı
2	SRYG-1	Serinyol-1	<i>G. glabra</i>	37° 25 957 K 40° 28 354 D	200	Dere kenarı- zeytin ağaçlarının kenarı
3	KRHG-1	Kırıkhan-3	<i>G. glabra</i>	36° 43' 875 K 36° 54' 196 D	93	Kırıkhan-Kumlu yolu tarla kenarı
4	KRHG-2	Kırıkhan-4	<i>G. glabra</i>	36° 38' 106 K 36° 54' 243 D	97	Kırıkhan – Kumlu yolu, tarla kenarı
5	ALTG-1	Altınözü	<i>G. glabra</i>	36°21' 015 K 36° 19' 683 D	278	Antakya- Altınözü yol kenarı
6	ALTG-2	Altınözü	<i>G. glabra</i>	36°21' 015 K 36° 19' 683 D	278	Antakya- Altınözü yol kenarı
7	SRYF-1	Serinyol-2	<i>G. flavescens-2</i>	37° 25 957 K 40° 28 354 D	200	Dere kenarı- zeytin ağaçlarının kenarı
8	SRYF-2	Serinyol-2	<i>G. flavescens-1</i>	37° 25 957 K 40° 28 354 D	200	Dere kenarı- zeytin ağaçlarının kenarı
9	ISKF-1	Arsuz-1	<i>G. flavescens</i>	36° 29' 766 K 35° 79' 275 D	113	Arsuz kale köy civarından
10	SRYF	Serinyol-1	<i>G. flavescens</i>	37° 25 957 K 40° 28 354 D	200	Dere kenarı- zeytin ağaçlarının kenarı
11	KRHE-1	Kırıkhan-2	<i>G. echinata-1</i>	36° 47' 627 K 36° 46' 239 D	86	Muratpaşa Köyü Su kanalı kenarı
12	KRHE-2	Kırıkhan-1	<i>G. echinata-1</i>	36° 50' 231 K 36° 47' 531 D	80	Gölbaşı Köyü Su kanalı kenarı
13	KRHE-3	Kırıkhan-2	<i>G. echinata-2</i>	36° 47' 627 K 36° 46' 239 D	86	Muratpaşa Köyü Su kanalı kenarı
14	KRHE-4	Kırıkhan-1	<i>G. echinata-3</i>	36° 50' 231 K 36° 47' 531 D	80	Gölbaşı Köyü Su kanalı kenarı

3.2. Flow Sitometri İçin Çekirdek DNA İzolasyonu

Flow sitometri için bitki materyali olarak 3 *Glycyrrhiza* türü kullanılmıştır. *G. glabra* türü için ALTG-1'den 3 adet yaprak, *G. echinata* türü için KRHE-1'den 3 adet

yaprak, *G. flavescens* türü için ISK-1'den 3 adet yaprak olmak üzere toplam 9 yaprak alınmıştır. Her tür için alınan yaprak örnekleri bulk edilerek çekirdek DNA'sı izole edilerek 6 ölçüm yapılmıştır.

Çekirdek DNA içeriği Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Sitogenetik Laboratuvarında Cyflow® Space (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Almanya) cihazı ile yapılmıştır. Çekirdek DNA içeriği Arumuganathan ve Earle (1991) belirlediği metotta küçük değişiklikler yapılarak aşağıdaki şekilde uygulanmıştır. Çekirdek DNA içeriği, genellikle 'C' değeri olarak ölçülmektedir. Herhangi bir genotipin 'C' değeri (1C) genotipin sahip olduğu replike olamamış haploid kromozom takımının içerdiği DNA miktarını ifade etmektedir (Swift, 1950). Çalışmada standart olarak 3.35 pg DNA içeriğine sahip (Bennett ve Smith, 1991) tek yıllık bitki olan fiğ (*Vicia sativa*) bitkisi kullanılmıştır. Fiğ bitkisi çekirdek DNA içeriğinin ve kromozom sayısının meyana çok yakın olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Çekirdek DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonları ve çekirdek izolasyonu Arumuganathan ve Earle (1991)'e göre yapılmıştır.

Çekirdek DNA izolasyon protokolü

1. Bitkilerin genç (3-4 haftalık), sağlıklı ve taze yaprak dokusu (yaklaşık 40 mg) alınmıştır.
2. Bitki dokuları, buz üzerinde bulunan petri kabına yerleştirilmiştir.
3. Petri kabına 1 ml (Çözelti A) eklenerek jilet yardımıyla bitki dokuları küçük parçalara ayrılmıştır.
4. Parçalara ayrılmış olan bitki dokuları mikrosantrifüj tüpüne aktararak filtre edilmiştir.
5. Mikrosantrifüj tüpleri 14000 rpm'de 25-30 sn santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj edilen tüpün içerisindeki sıvı boşaltılmıştır.
7. Mikrosantrifüj tüpü dibinde oluşan tortuya 40 µL (Çözelti B) eklenmiştir.
8. Örnekler 37°C de 20 dk inkübe edildikten sonra flow sitometri ile analiz edilmiştir.

3.3. qRT-PCR için Toplam RNA İzolasyonu ve Saflaştırma

Çalışmada üç türe ait meyan köklerine ayrı ayrı RNA izolasyonları yapılmıştır. Örnekler sıvı azot içinde öğütülerek RNA izolasyonu için hazır hale getirilerek -84 °C de izolasyon anına kadar muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu EZ-RNA Total RNA

izolasyon Kiti (Biological Industries, İsrail) kullanılarak, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA çalışmalarında ön koşul, RNA yapısının korunmuş biçimde parçalanmadan izole edilmesidir. RNA parçalanmasına sebep olan en büyük etken ribonükleaz (RNaz) bulaşmasıdır. Çok az miktarda RNaz bulaşması dâhi sağlam RNA izolasyonunu engellemektedir. RNA izolasyonu aşamasında ortama RNaz bulaşmasını önlemek için denemede kullanılan bütün plastik malzemeler ile gerekli tüm çözeltiler, RNaz aktivitesini engelleyen dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiştir. DEPC muamelesine ilave olarak malzemeler, 121 °C ve 0,1 MPa basınçta 15 dakika otoklavlandıktan sonra 105 °C’de en az gece boyu bekletilmiştir. Havan ve havan kolları ise 300 °C’de gece boyu bekletilmiştir. RNA izolasyonu için RNaz ve DNaz lari filtreli pipet uçları kullanılmıştır. RNA izolasyonunda kullanılan pipetler ve RNA izolasyonun yapıldığı tezgâhın üzeri, RNaz bulaşmasını engellemek için %30’luk H₂O₂ ile temizlenmiştir.

3.4. Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu, EZ-RNA Total RNA izolasyon Kiti (Biological Industries, İsrail) kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamaları aşağıda verildiği gibi yapılmıştır.

1. Daha önce havanda öğütülen örnekler yaklaşık 100 mg doku gelecek şekilde eppendorf tüplerine tartılarak alınmıştır.
2. Denatürasyon çözeltilisinden eppendorf tüplerine 0,5 mL bırakılmıştır.
3. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. 0,5 ml ekstraksiyon çözeltilisine eklenerek hızlı bir şekilde 15 sn elle çalkalanmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.
5. 12000g’de 4°C’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
6. En üstteki faz temiz bir eppendorf tüpe alınmıştır.
7. RNA’yı çöktürmek için 0,5 ml izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
8. 12000g’de 4°C’de 8 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA peletine 1 ml %75 EtOH eklenerek vorteks yardımıyla yıkanmıştır.
10. 7500g’de 4°C’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

11. EtOH uzaklaştırılmış ve 5 dakika hava kurutması yapılmıştır.
12. RNA peleti 100 µl DEPC muameleli su ile çözünmüştür.
13. Çözelti 10 – 15 dakika 55°C’de bekletilmiştir.
14. $A_{260/280}$ O.D. değerinde RNA örnekleri 1.6 - 1.9 değerlerine sahip olmuştur.

3.4.1. RNA Konsantrasyonlarının Tespit Edilmesi

Toplam RNA konsantrasyonları ACTGene Spektrofotometre (ACTGene UVIS-99, NJ, USA) ölçümleri yapılarak $A_{260/280}$ O.D. değerindeki veriler alınmıştır (Çizelge 3.2) Bu sonuçlara göre tüm örneklerin toplam RNA’ları 0,5 µg olacak şekilde ayarlanarak %1,2’lik jel üzerinde gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan genotiplere ait nanodrop ölçümleri

Örnekler	Genotip	$A_{260/280}$	Konsantrasyon(ng/µL)
1	SRYG-2	1,76	365,5
2	SRYG-1	1,48	318,3
3	KRHG-1	1,48	122,6
4	KRHG-2	1,64	264,8
5	ALTG-1	1,74	153,6
6	ALTG-2	1,43	348,9
7	SRYF-1	1,60	115,7
8	SRYF-2	1,64	118,7
9	ISKF-1	1,54	55,1
10	SRYF	1,51	145,3
11	KRHE-1	1,55	274,4
12	KRHE-2	1,58	193,2
13	KRHE-3	1,51	149,9
14	KRHE-4	1,55	147,2

3.4.2. cDNA Sentezinin Yapılması

Ölçümleri yapılan toplam RNA’lar eşitlenerek Fermantas RevertAid First Strand cDNA sentez kitinin (#K1622) talimatları doğrultusunda yapılmıştır. cDNA sentez karışımının hazırlanması (Çizelge 3.3) aşağıdaki çizelge de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. cDNA sentez karışımı

Toplam RNA (0,5 µg/µl)	---
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	4 µl

Çizelge 3.3.(Devamı) cDNA sentez karışımı

10mM dNTP Mix	2 µl
Oligo(dT)18 Primer 100 µM, 0,5 µg/µl (15 A ₂₆₀ u/ml)	1 µl
Nükleaz free su	----
Toplam	20 µl

PCR cihazında 42°C’de 60 dakika inkübasyon yapılmıştır.

Sentez işlemini sonlandırmak için 70 °C’de 5 dakika bekletilmiştir.

- 20 °C’de saklanmıştır.

3.4.3. cDNA’ların GAPDH Geni ile Doğrulanması

Sentezlenen cDNA’lar, GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) primerleri referans olarak kullanılarak PCR analizi ile kontrol edilmiştir. PCR bileşenleri ve amplifikasyon parametreleri aşağıda sunulmuştur.

PCR bileşenleri

10X PCR Tamponu	2,00	µl
dNTP karışımı (her biri 1,0 mM)	2,00	µl
İleri primer (1,0 µM)	1,00	µl
Geri primer (1,0 µM)	1,00	µl
Taq polymeraz (50U/ µl)	0,60	µl
DEPC H ₂ O	12,40	µl
	19,00	µl
cDNA (1:200)	1,00	µl
Toplam	20,00	µl

Amplifikasyon parametreleri

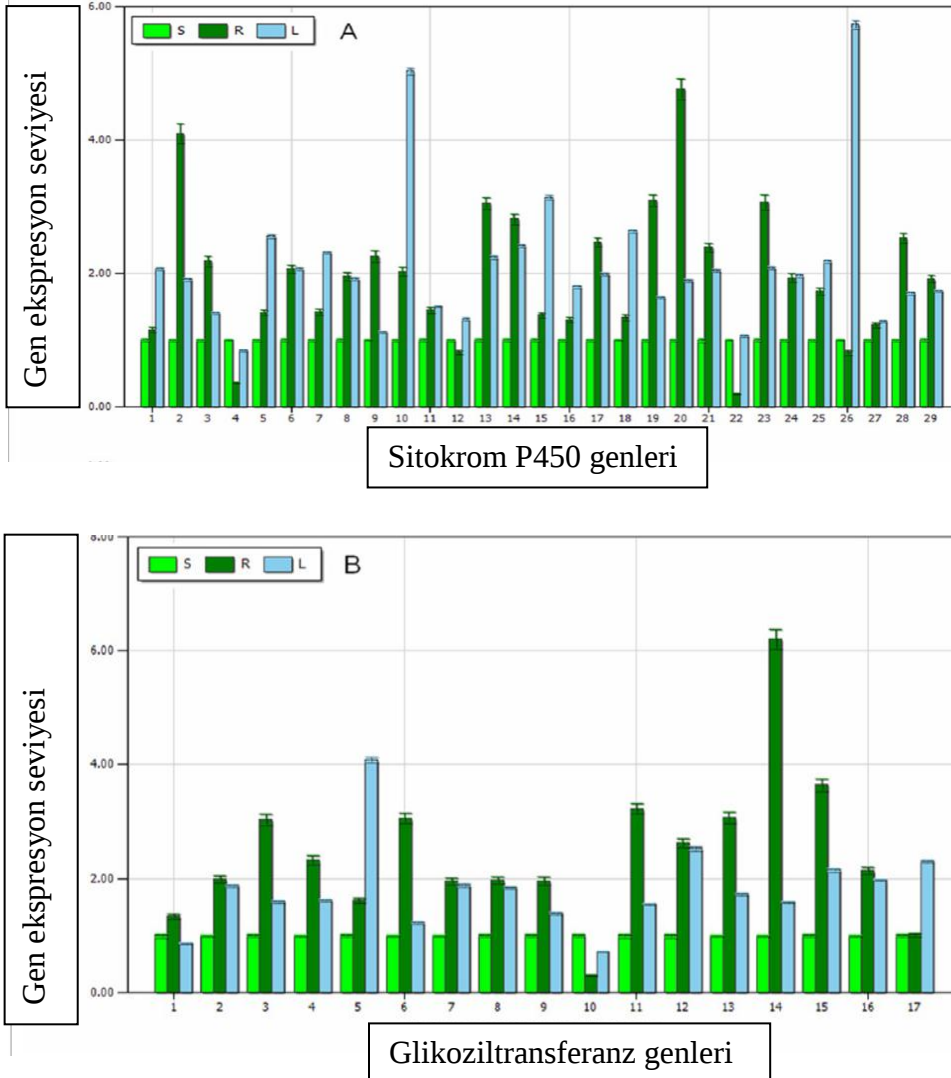
1. Başlangıç denaturasyonu	95 °C	5 dk	
2. Ayırışma	94 °C	30 sn	
3. Bağlanma	52 °C	30 sn	[35 döngü]
4. Uzama	72 °C	1 dk	
5. Son uzama	72 °C	10 dk	

PCR ürünleri %1,2 agaroz jelde koşturularak analiz edilmiştir.

3.4.4. Çalışmada Kullanılan Primerler

Primerlerden elde edilen gen parçalarının ifade düzeyleri glisirizin biyosentezinde önemli nokta olan 11-oxo β-amyrin geninin ifadesiyle doğru orantılı olduğundan dolayı, özellikle sitokrom P450 gen ailesi ve glikoziltransferaz gen ailesi dâhil aday genler (Şekil 3.1) için elde edilen primerler bu çalışmada kullanılmıştır. Hem aday genlerin, fonksiyonu hem de coğrafyaya ve türe göre değişim gösterip

göstermediği anlamak amacıyla bu genlerin ifadelerindeki varyasyonlar bu sayede incelenmiştir.



Şekil 3.1. Real-time PCR analiziyle meyan bitkisinin farklı organlarından elde edilen sitokrom P450 (A) ve glikoziltransferaz (B) genleri: R kök, S gövde, L yaprağı temsil etmektedir. A; bitkinin farklı organlarından elde edilen sitokrom P450 genleri, B; gen ekspresyonuyla farklı organlardan elde edilen glikoziltransferaz genleri (Li ve ark., 2010).

Çalışmamızdaki kullanılan primerler yukardaki şekilde özellikle köklerde glizirin üretiminde görev alan ve 11-oxo-beta amrin geni ile doğru orantılı olarak ifade gösteren sitokrom P450 ve glikoziltransferaz aday genleri arasından seçilmiştir.

Çizelge 3.4. P450 gen ailesine ve glikoziltransferaz gen ailesine dâhil ve glisirizin üretimiyle doğru orantılı olarak ifade edilen aday genler

Numara	Primerler	Karşılık geldiği gen
2	CYP88D6 (contig1314)*	Sitokrom-C P450 monooksijenaz (CYP88D6)
13	CYP75B2 (contig4911)*	<i>Medicago truncatula</i> Flavonoid 3'-hidroksilaz (MTR_3g025230) mRNA (CYP75B2)
20	CYP71D7 (contig07137)*	<i>Glycine max</i> Sitokrom P450 750A1-benzeri gen (CYP71D7)
23	CYP707A7 (contig7899)*	<i>Glycine max</i> absisik asit 8'-hidroksilaz 4-benzeri gen (CYP707A7)
3	UGT73B2 (contig1209)*	UDP-glukozil transferaz 73B2-benzeri gen (UGT73B2)
6	HQGT (contig3646)*	Hidrokinon glikoziltransferaz (HQGT)
11	UGT74 (contig5219)*	<i>Glycine max</i> UDP-glikoziltransferaz 74E2-benzeri gen (UGT74)
13	UGT89 (contig9428)*	<i>Glycine max</i> UDP-glikoziltransferaz 89B1-like (UGT89), <i>Medicago truncatula</i> Anthocyanidin 3-O-glikoziltransferaz (MTR_2g059240) mRNA (ANGT)
14	UGT74E2 (contig9463)*	<i>Glycine max</i> UDP-glikoziltransferaz 74E2-benzeri gen (UGT74E2)
15	UGT73B5 (contig9686)*	UDP-glikoziltransferaz 73B5 (UGT73B5)

* Gen dizi bilgisi ilgili contig parçalarından elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.5’de verilmiştir. Primer bağlanma sıcaklıkları primer içerisindeki bazların sayısını esas alan formüle $4(G+C)+2(A+T)^{\circ}C$ ve gradient PCR sonuçlarına göre tespit edilmiştir. Çizelge 3.5 ile ilgili nükleotid dizi araştırması NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) BLAST (Temel Lokal Hiza Tarama Aracı) programı kullanılarak tespit edilmiştir (Anonymous, 2013a).

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primerler

Primer Adı	İleri Primer	Geri Primer	Tm (°C)
UGT89	CGCTTCCACTAACCAACC	GTCCTTCACGTTTTCGATGC	58
HQGT	GAGTTGGCGAAACGAATCG	TTGGAAGGGCTTGGAGGAC	58
UGT74E2	ACCAAGTCACGAATGCAAAGC	TCAGTCTCCATTATTTCTTCACG	58
CYP707A7	AGCTTCCTCCAGGTTCAATGG	CGGACAACCCAGGATGTTAGTC	59,7
UGT73B5	TCCACCTCCAAAGACCTCG	TTTCGGCTTCAACGATGG	60

Çizelge 3.5. (Devamı) Çalışmada kullanılan primerler

UGT74	CAGATGGGTATGATGATGGAGG	TGAGTGAAGAAGGCAGCACC	60
CYP71D7	ACCACCAGAAAAACCACCACC	GGGGAAGTTACCACAACGGC	62
GADPH	AACGACCCTTTCATTTCCACC	AACAACGACTTCGGCACCAG	62
CYP88D6	CCCTGATTCATTCATCAACAACC	CCTACACATCTGAGGCTCACAAAC	63
CYP75B2	ATCAACCCCTCTTTCCCTCC	TCCACATCAGCCTTCTCACCAC	66,9
UGT73B2	CTGCGAGAATACCGAGTCAGC	AGAGTGGGAAGTAACCGAGGC	66,9

Ayrıca Çizelge 3.5’ de isimleri verilmiş olan genlerden özellikle baklagillerde sentezlenenler ve glisirizin biyosentezinde kritik öneme sahip olduğu düşünülen genler kullanılmış ve bunların listesi Çizelge 3.6’ da verilmiştir. Çizelge 3.6 NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) BLAST (Temel Lokal Hiza Tarama Aracı) programı kullanılarak tespit edilmiştir (Anonymous, 2013b).

Çizelge 3.6. Glisirizin biyosentezinde rol alan genlerin diğer baklagil bitkilerinde bulunma durumu

Enzim (Gen)	Bulunduğu Bitki
Acetyl-coa acetyltransferase	Soya
HMG-coa synthase	Lotus, Yonca
HMG-coa reductase	Yonca, Soya, Nohut, Bezelye, Çin meyan
Mevalonate kinase	Soya, Yonca, Nohut, Lotus
Phosphomevalonate-kinase	Soya, Yonca, Nohut, Lotus
Mevalonate-5-diphosphate decarboxylase	Yonca
DXP synthase	Soya, Yonca, Fasulye, Nohut, Lotus
DXP reductoisomerase	Soya, Yonca, Nohut, Lotus
MEP cytidyltransferase	Yonca
CDP-ME kinase	Yonca
MECDP synthase	Soya, Lotus, Yonca, Fasulye, Nohut
4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase	Soya, Nohut, Yonca
4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Soya, Nohut, Lotus, Yonca
İsopentenyl-PP isomerase	Yonca
Farnesyl diphosphate synthase	Meyan, Çin meyan
Squalene synthase	Çin meyan, Antep fıstığı, Meyan
Squalene monooxygenase	Soya, Nohut, Yonca, Bezelye, Lotus
β-amyrin synthase	Meyan, Çin meyan

3.5 qRT - PCR İle Gen İfade Analizi

Tüm real-time PCR örnekleri 3 tekerrürlü olarak koşturulmuştur. qRT-PCR analizinde, 1: 200 oranında seyreltilmiş cDNA’lar kalıp olarak kullanılmıştır. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon sıcaklık döngüsüne ait program aşağıda verilmiştir.

Tüm reaksiyonlar Bioneer Exicycler96[®] (Bioneer, South Korea) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Real-Time PCR reaksiyon bileşenleri

Toplam Karışım	: 12,5 µl
İleri primer (2,5 µM)	: 1,2 µl
Geri primer (2,5 µM)	: 1,2 µl
Ultra saf su	: 8,1 µl
cDNA [1:200]	: 2,0 µl

Son Hacim	: 25,0 µl
-----------	-----------

Real-Time PCR programı

Başlama sıcaklığı	: 95 °C	10 dk	
Ayrışma	: 95 °C	15 s	
Bağlanma	: 55 °C	30 s	40 döngü
Uzama	: 72 °C	30 s	
Erime	: 50 °C'den 94 °C'ye 3 s/her bir sıcaklık		

cDNA sentezi sonuçları elde edildikten sonra primerler ile kantitatif qRT-PCR yapılmıştır. qRT-PCR amplikasyonu sonucunda türler arasında SYBR Green sinyal grafikleri elde edilmiştir. Ayrıca primerlerin dimer oluşturup oluşturmadıklarını kontrol etmek için melting curve analizi yapılmıştır.

3.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Bir bitkinin çekirdek DNA içeriği mutlak olarak belirlenmek istenirse, bu bitkinin DNA içeriği, DNA içeriği bilinen bir standart ile kıyaslanarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Dolezel ve Bartos, 2005)

$$\text{Çekirdek DNA miktarı} = \frac{\text{DNA miktarı bilinmeyen türe ait} \times \text{florasan yoğunluğu} \text{ (G1 pikinin değeri)}}{\text{Standartta ait} \times \text{örneğin florasan yoğunluğu} \text{ (G1 pikinin değeri)}} \times \text{standartın DNA içeriği}$$

Flow sitometri çalışmasında meyan çekirdek DNA içeriklerinin istatistiksel analizi 6 tekrerrür olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre SPSS istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır.

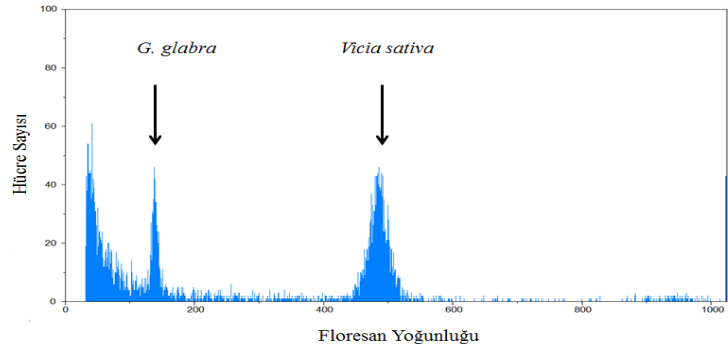
Gen ifade analizinde örneklerin eşik (threshold) değerleri, Bioneer yazılımı tarafından otomatik olarak belirlenmiştir. PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct

değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Buna karşın standart sapmayı yükselten veya azaltan bir tekerrür varsa bu tekerrür çıkarılmış ve ilgili örneğin sonucu 2 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Meyan türlerinde ifade düzeyi, Livak ve Schmittgen (2001) göre $2^{-\Delta\Delta C_t}$ oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir.

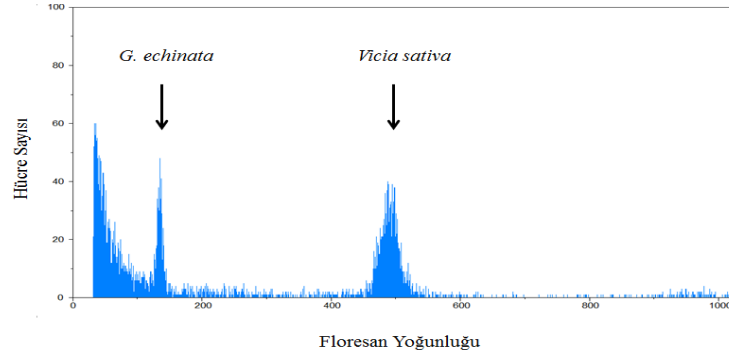
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Flow Sitometri Analizleri

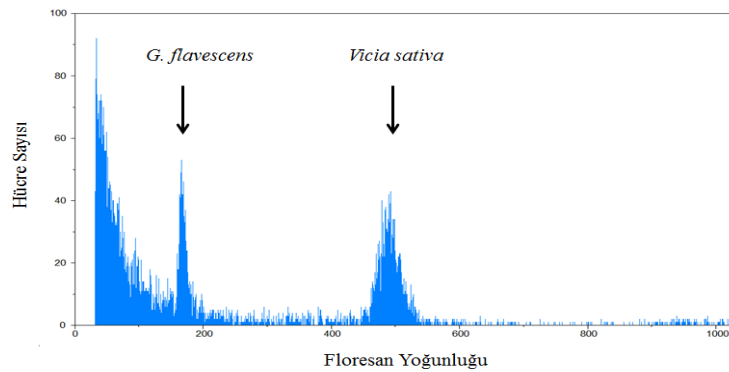
Araştırmada kullanılan üç meyan türü *Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza flavescens*, *Glycyrrhiza echinata*’da çekirdek DNA içeriklerine bakılmıştır. Çalışmada standart olarak 3.35 pg DNA içeriğine sahip olan *Vicia sativa* L. (fiğ) bitkisine bakılmıştır ve floresans yoğunluğu ile kullandığımız üç meyan türü karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.1. *G. glabra* ile *Vicia sativa* bitkisinin floresan yoğunlukları



Şekil 4.2. *G. echinata* ile *Vicia sativa* bitkisinin floresan yoğunlukları

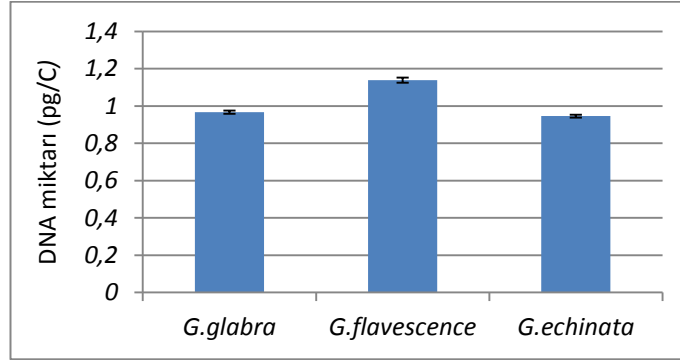


Şekil 4.3. *G. flavescens* ile *Vicia sativa* bitkisinin floresan yoğunlukları

G. glabra, *G. flavescens* ve *G. echinata* türlerinin her birinden 6 örnek toplanarak ortalama 2C çekirdek DNA içerikleri hesaplanmıştır. *G. glabra* çekirdek DNA içeriği $0,96 \pm 0,009$ pg, *G. flavescens* $1,13 \pm 0,013$ pg ve *G. echinata* $0,94 \pm 0,008$ pg olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Her 3 türden 6 bitkinin çekirdek DNA içeriğinin ortalaması

Türler	Tekerrürlere ait DNA içerikleri (pg)/C						ortalama	standart sapma	st. Hata
	1	2	3	4	5	6			
<i>G. glabra</i>	0,99	0,95	0,99	0,95	0,94	0,98	0,967	0,023	0,009
<i>G. echinata</i>	0,97	0,93	0,93	0,95	0,95	0,97	0,946	0,020	0,008
<i>G. flavescens</i>	1,19	1,09	1,13	1,14	1,15	1,13	1,138	0,033	0,013



Şekil 4.4. *G. glabra*, *G. flavescens* ve *G. echinata* türlerinin flow sitometri sonucu

G. glabra ile *G. echinata* türlerinin çekirdek DNA içeriğinin benzer büyüklükte olduğu görülmüştür ($p > 0,05$). *G. flavescens*'in çekirdek DNA içeriğinin diğer iki meyan türü genomundan önemli derecede daha büyük olduğu (yaklaşık %20 daha büyük) tespit edilmiştir ($p < 0,01$; Şekil 4.4).

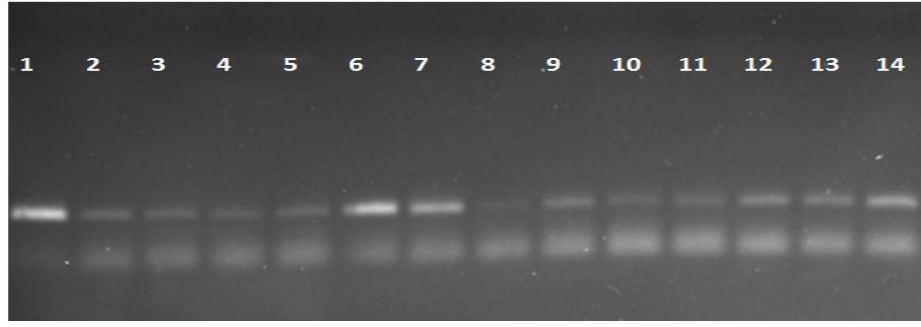
Tür içinde yer alan grupların genom büyüklüğündeki değişiklik, genetik çeşitlilik veya özel bir sürecin devamı olduğu belirtilmiştir (Price 1976; Murray 2005). Türler arasındaki genom büyüklüğünün sebebi farklı transposon element içeriği, (Fedoroff 2000; Bennetzen ve ark., 2005; Paux ve ark., 2006), çeşitli kodlanmayan DNA bölgeleri ya da genomla ilgili DNA miktarını artıran etmenler temel olarak farklılığın nedeni olduğu belirtilmiştir (Bennetzen, 2002). Ayrıca Erayman ve ark., (2014) SSR markörleri ile yaptıkları çalışmalarında meyan türleri arasındaki genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. Bu çalışmada *G. glabra* ve *G. echinata* genetik olarak *G.*

flavescens'e oranla daha yakın çıkmışlardır. Bu yönü ile yapılan bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Murray (2005) göre yeni türlerin oluşumunda çekirdek DNA içeriğinin bitki morfolojisinden daha önce farklılaştığını bu yüzden de eğer bir tür içerisinde çekirdek DNA içeriği farklılığı belirlenmişse de bunun tür içerisinde taksonomik çeşitliliğin ve yeni bir tür oluşum sürecinin varlığını gösteren belirti olabileceği açıklanmıştır. Bu yüzden çalışmamızdaki meyan türleri arasındaki çekirdek DNA bakımından *G. flavescens* türünde gözlenen büyük farklılık yeni bir türün oluşum sürecinin başlamış olduğunu göstergesi olduğunu düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan üç türün kromozom sayıları aynı olmasına rağmen şekil ve yapılarında da farklılar bulunduğu daha önceki karyotipleme çalışmasında belirlenmiştir (Çelik ve ark. 2015). Bunun yanında genom büyüklüğü açısından çalışmamızda ele alınan türler ve özellikle *G. glabra* türünün genom büyüklüğü *Medicago truncatula* genomunun (550 Mbç) yaklaşık 2 katı kadarı bulunmuştur. Bu genom büyüklüğünün özellikle yeni genom dizileme çalışmalarının hızla arttığı bir dönemde bu türün kolaylıkla genom dizilime için elverişli olduğunu göstermektedir. Meyan türlerinin genomunun dizilenmesi ve gen yapılarının belirlenmesi bu türün ürettiği birçok maddenin metabolit üretim yollarının daha iyi anlaşılmasına neden olacaktır. Meyan türüyle aynı familyadan olan türler arasında genom karşılaştırılması yapılması genetiksel farklılığın belirlenmesi açısından önemli olmaktadır. Hammatt ve ark., (1991) yapmış oldukları çalışmada meyan türüyle aynı familyada yer alan *Glycine max* (Soya) 1,175 pg, *G. soja* için 1,14 pg genom büyüklükleri bulunmuştur. Yine *Fabaceae* familyasında yer alan *Phaseolus vulgaris* (Fasulye) Arumuganathan ve ark., (1991) yapmış oldukları çalışmada 0,66 pg olarak bulunmuştur.

4.2. cDNA Analizi

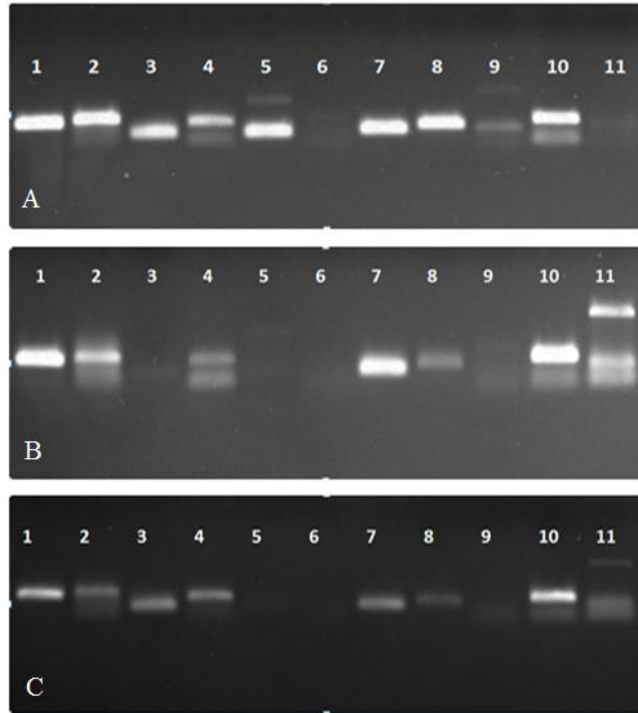
RNA izolasyonu işleminin ardından cDNA sentezi yapılmış olup kullanılan meyan türlerine ait cDNA sentezinin kontrolü referans gen (GAPDH) primeri ile PCR işlemi sonucu Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Referans gen primeri olan GAPDH ile cDNA sentezinin kontrolü. 1: SRYG-2, 2: SRYG-1, 3: KRHG-1, 4: KRHG-2, 5: ALTG-1, 6: ALTG-2, 7: SRYF-1, 8: SRYF-2, 9: ISKF-1, 10: SRYF, 11: KRHE-1, 12: KRE-2, 13: KRE-3, 14: KRE-4

4.2.1. Çalışmada Kullanılan Primerler

Primer bağlanma sıcaklığı için 68 °C'den başlayarak 50 °C'ye her döngüde 0,5 °C düşerek touchdown PCR yapılmıştır. Bu sayede primerlerin cDNA havuzunda ilgili diziye tam olarak bağlanıp bağlanmadıkları belirlenmiştir. Touchdown PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.6' da verilmiştir.



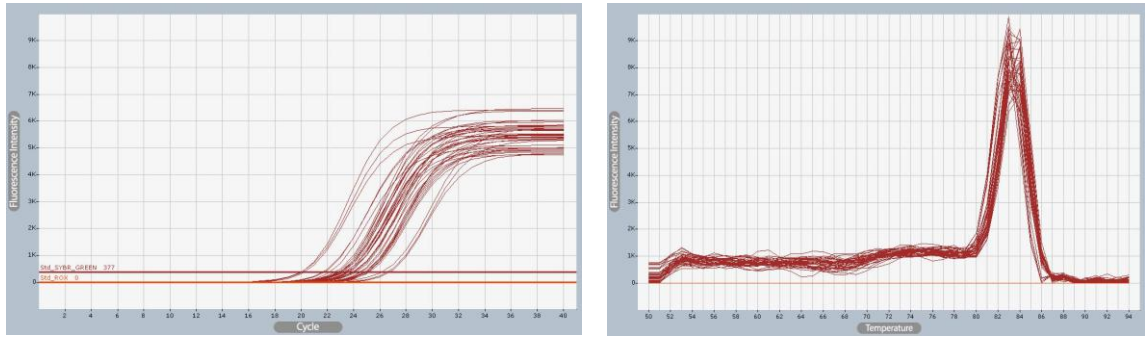
Şekil 4.6. *Glycyrrhiza* sp. ait türlerinin cDNA'ları ile yapılan touchdown PCR sonuçları. A) *G. glabra*, B) *G. flavescens*, C) *G. echinata*, 1: GAPDH, 2: UGT74, 3: HQGT, 4: CYP75B2, 5: CYP88D6, 6: UGT73B5, 7: UGT74E2, 8: UGT89, 9: CYP707A7, 10: UGT73B2, 11: CYP71D7.

Elde edilen jel görüntülerinde bazı çift bantlar elde edildiği için primerlerin bağlanma sıcaklıkları artırılmıştır. Bu sayede çift bantların oluşması engellenmiş olup herbir türde farklı primerlerin çalıştığı görülmüştür.

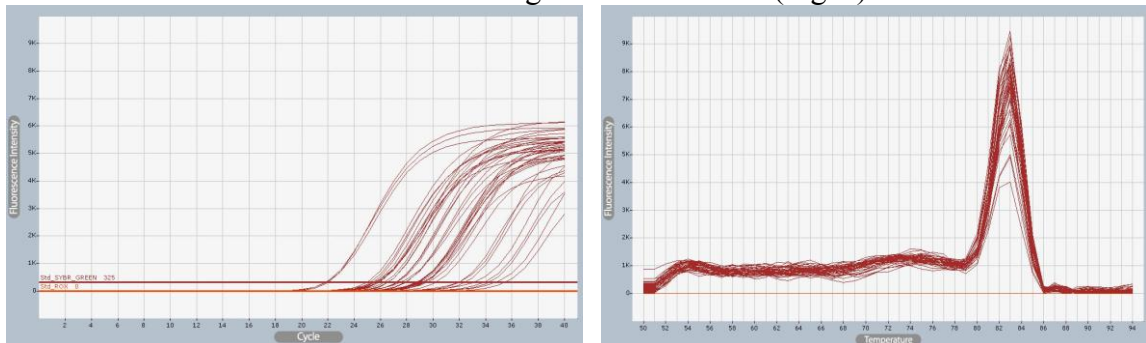
Yaptığımız çalışmada *G. uralensis*' den elde edilen UGT74, ve UGT73B5 benzeri genler, bizim çalıştığımız türlerde çalışmadığı belirlenmiştir. O yüzden bu genler çalışmadan çıkartılmıştır.

4.2.2. Gen İfade Oranlarının Tespit Edilmesi

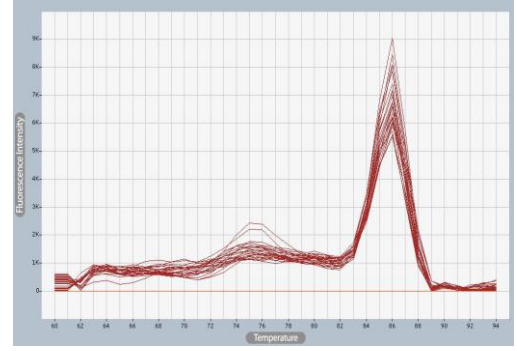
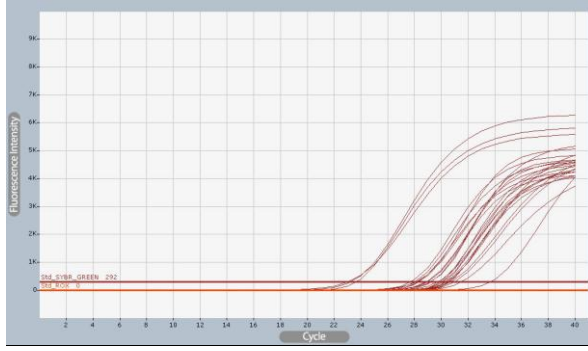
Araştırmada toplanan üç *Glycyrrhiza* türüne ait toplam 14 cDNA üzerinde glisirizin yolağında görev aldığı düşünülen 8 adet glikoziltransferaz ve sitokrom P450 genin ifade düzeylerini karşılaştırmak amacıyla qRT-PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade analizinde ifade düzeylerini karşılaştırmak için GAPDH geni kullanılarak normalizasyon sağlanmıştır. Gen ifade analizinde qRT-PCR yazılımı yardımıyla eşik değerlerini ve erime eğrisi analizini gösteren grafikler aşağıda verilmiştir.



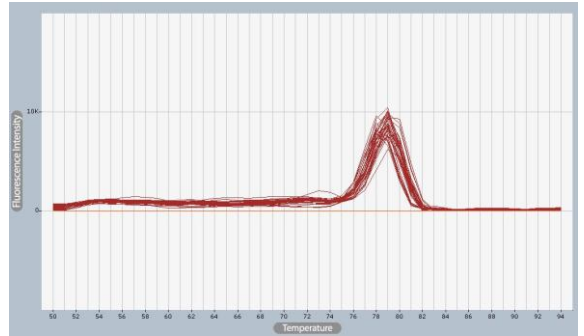
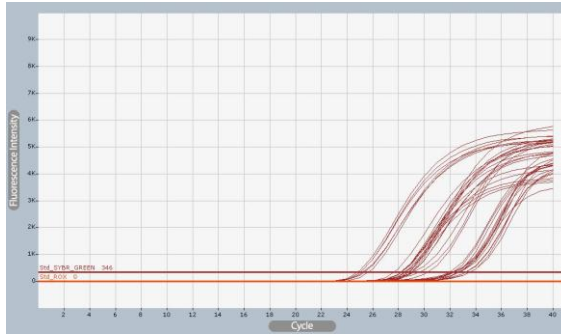
Şekil 4.7. GAPDH primerine ait meyhan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analiz sonucu (sağda)



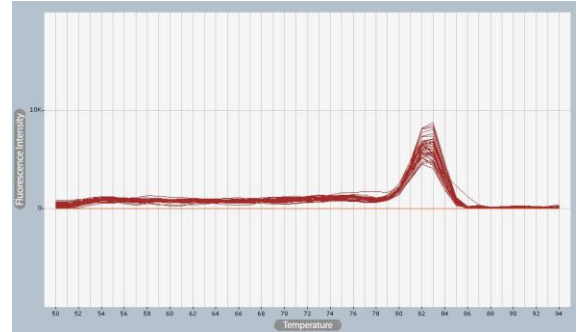
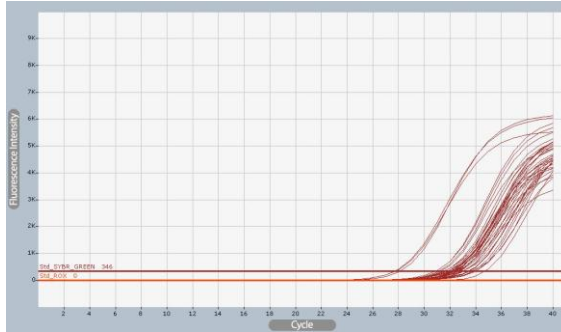
Şekil 4.8. HQGT primerinin meyhan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analiz sonucu (sağda)



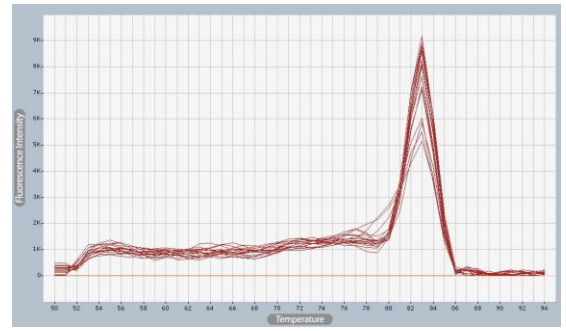
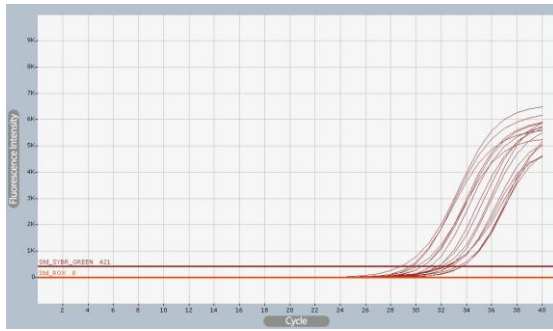
Şekil 4.9. UGT73B2 primerinin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)



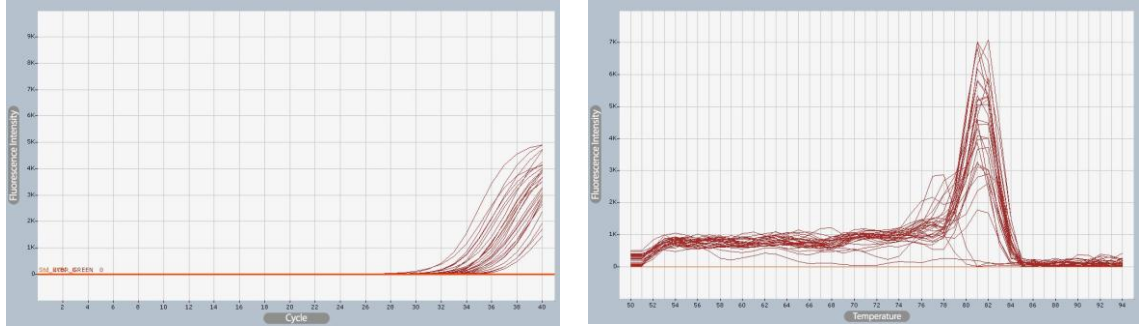
Şekil 4.10. UGT74E2 genine ait primerin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları(solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)



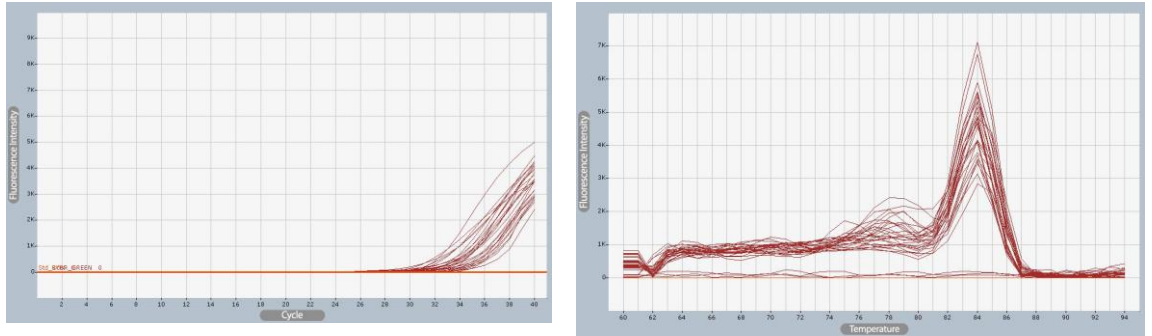
Şekil 4.11. UGT89 genine ait primerinin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)



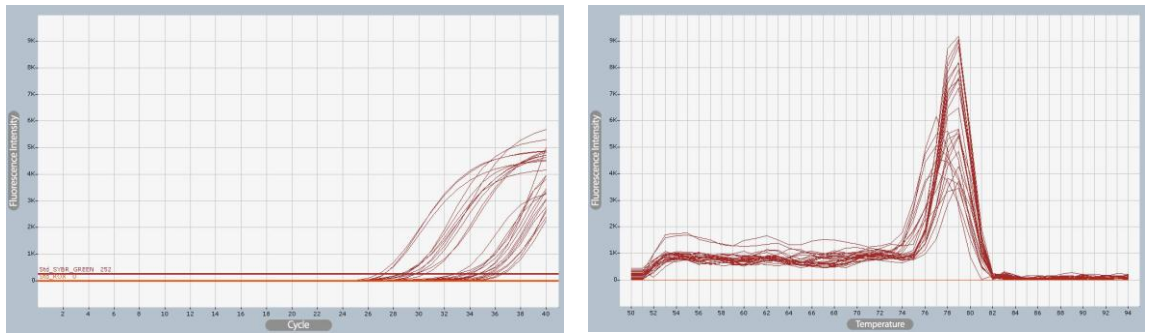
Şekil 4.12. CYP71D7 genine ait primerin meyan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)



Şekil 4.13. CYP707A7 genine ait primerin meyhan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları(solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)



Şekil 4.14. CYP75B2 genine ait primerin meyhan çeşitlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)

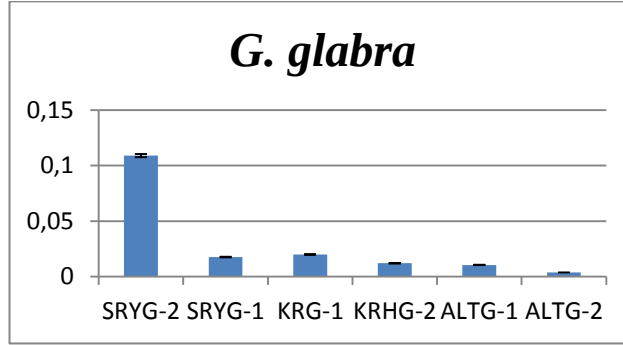


Şekil 4.15. CYP88D6 genine ait primerin meyhan türlerindeki qRT-PCR sonuçları (solda) ve erime eğrisi analizi sonucu (sağda)

4.2.3. qRT-PCR Sonuçlarına Göre Tür içi Gen İfade Düzeyleri

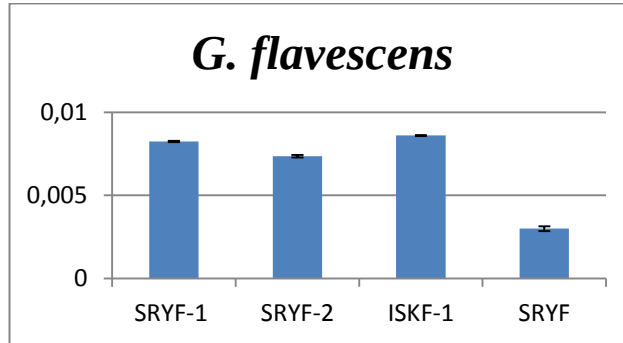
UGT73B2 geninin ifade oranı Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş ve hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.16). Serinyol ve Altınözü bölgelerinin içinde gen ifadesi önemli farklılık gösterirken, Kırıkhan bölgesi içindeki *G. glabra* türleri arasında UGT73B2 geni açısından ifade farklılığı görülmemiştir. Bunun yanında Serinyol ve Kırıkhan bölgeleri arasında önemli fark görülmezken bu iki

bölgedeki *G. glabra* türlerinde UGT73B2 gen ifadesi Altınözü'ndekinden önemli derecede fazla olmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.16).



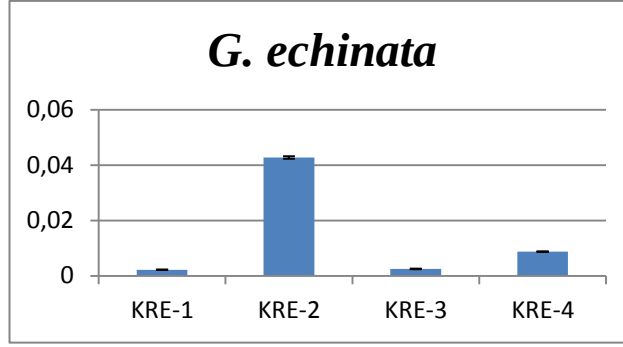
Şekil 4.16. UGT73B2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması. Göreceli gen ifadeleri GAPDH geni ile karşılaştırmalı olarak alınmıştır.

UGT73B2 geninin ifade oranı Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavescens* türü incelemiş ve hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.17).



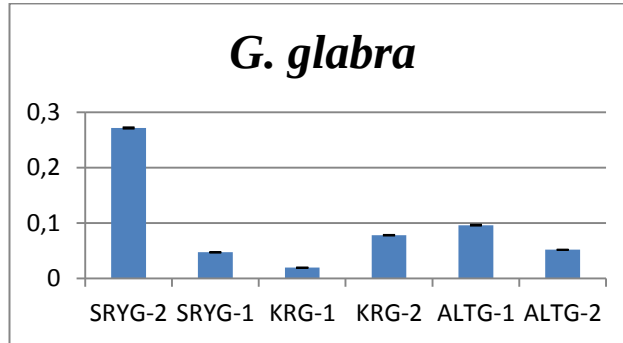
Şekil 4.17. UGT73B2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.

UGT73B2 geninin ifade oranı Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde UGT73B2 geni açısından ifade farklılıkları bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.18).



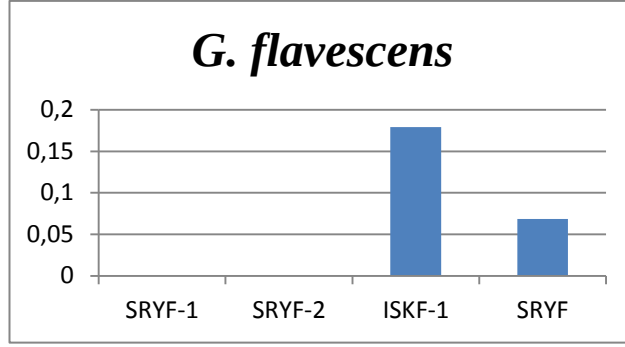
Şekil 4.18. UGT73B2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması.

HQGT geninin ifade oranı Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş ve bölge içinde önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.19). Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgeleri arasında gen ifadesi önemli farklılık göstermezken Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgeleri içinde *G. glabra* türleri arasında HQGT geni açısından önemli derecede ifade farklılığı bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.19).



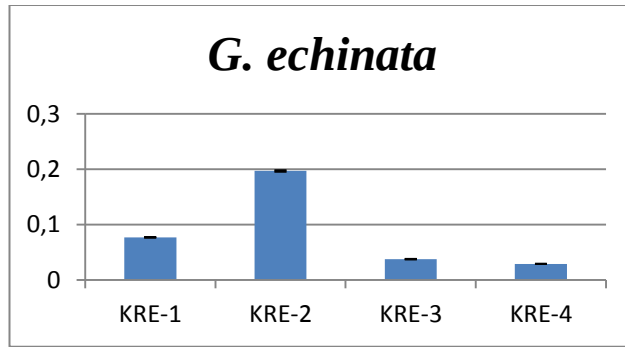
Şekil 4.19. HQGT geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

HQGT geninin ifade oranı Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavescens* türü türünde incelenmiş ve hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.20). Serinyol bölgesi içindeki *G. flavescens* türleri arasında HQGT geni açısından ifade farklılığı görülmemiştir. İskenderun bölgesi içindeki *G. flavescens* türleri arasında HQGT geni açısından önemli derecede ifade farklılığı bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.20). Bunun yanında Serinyol ve İskenderun bölgeleri arasında önemli derecede gen ifade farklılığı belirlenmiş olup HQGT gen ifadesi Serinyol bölgesinde önemli derecede fazla olmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.20).



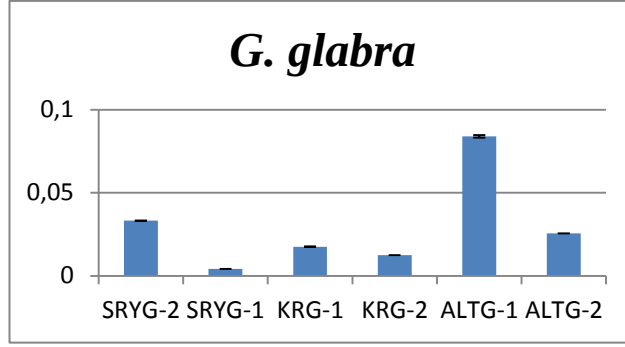
Şekil 4.20. HQGT geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

HQGT gen ifade oranı Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde HQGT geni açısından ifade farklılıkları bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.21). KRE-1 ve KRE-2 bölge içinde gen ifadesi önemli farklılık göstermiştir. ($p<0.05$; Şekil 4.21).



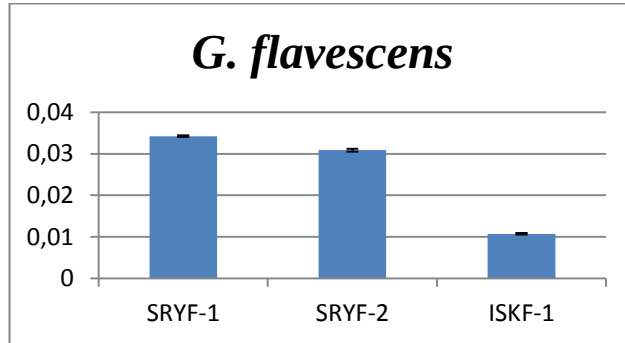
Şekil 4.21. HQGT geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

G. glabra türündeki gen ifade oranı Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.22). Serinyol ve Altınözü bölgeleri içindeki *G. glabra* türleri arasında UGT73B2 geni açısından ifade farklılığı göstermiştir ($p<0.05$; Şekil 4.22). Kırıkhan bölgesi içinde *G. glabra* türleri arasında UGT73B2 geni açısından ifade farklılığı bulunmamıştır. Altınözü ve Kırıkhan bölgeleri arasında önemli fark görülürken, Altınözü bölgesindeki UGT73B2 gen ifadesinde Kırıkhan bölgesinden önemli derecede fark gösterdiği bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.22). Altınözü ve Serinyol bölgeleri arasında önemli derecede fark görülürken, Altınözü bölgesindeki UGT73B2 gen ifadesinde Serinyol bölgesinden önemli derecede fark gösterdiği bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.22).



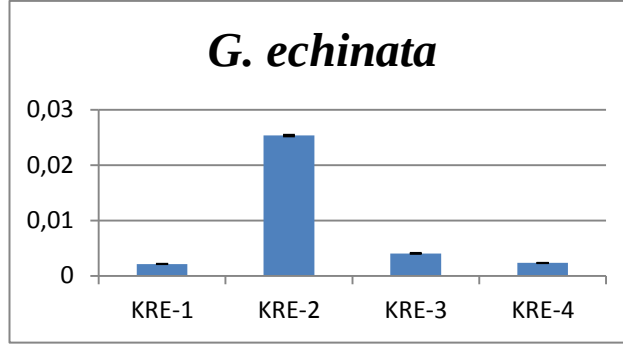
Şekil 4.22. UGT74E2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

UGT74E2 geninin ifade oranı için Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavescens* türünde incelenmiş ve bölgeler içinde önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.23). İskenderun bölgesi içinde *G. flavescens* türleri arasında UGT74E2 geni açısından ifade farklılığı görülmüştür ($p < 0.05$; Şekil 4.23). Serinyol ve İskenderun bölgeleri arasında UGT74E2 geni açısından ifade farklılığı belirlenmemiştir ($p > 0.05$; Şekil 4.23).



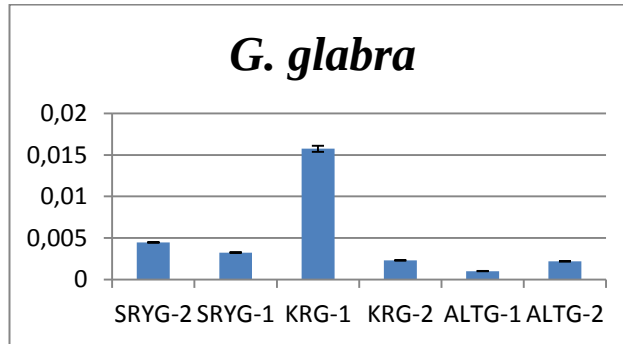
Şekil 4.23. UGT74E2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması. Göreceli gen ifadeleri GAPDH geni ile karşılaştırmalı olarak alınmıştır.

UGT74E2 geninin ifade oranı için Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde UGT74E2 geni açısından ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.24). KRE-1 ve KRE-2 bölge içinde UGT74E2 geni açısından önemli derecede ifade farklılığı bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.24).



Şekil 4.24. UGT74E2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması. Göreceli gen ifadeleri GAPDH geni ile karşılaştırmalı olarak alınmıştır.

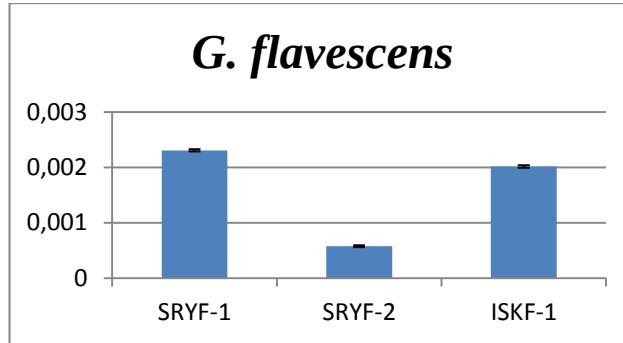
UGT89 gen ifade oranı için Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş hem bölge içi hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.25). Altınözü bölgesi içindeki *G. glabra* türleri arasında UGT89 geni açısından önemli derecede ifade farklılığı görülmüştür ($p < 0.05$; Şekil 4.25). Serinyol ve Altınözü bölgelerinin içinde gen ifadesi önemli derecede farklılık belirlenmemiştir. Serinyol ve Kırıkhan bölgeleri arasında UGT89 gen ifade önemi önemli derecede farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.25). Serinyol ve Altınözü bölgeleri arasında UGT89 gen ifade önemi önemli derecede farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.25) ve Serinyol bölgesindeki UGT89 gen ifadesi Altınözü bölgesinden önemli derecede farklılık göstermiştir ($p < 0.05$; Şekil 4.25). Bunun yanında Kırıkhan ve Altınözü bölgeleri arasında önemli fark görülmemiştir. ($p > 0.05$; Şekil 4.25).



Şekil 4.25. UGT89 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

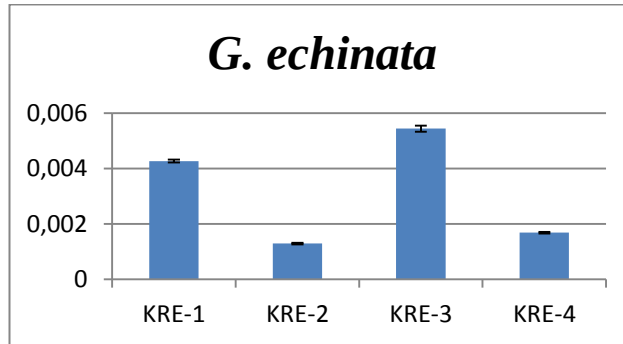
UGT89 gen ifade oranı için Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavesens* türünde incelenmiş ve bölge içinde önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.26). Serinyol bölgesi içinde *G. flavesens* türleri arasında UGT73B2

geni açısından ifade farklılığı göstermiştir ($p<0.05$; Şekil 4.26). Serinyol ve İskenderun bölgeleri arasında gen ifade farklılığı bulunmamıştır. ($p>0.05$; Şekil 4.26).



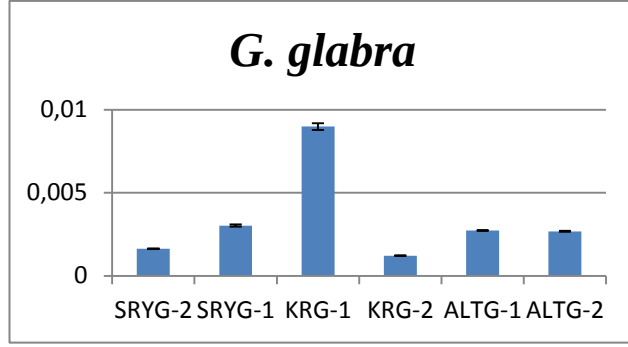
Şekil 4.26. UGT89 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

UGT89 geninin ifade oranı için Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde UGT89 geni açısından ifade farklılıkları bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.27). Ayrıca Kırıkhan bölgesi içindeki KRE-1 ve KRE-2 bölge içinde UGT89 geni açısından önemli derecede ifade farklılığı bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.27)



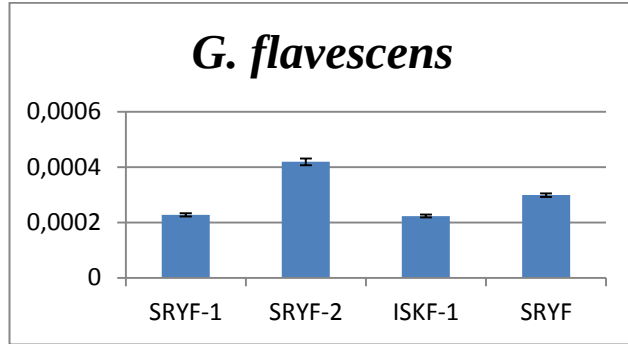
Şekil 4.27. UGT89 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP71D7 geninin ifade oranı için Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.28).



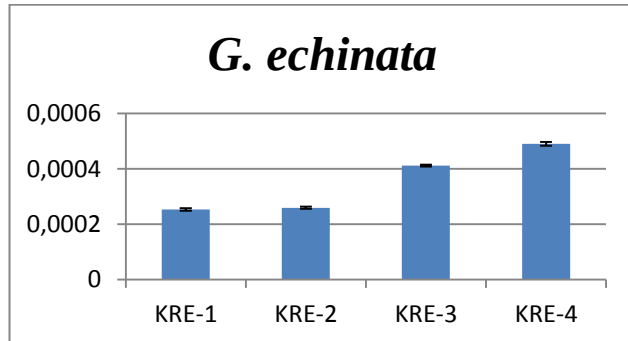
Şekil 4.28. CYP71D7 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP71D7 geninin ifade oranı için Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavescens* türünde incelenmiş hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmamıştır. ($p>0.05$; Şekil 4.29).



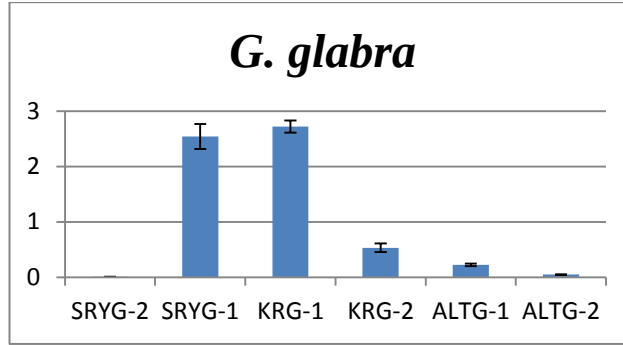
Şekil 4.29. CYP71D7 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP71D7 geninin ifade oranı için Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde CYP71D7 geni açısından ifade farklılıkları bulunmamıştır ($p>0.05$, Şekil 4.30).



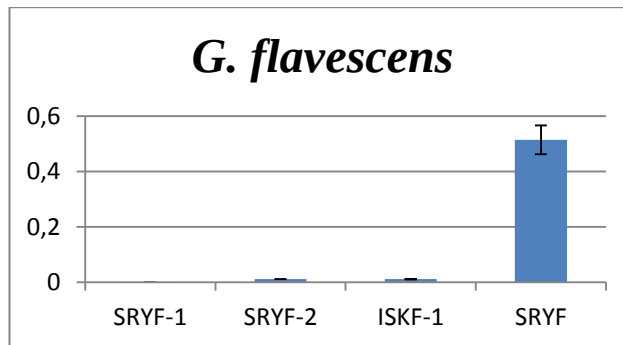
Şekil 4.30. CYP71D7 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP75B2 geninin ifade oranı Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmamıştır ($p>0.05$ Şekil 4.31).



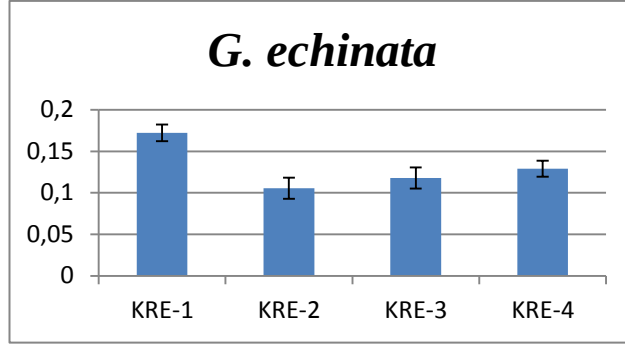
Şekil 4.31. CYP75B2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP75B2 geninin ifade oranı Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavescens* türünde incelenmiş ve bölge içinde önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4. 32). Serinyol bölgesi içindeki *G. flavescens* türleri arasında CYP75B2 geni açısından önemli derecede ifade farklılığı görülmüş olup, ($p<0.05$; Şekil 4.32) İskenderun bölgesi içindeki *G. flavescens* türleri arasında CYP75B2 geni açısından önemli derecede fark belirlenmemiştir. Serinyol ve İskenderun bölgeleri arasında gen ifade oranında önemli derecede fark bulunmamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.32).



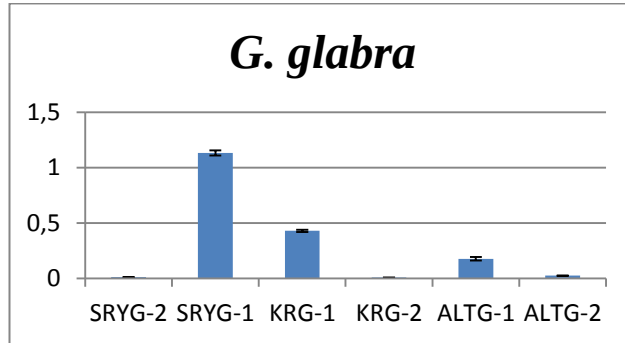
Şekil 4.32. CYP75B2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP75B2 geninin ifade oranı. Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde CYP75B2 geni açısından ifade farklılıkları bulunmamıştır ($p<0.05$; Şekil 4.33).



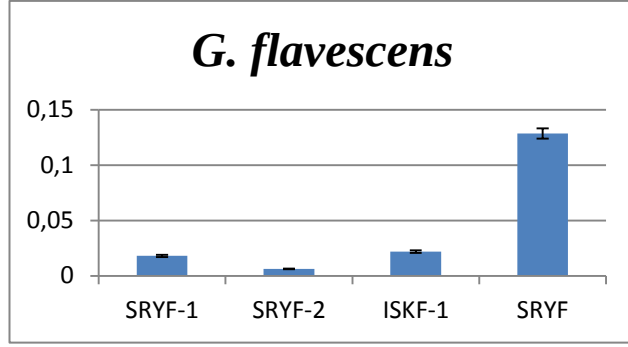
Şekil 4.33. CYP75B2 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP707A7 geninin ifade oranı Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş ve bölge içinde önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.34). Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinin içinde gen ifadesi önemli farklılık göstermezken, Serinyol bölgesi içindeki *G. glabra* türleri arasında CYP707A7 geni açısından önemli derecede ifade farklılığı görülmüştür ($p < 0.05$; Şekil 4.34).



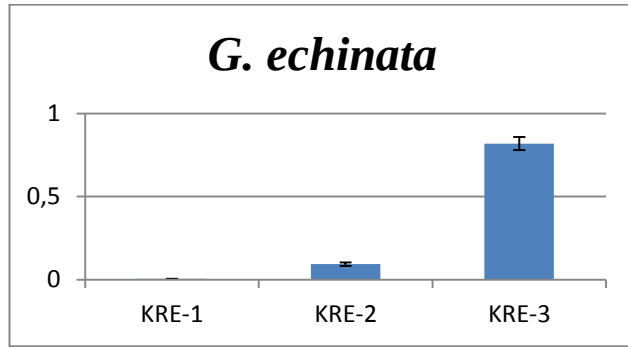
Şekil 4.34. CYP707A7 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP707A7 geninin ifade oranı Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavescens* türünde incelenmiş hem bölge içinde hem de bölgeler arasında önemli gen ifade farklılıkları bulunmamıştır ($p > 0.05$; Şekil 4.35).



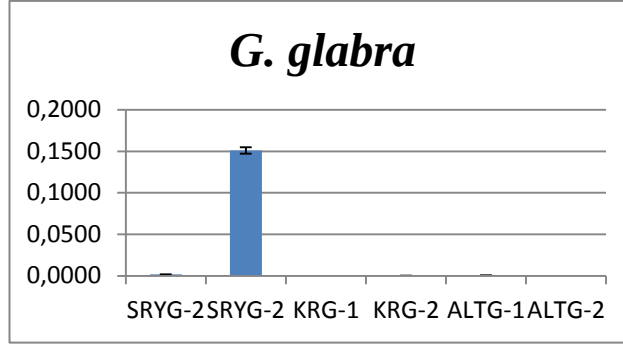
Şekil 4.35. CYP707A7 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP707A7 geninin ifade oranı için Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde CYP707A7 geni açısından ifade farklılıkları bulunmamıştır ($p>0.05$; Şekil 4.36).



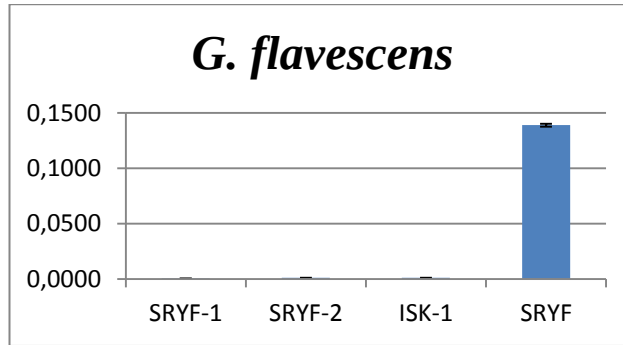
Şekil 4.36. CYP707A7 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP88D6 geninin ifade oranı Serinyol, Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinden toplanan *G. glabra* türünde incelenmiş ve bölge içinde önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.37). Kırıkhan ve Altınözü bölgelerinin içinde gen ifadesi önemli farklılık göstermezken, Serinyol bölgesi içindeki *G. glabra* türleri arasında CYP88D6 geni açısından önemli derecede ifade farklılığı bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.37).



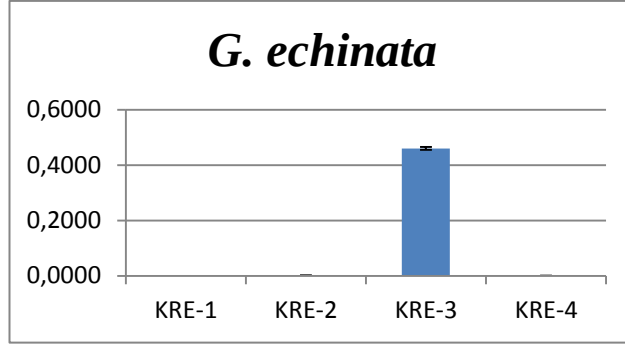
Şekil 4.37. CYP88D6 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. glabra* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

CYP88D6 geninin ifade oranı Serinyol ve İskenderun bölgelerinden toplanan *G. flavescens* türünde incelenmiş ve bölge içinde önemli gen ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.38). İskenderun bölgesi içinde gen ifadesi önemli farklılık gösterirken ($p < 0.05$; Şekil 4.38), Serinyol bölgesi içindeki *G. flavescens* türleri arasında UGT73B2 geni açısından ifade farklılığı görülmemiştir. ($p > 0.05$; Şekil 4.38).



Şekil 4.38. CYP88D6 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. flavescens* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

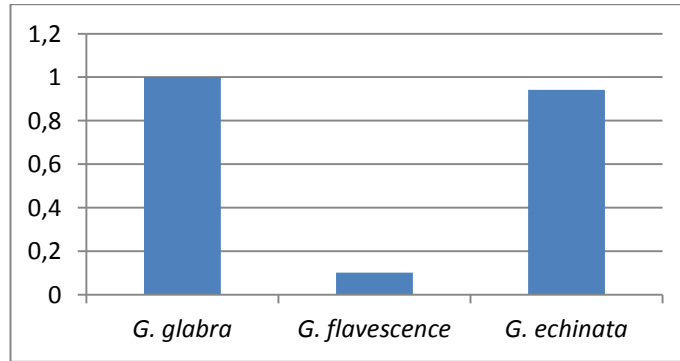
CYP88D6 geninin ifade oranı Kırıkhan bölgesinden toplanan *G. echinata* türünde incelenmiş ve bölge içinde CYP88D6 geni açısından ifade farklılıkları bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.39). KRE-3 ve KRE-4 bölge içinde CYP88D6 geni açısından önemli derecede ifade farklılığı bulunmuştur ($p < 0.05$; Şekil 4.39).



Şekil 4.39. CYP88D6 geninin farklı bölgelerden toplanan *G. echinata* türündeki gen ifade oranlarının karşılaştırılması

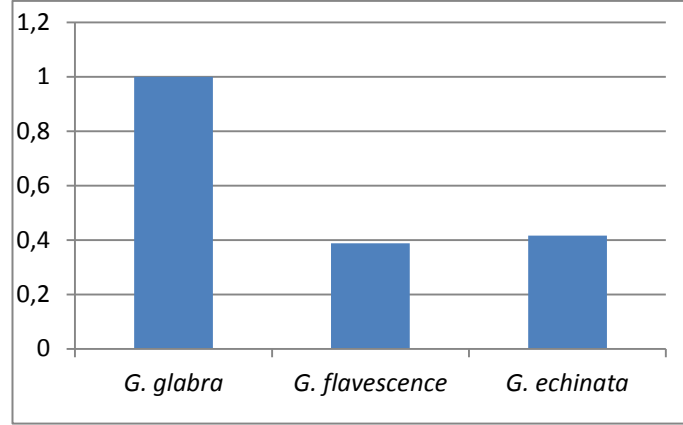
4.2.4. qT-PCR Sonuçlarına Göre Türler Arası Gen ifade Düzeyi

G. glabra, *G. flavescens* ve *G. echinata* türleri arasında, HQGT gen ifadesi incelendiğinde; gen ifadesinin *G. glabra* ve *G. echinata*'da *G. flavescens*'e oranla 9 kattan fazla olduğu tespit edilmiştir. *G. glabra*'da ilgili genin ifade oranı *G. echinata*'ya oranla 1,1 kat fazla olmuştur (Şekil 4.40).



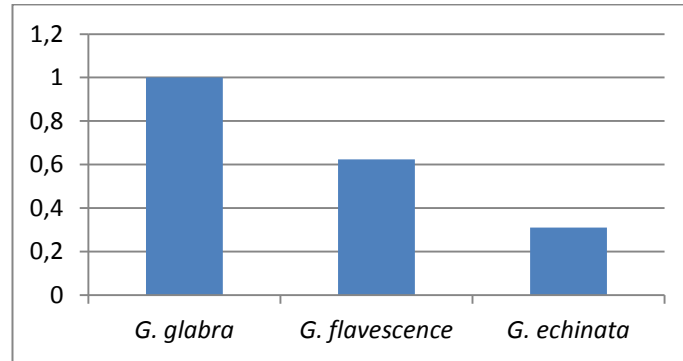
Şekil 4.40. HQGT geninin türler arası gen ifade oranı

G. glabra, *G. flavescens* ve *G. echinata* türleri arasında UGT73B2 gen ifadesi incelendiğinde; gen ifadesinin *G. glabra* ve *G. flavescens*'e oranla 2,6 kat oranla daha fazla olduğu ve *G. glabra*'da, *G. echinata* türüne oranla 2,4 kat daha fazla gen ifadesi olduğu tespit edilmiştir. *G. echinata*'da, *G. flavescens* türüne oranla 9 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur (Şekil 4.41).



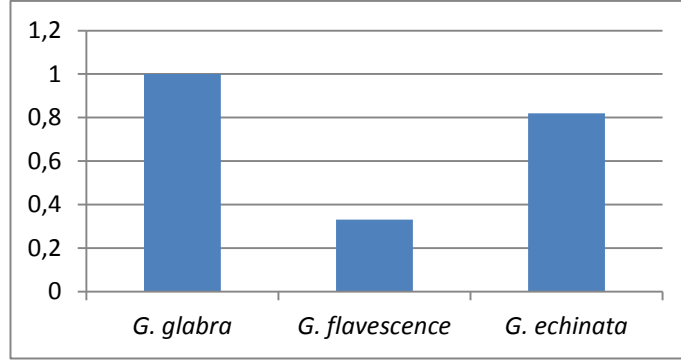
Şekil 4.41. UGT73B2 geninin türler arası ifade oranı

G. glabra, *G. flavesces* ve *G. echinata* türleri arasında UGT74E2 gen ekspresyon ifadesi incelendiğinde; *G. glabra*'da, *G. flavesce*s türüne oranla 1,7 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur. *G. glabra*'da, *G. echinata* türüne oranla 3.2 kat daha fazla gen ifadesi olmuş olup, *G. echinata*'da, *G. flavesce*s türüne oranla 1,5 kat daha fazla gen ifadesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.42).



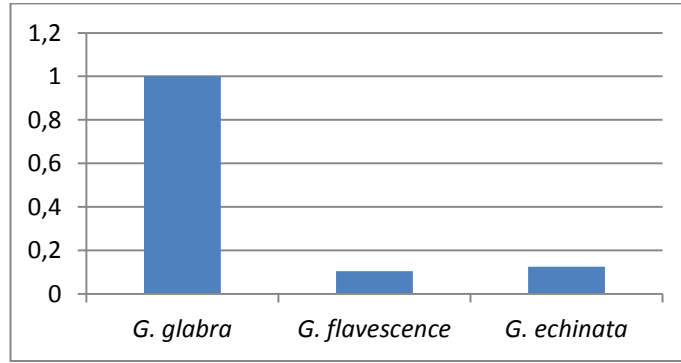
Şekil 4.42. UGT74E2 geninin türler arası gen ifade oranı

G. glabra, *G. flavesces* ve *G. echinata* türleri arasında UGT89 gen ifadesi incelendiğinde; *G. glabra*'da, *G. flavesce*s türüne oranla 3,1 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur. *G. glabra*'da, *G. echinata* türüne oranla 1,2 kat daha fazla gen ifadesi olmuş olup *G. echinata*'da, *G. flavesce*s türüne oranla 1,8 kat daha fazla gen ifadesi oranı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.43).



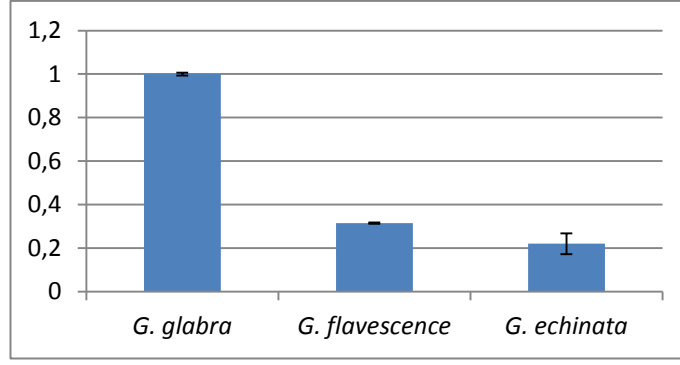
Şekil 4.43. UGT89 geninin türler arası gen ifade oranı

G. glabra, *G. flavescens* ve *G. echinata* türleri arasında CYP71D7 gen ifadesi incelendiğinde; *G. glabra*'da, *G. flavescens* türüne oranla 9,6 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur. *G. glabra*'da, *G. echinata* türüne oranla 8 kat daha fazla gen ifadesi olmuş olup, *G. echinata*'da, *G. flavescens* türüne oranla 1,6 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur (Şekil 44).



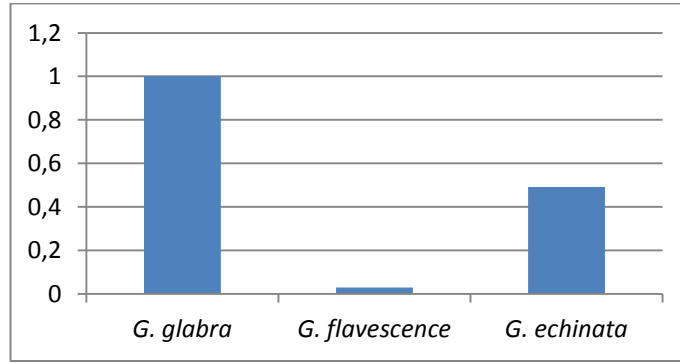
Şekil 4.44. CYP71D7 geninin türler arası gen ifade oranı

G. glabra, *G. flavescens* ve *G. echinata* türleri arasında CYP707A7 gen ifadesi incelendiğinde; *G. glabra*'da, *G. flavescens* türüne oranla 3,2 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur. *G. glabra*'da, *G. echinata* türüne oranla 4,5 kat daha fazla gen ifadesi olup, *G. echinata*'da, *G. flavescens* türüne oranla 1,4 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur (Şekil 4.45).



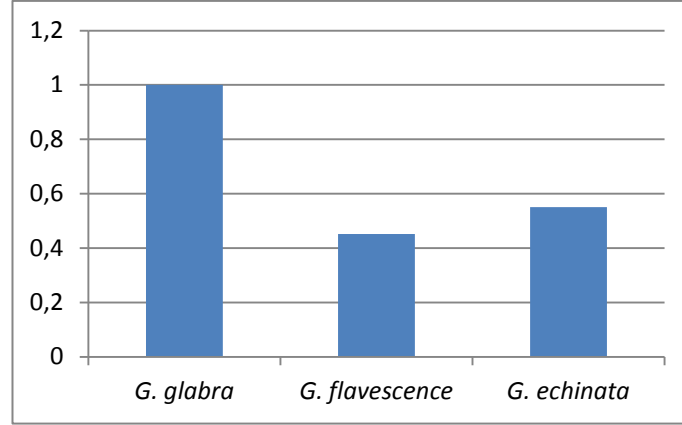
Şekil 4.45. CYP707A7 geninin türler arası gen ifade oranı

G. glabra, *G. flavescens* ve *G. echinata* türleri arasında CYP75B2 gen ifadesi incelendiğinde; *G. glabra*'da, *G. flavescens* türüne oranla 34 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur. *G. glabra*'da, *G. echinata* türüne oranla 2 kat daha fazla gen ifadesi olup, *G. echinata*'da, *G. flavescens* türüne oranla 17 kat daha fazla gen ifade oranı bulunmuştur (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. CYP75B2 geninin türler arası gen ifade oranı

G. glabra, *G. flavescens* ve *G. echinata* türleri arasında CYP88D6 gen ifadesi incelendiğinde; *G. glabra*'da, *G. flavescens* türüne oranla 2,2 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur. *G. glabra*'da, *G. echinata* türüne oranla 1,8 kat daha fazla gen ifadesi olmuş olup, *G. echinata*'da, *G. flavescens* türüne oranla 0,4 kat daha fazla gen ifadesi olmuştur (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. CYP88D6 geninin türler arası gen ifade oranı

Çalışmamızda glisirizin maddesinin oluşmasında etkili olan aday genler hem tür içinde hem de türler arasında genlerin ifade düzeyine bakılmıştır. Gen ifadesi bakımından tür içi ve türler arasında büyük varyasyonlar gözlenmiştir. Lu H-Y ve ark., (2008) glisirizin maddesinin meydana gelmesinin çok karmaşık bir olay olduğunu bildirilmiştir. Yine Liu ve ark. (2014) gen kopya sayılarının bile glisirizik asit yolağındaki gen ifadelerinde varyasyona neden olduğunu belirlemişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada da çok fazla varyasyonların gözlenmesi de bu tür etkilerden kaynaklanabilir. Çalışmada kullanmış olduğumuz UGT89, HQT, UGT74E2, CYP707A7, CYP71D7, CYP88D6, CYP75B2 ve UGT73B2 genleri hem tür içinde hem de türler arasında gen ifade farklılıkları görülmüştür. Türler arası gen ifade karşılaştırılmasına bakıldığında diğer türlere oranla *G. glabra* türünde daha fazla ifade olmuştur.

Glisirizin maddesinin oluşması yapmış olduğumuz çalışmada birçok farklı koşuldan etkilendiğini göstermektedir. Hatay'ın coğrafik yapısına bağlı olarak bitki örnekleri arasında fazla uzaklık bulunmamasına özellikle iklim ve çevre koşullarının çok büyük değişiklik göstermemesine rağmen çalışmamızdaki örnekler arasında bu denli gen ifade varyasyonlarının bulunması bitkilerin yaşı, toprak yapısı, türler arası ve tür içi genetik çeşitliliğin de etkisini göstermektedir. Karahan (2013) yapmış olduğu çalışmada farklı ekolojik koşullarda yetişen *G. glabra*, *G. echinata* ve *G. flavescence* türleri arasında SSR belirteçleri kullanılarak hem tür içinde hemde türler arasında genetik çeşitlilik ortaya konulmuştur.

Yamazaki ve ark., (1994) yapmış oldukları çalışmada RAPD ve RFLP analizleriyle glisirizin bakımından zengin olan *G. glabra* ve *G. uralensis* türlerinin *G.*

echinata ve *G. pallidiflora* türlerine genetik açısından yakın türler olduğu tespit edilmiştir. Kenji ve ark., (2007) yapmış oldukları çalışmada yapmış olduğumuz çalışmaya destekler niteliktedir. *G. glabra*, *G. inflata* ve *G. uralensis* meyan türlerinde glisirizin miktarları bakımından karşılaştırma yapılmıştır *G. glabra* türünün *G. inflata* ve *G. uralensis* türüne oranla daha fazla glisirizin bulunduğu belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada da tür içinde ve türler arasında glisirizin oluşmasından sorumlu genlerin *G. glabra* türünde daha fazla ifade olması dolayısıyla glisirizin maddesinin *G. glabra* türünde daha fazla olduğunu desteklemiştir.

Çalışmamız sadece gen ifadelerini inceleme amacıyla yapıldığından bitkilerin glisirizin oranlarına bakılmamıştır. Bu nedenle gen ifadelerinin glisirizin ve benzeri sekonder metabolitlerin oluşumuyla ilgilendirilmesi ilgili metabolit yollarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Konu ile ilgili olarak yapılan literatür taramalarında meyan türüne ait çekirdek DNA içeriği ile ilgili daha önce yapılmış tek bir çalışmaya rastlanmamış olup farklı coğrafik bölgelerden toplamış olduğumuz meyan türlerinde glisirizin içeriği tür içinde ve türler arasında coğrafik ya da genetik olarak farklılık olup olmadığı araştırılmıştır.

Flow sitometri analizi sonucunda *G. glabra*, *G. flavescens* ve *G. echinata* türlerine ait 6 tekerrürlü tekrar yapıp ortalama değerlerine bakılarak çekirdek DNA içerikleri karşılaştırılmıştır. Meyan bitkisi sekonder metabolitleri fazla olan bir bitki olduğu için, flow sitometri analizlerinde DNA'ya çok sayıda molekül bağlanması ile analiz sonucunda kirlilik oranı çok fazla çıkmıştır. Bu nedenle çalışmada kullanmış olan protokolde küçük değişiklikler yapılarak çekirdek DNA içeriğine bakılmadan önce kısa bir süreliğine santrifüj yapılarak çekirdek DNA içeriği ölçümü yapılmıştır. Santrifüj yapılmasındaki amaç nükleousların dibe çökmesini sağlanmaktır. Santrifüj yapıldıktan sonra analizlerin yapılması ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca santrifüj yapılarak test edilen ilk flow sitometri analizi olması büyük bir önem taşımaktadır.

G. glabra türünün çekirdek DNA içeriği 0.96 pg, *G. echinata* 0.95 pg ve *G. flavescens* türünün çekirdek DNA içeriği 1.13 pg olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *G. flavescens* türünün çekirdek DNA içeriği diğer türlere göre daha büyük olması (1.13 pg) diğer türlerden farklı olduğunu göstermiştir. Yine *G. glabra* ve *G. echinata* türlerinin her biri için analiz edilen 6 bitkide çekirdek DNA içeriklerinin standart sapma (0,023 ve 0,020) ile birbirine yakın türler olduğu belirlenmiştir. Benzer durum *Pisum* (Bezelye) türleri arasında genom büyüklüğü bakımından önemli derecede polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir. *Pisum* türünün retroelementlerden dolayı genom büyüklüğü artmış olduğu belirlenmiştir. *Pisum* türlerinde insersiyon parçalarının bölgede sabit kalmayıp polimorfizimle ilişkili olduğu açıklanmıştır (Vershinin ve ark., 2003).

Meyan türlerinin çekirdek DNA içeriğinin belirlenmesi ile retrotranspozon sınıfının aktiviteleri dâhil (Bennetzen ve Kellogg 1997) delesyon ile genomun azalması ya da ve insersiyon tarafından genomun artması (Petrov 1997; Gregory 2003; Bennetzen ve ark., 2005) genom büyüklüğünün farklılığından sorumlu çeşitli mekanizmalar hakkında ipucu elde edilmesini sağlayacaktır. İleriki çalışmalarda *G. flavescens* türünün genomunun *G. glabra* ve *G. echinata* türlerine oranla daha büyük

olmasına neden olan etmenlerin incelenmesi için çalışmamız öncül olmaktadır. Çetin ve ark. (2015) son çalışmasında üç türe ait kromozom sayılarının eşit olduğu (2n=16) fakat *G. echinata* türünün toplam kromozom uzunluğunun diğer iki türden fazla olduğu bulunmuştur. Meyan bitkisiyle ilgili araştırılmak istenen genlerin bulunduğu kromozomlarının tek tek ayrı ayrı haritalanması ile gen izolasyonu ve bitki genetiğinin daha iyi anlaşılması için kromozomlarının karakterize edilmesi önemli olmaktadır.

Türler arasında çekirdek DNA içeriği bakımından farklılık belirlenmesi son derece önemlidir. Hatta angiospermiler arasındaki farklılık yaklaşık olarak 2000 kat olduğu bildirilmektedir (Bennett ve Smith, 1976). Bu nedenle çekirdek DNA içeriği taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlı olduğu bildirilmiştir (Rees ve Walters, 1965; Price ve Bachmann 1975; Ohri, 1998; Özkan ve ark., 2003).

Çalışmamızın ikinci kısmında ise *G. glabra*, *G. flavescens* ve *G. echinata* türleri arasında glisirizin üretiminde rol oynayan genler yönünden bir karşılaştırma yapılmıştır. CYP88D6 geni β -amyrin oluşmasında etkili olup, dolaylı yoldan β -amyrin de glisirizin biyosentezinde rol oynamaktadır. CYP88D6, 11-oxo- β -amyrin katalizleyerek glisirizin biyosentezinde rol oynayan β -amyrin maddesinin oluşmasını sağlamaktadır. (Seki ve ark., 2008). Çalışmada genlerin seçildiği sitokrom P450 ve glikoziltransferaz süper aileleri CYP88D6 enzimine bağlı olup dolayısıyla seçilen genlerde glisirizin maddesinin oluşmasında etkili olmaktadır.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz glisirizin biyosentezindeki genler seleksiyon markörü olarak kullanılabilir. Üzerinde çalıştığımız P450 gen ailesine ait CYP88D6, CYP75B2, CYP71D7 ve CYP707A7 ve glikoziltransferaz gen ailesine ait olan UGT73B2, HQT, UGT74E2, UGT73B5 ve UGT89 genleri meyan bitkisinde glisirizin ve sekonder metabolitlerin üretim açısından potansiyel öneme sahip olabilir.

G. uralensis köklerinde ifade olan ve çalışmamızda kullanılan primerlerden UGT73B5 geni hariç tamamı bant üretmiş, UGT74E2 ise çok sayıda band verdiği için real-time PCR analizi yapılmamıştır. Bu da göstermektedir ki primer bölgelerindeki diziler muhtemelen türlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızdaki türlerin gen dizi bilgileri bu türlerin dizilemesi sonucu daha doğru açığa çıkabilecektir.

Türler arası t testi yardımıyla gen ifadeleri arasında önemli varyasyonlar tespit edilmiştir. Yapılan qRT-PCR analizlerine göre türler arasında *G. glabra* türü diğerlerine göre daha fazla gen ifadesi olup, glisirizin maddesinin diğer türlere göre daha fazla olduğu görülmüştür. Çalışmada *G. glabra* türü türler arası değerlendirme de farklı coğrafik bölgelerin glisirizin maddesinin oluşmasında etkili olduğu değerlendirilmiştir.

Ülkemizde ekonomik olarak büyük öneme sahip olan meyan türlerinin yetiştirme ortamı farklı çevresel ortamlarda olması türler arasında gen ifade düzeyinde önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Tür içinde ve türler arasındaki gen ifadesi çevresel etmenlerin etkili olduğunu göstermektedir. Toprak yapısı, toprak ph, yükselti miktarı, yeryüzü şekilleri, güneş alma miktarı gibi ekolojik faktörlerin gen miktarının düzeyini etkilediği düşünülmektedir. Daha sonraki yapılacak olan çalışmalarda bu çevresel faktörlerin araştırılması glisirizin genine etkisinin belirlenmesi bizi daha çok aydınlatacaktır.

Çalışmamızda hem tür hem de çevre şartlarına göre glisirizin yolağındaki genlerin ifadelerinde önemli değişimler görülmüştür. Bu da çevre şartları ve genotiplerde yapılacak modifikasyon veya değişikliklerle meyan bitkisinden daha fazla glisirizin elde etme potansiyelini göstermektedir.

Glisirizin kimyasal sentezi hem maliyetli hem de zor bir süreçtir. Bu nedenle meyan bitkisinin kök kültürü, bitki doku kültürü ve hücre kültürü alınmak istenmiştir. Fakat istenilen başarı elde edilememiştir (Hayaski ve ark., 1988). İleriki çalışmalarda meyan kökünün geliştirilmesi glisirizin üretiminde artış sağlanabilir. Bu sayede glisirizin yolağının tam olarak anlaşılması yolak da bulunan genlerin daha iyi araştırılması imkânı elde edilecektir. Böylelikle sekonder metabolit üretimi yollarının iyi öğrenilmesi biyoteknolojik yollarla bu maddeler daha kolay üretilebilmesi sağlanacak ve doğa tahribatının önüne geçilebilecektir.

Meyan türlerinin hem tıbbi hem de ekonomik özelliğinden dolayı yoğun toplanması bazı türlerin doğal yayılış alanlarından uzaklaşması ya da yaşam alanlarının daralmasından dolayı yayılış alanları tehlikeye girmektedir. Bu yüzden tohumlarının toplanarak tohum bankasında muhafaza edilmesi gerekir. Aynı zamanda genetik varyasyonların hesaplanması için türün devamlılığını koruması önemlidir.

Çalışmamızın sonuçları meyan bitkisinin genomunun tür içi ve türler arası yapısal ve fonksiyonel varyasyonlar gösterdiğini belirlemiş olup, Bu varyasyonlardan

yararlanarak meyan bitkisinin ticari değere sahip genotiplerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Akan, H., Balos, M.M., 2008. GAP Bölgesinden Toplanan Meyan Kökü (*Glycyrrhiza glabra* L.) Taksonunun İhracat Durumu, Etnobotanik Özellikleri ve Tıbbi Önemi **Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi**, 20 (2): 233-241.
- Anonim, 2011. **Tunceli Ekonomik Değeri Olan Bitkiler Raporu**. Sektörel Araştırmalar Serisi-5, Fırat Kalkınma Ajansı, Tunceli.
- Anonymous, 2013a. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Erişim tarihi: 15.03.2013).
- Anonymous, 2013b. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Erişim tarihi: 15.03.2013).
- Arumuganathan, K., Earle E .D., 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. **Plant Molecular Biology Reporter**, 9, 229- 241.
- Arumuganathan, K., Earle E. D.,1991. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Mol. Biol. Rept**, 9 208-218.
- Asımgil, A., 1997. Şifalı Bitkiler, Timaş Yayınları, İstanbul, pp. 207-209.
- Baytop, T., 1991. Farmasötik Botanik İstanbul Üniversitesi basımevi sayfa: 186-193.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitapevleri, İkinci baskı, pp. 296-297.
- Bennet, M.D., Leitch I.J., 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Ann. Bot.** (London) 76: 113-176.
- Bennet, M.D., Smith J.B., 1976. Nuclear DNA amounths in angiosperms. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, 274: 227-274.
- Bennett, M.D., Smith J.B., 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, 334: 309-345.
- Bennetzen, J.L., Kellogg, E.A., 1997. Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? **Plant Cell**, 9: 1509–1514.
- Bennetzen, J.L., 2002. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. **Genetica**, 115: 29–36
- Bennetzen, J.L., Ma, J., Devos, KM., 2005. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. **Ann Bot** (Lond) 95: 127–132
- Bishop, G.J., Nomura, T., Yokota, T., Harrison, K., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Jones, JD., Kamiya, Y., 1999. The tomato dwarf enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96 (4):1761-1766.
- Bozan, B., 1988. **Meyan Kökünün Özütlenmesi ve Saflaştırılması İşlemleri**. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 103.
- Bradley, P.R., 1992. British herbal compendium, vol. 1. Dorset, England’ British Herbal **Medicine Association**, pp. 145-148.
- Coates, P., Blackman, M., and Cragg, G., (eds) 2005, Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) in Encyclopedia of Dietary Supplements, Marcel Dekker, 391–399.
- Çetin, Ö., Duran, A., Martin, E., Küçüköyük, M., 2015. Karyological studies in some *Glycyrrhiza* (*Fabaceae*) taxa from Turkey, **Caryologia**, 68:3, 254-264.
- Daniel, H., 2004. A Review and Applications of Flow Cytometry, Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Dec. 17.

- Danielson, P.B., 2002. The Sitokrom P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Curr Drug Metab**, 3 (6): 561-597.
- Davidson, S.E., Elliott, R.C., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Reid, J.B., 2003. The pea gene NA encodesent-kaurenoic acid oxidase. **Plant Physiol**, 131 (1): 335-344.
- Deniz, G., 2007. Flow sitometrik tekniklerin klinik kullanımı. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 3 (43): 73-80.
- Dewick, P.M., 2009. Medicinal Natural Products: **A Biosynthetic Approach Wiley**.
- Dolezel, J., Sgorbati, S., and Lucretti, S., 1992. Comparison of three DNA fluorochromesfor flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, 85: 625–631.
- Dolezel, J, Bartos J., 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Ann Bot**, 95: 99-110.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., and Suda, J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nat. Protoc**, 2: 2233–2244.
- Dunphy, C.H., 2004. Applications of Flow Cytometry and immuno histochemistry to Diagnostic Hematopathology. **Arch. Pathol. Lab. Med**, 128: 9, 1004-1022.
- Erayman, M., İlhan, E., Güzel, Y., Eren A., 2014. Transferability of SSR markers from distantly related legumes to *Glycyrrhiza* species. **Turk J Agric For**, (6) :32 38.
- Fedoroff, N., 2000. Transposons and genome evolution in plants. **Proc Natl Acad Sci USA**, 97: 7002–7007
- Flow Cytometry Report, 2008. Market Overview and Industry Survey Executive Summary. **Biocompare Surveys and Reports**, Published August 29.
- Forkmann, G., and Stotz, G., 1981. Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and flavonoid 3'-hydroxylase activity in *Antirrhinum majus* (snapdragon). **Z. Naturforsch**, 36c: 411-416.
- Fujita, S., Ohnishi, T., Watanabe, B., Yokota, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Sakata, K., Mizutani, M., 2006. Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. **Plant J**, 45 (5): 765-774.
- Gachon, C. M., Langlois-Meurinne M., Saindrenan, P., 2005: Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. **Trends Plant Sci**, 10 (11): 542-549.
- Gao, T., Yao, H. ve ark., 2010. Identification of medicinal plants in the family *Fabaceae* using a potential DNA barcod ITS₂. **Journal of Ethnopharmacology**, 130:116-121.
- Ghaffari, S. M. and Chariat-Panahi, M. S., 1985. Chromosome count of some angiosperms from Iran. **Iranian J. Bot**, 3: 67–73.
- Gregory, T.R., 2003. Is small indel bias a determinant of genome size? **Trends Genet**, 19: 485-488.
- Greilhuber., J. and Ebert., 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. **Genome**, 37, 646-655.
- Gruenwald, J. 2000. [PDR for Herbal Medicines]. 2nd ed. Montvale, New Jersey: **Medical Economics Company**; p. 16-8, 261-4, 313-5, 327-9, 342-4, 346-9, 469 472, 684 7, 719-23.

- Hammatt, N., Blclhall, N., W., and Davey, M. R. 1991. Variation in the DNA content of *Glycine* species. **J. Exp. Bot.** 42, 659-665.
- Harborne, J.B., 1994. Phytochemistry of the Leguminosae. In Phytochemical Dictionary of the Leguminosae, eds Bisby, F.A. et al. London: Chapman & Hall.
- Hayaski, H., Fukui, H., Tabata, M., 1988. Examination of triterpenoids produced by callus and cell suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*. **Plant Cell Rep**, 7: 508-511.
- Hayashi, H., Hirota, A., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., 1999. Molecular cloning and characterization of two cDNAs for *Glycyrrhiza glabra* squalene synthase. **Biol Pharm Bull**, 22 (9): 947-950.
- Hayashi, H., Huang P., Kirakosyan, A., Inoue K., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Shibuya, M., Ebizuka, Y., 2001. Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice. **Biol Pharm Bull**, 24 (8): 912-916.
- Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf B., Perez, O., Roederer, M., Herzenberg, L.A., 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from stanford. **Clin. Chem**, 48, 1819–1827.
- Ibrahim, S.F., Engh, G.V.D., 2007. Flow cytometry and cell sorting. Adv. **Biochem. Engin/ Biotechnol**, 106, 19–39.
- Jaroszeski, M.J., Heller, R., 1998. **Flow Cytometry Protocols**, Volume 91, Humana Press Inc, Totowa, Nj.
- Karahan, F., 2013. **Hatay’ da Yayılış Gösteren Glycyrrhiza Türleri (G. glabra L, G. echinata L. ve G. flavescens Boiss.) Üzerine Moleküler Ve Ekolojik Araştırmalar**. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay, 59.
- Kenji, K., Mao, S., Rie, N., Takashi, M., ve Tukihiro, S., 2007. Constituent roperties of Licorices Derived from *Glycyrrhiza uralensis* *G. glabra*, or *G. inflata* Identified by Genetic Information. **Biol. Pharm. Bull**, 30 (7) 1271-1277.
- Kim, G.T., Tsukaya, H., 2002. Regulation of the biosynthesis of plant hormones by Sitokrom P450s. **J Plant Res**, 115 (3): 169-177.
- Kima, B., Sarangia, P.P., Azkur, AK., Kaisthaa, S.D., Rousea, B.T., 2008. Enhanced viral immunoinflammatory lesions in mice lacking IL-23 responses. **Microbes. Infect**, 10, 302–312.
- Kubalakova, M., Kovarova, P., Suchankova, P., Cihalikova, J., Bartos, J., Lucretti, S., Watanabe, N., Kianian, S., F., Dolezel, J., 2005. Chromosome Sorting in Tetraploid Wheat and Its Potential for Genome Analysis, Copyright 2005 by the Genetics Society of America DOI: 10.1534. **Genetics**, 104.039180.
- Kumaraguru, U., Suvas S., Biswas, P.S., Azkur A.K., Rouse, B.T., 2004. Concomitant helper response rescues otherwise low avidity CD8 memory CTLs to become efficient effectors in vivo. **J. Immunol**, 172, 3719-3724.
- Li, X. Y. and Wei, L. J., 1992. The karyotype analyses of some new taxa of *Glycyrrhiza* Advan. **Plant Taxonomy North China**, 1: 101–107.
- Li, Y., Luo, H. M., Sun, C., Song, J. Y., Sun, Y. Z., Wu, Q., Ning, W., Yao, H., Steinmetz A., Chen, S. L. 2010. EST analysis reveals putative genes involved in glycyrrhizin biosynthesis. **BMC genomics**, 11 (1), 268.

- Liu, Y., Zhan, X.J. Li, W.D. Gao, Y., Wen, H., Chen, H.H., Wang, L.Q. Liu, C.S. 2014. Copy number variations of functional genes influence contents of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis*. **Acta Physiol Plant**. 36: 1433- 1440.
- 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 (4): 402 - 408.
- Lu, H-Y. Liu, J-M., Zhang, H-C, Yin, T., Gao, S-L., 2008. Ri-mediated Transformation of *Glycyrrhiza uralensis* with a Squalene Synthase Gene (GuSQS1) for Production of Glycyrrhizin. **Plant Mol Biol Rep**, 26: 1-11.
- Moghbel, N., Borujeni, M.K. Bernard, F., 2015. Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. **Faculty of Biological Sciences**. 13: 1-6.
- Murray, B.G., 2005. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant?. **Annals of Botany**, 95 (1): 119-125.
- Nafanailova, I. I., 1989. Examination, caryologica comparativa *Glycyrrhiza* L. et Meristotropis Fisch. et Mey. Botanicheskie Materialy Gerbariia Instituta Botaniki Akademii Nauk Uzbekskoi SSR 2: 51–68.
- Nelson, D., Werck-Reichhart, D., 2011. A P450-centric view of plant evolution. **Plant J**, 66, 194– 211.
- Oğuz, G., 1987. “**Meyan Kökü ve Önemi**” Fırat Üniv. Basın Bülteni 2 (37): 3.
- Ohri, D., 1998. Genome size Variation and plant systematics. **Ann. Bot**, 82 (Suppl. A.) 750-812.
- Okada, K., Tanaka, J., Miyashita, A., Imoto, K., 1981. High-speed liquidchromatographic analysis of constituents in licorice root I Determination of glycyrrhizin. **Yakugaku Zasshi**, 101, 822–828.
- Ormerod, M., 2000. **Flow Cytometry**, A practical approach. Third Edition, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Özkan, H., Tuna, M., Arumuganathan, K., 2003. Non-Additive Changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops- Triticum*) group. **Journal of Heredity**, 94 (3): 260-264.
- Paux, E., Roger, D., Badaeva, E., Gay, G., Bernard, M., Sourdille, P., Feuillet, C., 2006. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. **Plant J**, 48: 463–474.
- Petrov, D., 1997. Slow but steady: reduction of genome size through biased mutation. **Plant Cell**, 9: 1900–1901.
- Price, H.J, Bachmann, K., 1975. DNA content and evolution in the Microseridinae. **Am. J. Bot.**, 62: 262-267.
- Price, H.J., 1976. Evolution of DNA content in higher plants. **Bot Rev**, 42: 27–52.
- Rahman, M., 2006. Introduction to flow cytometry. Serotec Ltd. Oxford (UK). Published by Serotec Ltd.
- Ralston, L., Kwon, S.T., Schoenbeck, M., Ralston, J., Schenk, D.J., Coates, R.M., Chappell, J., 2001. Cloning, heterologous expression, and functional

- characterization of 5-epi aristolochene-1,3- dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Arch. Biochem. Biophys**, 393, 222–235.
- Ramilowski, J.A., Sawai, S., Seki, H., Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Muranaka, T., Saito, K., Daub, C.O. 2013. Glycyrrhiza uralensis Transcriptome Landscape and study of Phytochemicals. **Plant Cell Physiol**. 54(5): 697-710.
- Rees, H., Walter, M.R., 1965. Nuclear DNA and the evolution of wheat. **Heredity**, 20: 73-82.
- Seçmen, Ö., 2008. **Tohumlu Bitkiler Sistematiği**. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitapları Serisi No: 16, 431s, İzmir.
- Seki, H., Ohyama K., Sawai, S., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., Muranaka, T., 2008. Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a Sitokrom P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. **Proc Natl Acad Sci USA**, 105 (37): 14204-14209.
- Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Fukushima E.O, Akashi, T., Aoki, T., Saito, K., Sudo T., 2011. Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of Glycyrrhizin. **Plant Cell**, 23, 4112-4123.
- Shapiro, H.M., 2003. Practical Flow Cytometry. 4th ed. **Wiley-Liss**. USA.
- Shibuya, M., Hoshino, M., Katsube, Y., Hayashi, H., Kushiro, T., Ebizuka, Y., 2006. Identification of beta-amyrin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay. **Febs J**, 273 (5): 948-959.
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O., 2007. The Ubiquitous Roles of Sitokrom P450 Proteins: **Metal Ions in Life Sciences** Wiley.
- Southern, D.I., 1967. Species relationships in the genus Tulipa. **Chromosoma**, 23: 80-94.
- Stotz, G., de Vlamming, P., Wiering, H., Schram, A.W., and Forkmann, G., 1985 Genetic and biochemical studies on flavonoid 3' hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida* **Theor Appl. Genet**, 70: 300-305.
- Swift, H., 1950. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 36: 643-654.
- Şerbetçi, H., 2007. Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) **Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi**. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi).
- Takino, Y., Koshioka, M., Shiokawa, M., Ishii, Y., Maruyama, S., Higashino, M., 1979. Quantitative determination of glycyrrhizic acid in liquorice roots and extracts by TLC-densitometry. **Planta Medica**, 36, 74-78.
- Vershinin, V.A., Theodore, A.R., Knox, M.R., Mike, J.A., and Ellis, T.H., 2003. Transposable Elements Reveal the Impact of Introgression, Rather than Transposition, in *Pisum* Diversity, **Evolution and Domestication**, 20 (12): 2067–2075.
- Vlácilova, K., Ohri, D., Vrana, J., Cihalikova, J., Kubalakova, M., Kahl, G., Dolezel, J., 2002. Development of flow cytogenetics and physical genome mapping in Chickpea (*Cicer arietinum* L): 10 (8): 695-706.
- Wust, M., Little, D.B., Schalk, M., Croteau, R., 2001. Hydroxylation of limonene enantiomers and analogs recombinant (2)-limonene 3- and 6-hydroxylases from

- mint (*Mentha*) species: evidence for catalysis within sterically constrained active sites. Arch. Biochem. **Biophys**, 387, 125–136.
- Yamazaki, M., Sato, A., Shimomura, K., Saito, K., and Murakoshi, I., 1994. Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPH and RFLP analyses. Biological ana **Pharmaceutical Bulletin**, 17: 1529-1531.
- Yao, H., Zhao, Y., Chen, D.F., Chen, J.K., Zhao, T.S., 2008. ISSR Primer Screening and Preliminary Evaluation of Genetic Diversity in Wild Populations of *Glycyrrhiza uralensis*. **Biologia Plantarum**, 52: 117-120.
- Zengin, S., Oktay, M.M., Al, B., Yılmaz, D.A., Boğan, M., Safil, Y. et al., 2013. **Dönemsel bir akciğer ödemi nedeni: meyan şerbeti içimi. Gaziantep Tıp Derg.** 19: 99-102.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Sakarya’da doğdu. İlköğretimi Elazığ ve Karamanda, Orta ve Lise'yi İskenderun’da okudu. 2008 yılında girdiği Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı üniversiteside okurken Pedagojik Formasyon Bölümünü tamamlayarak mezun oldu. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalında Yüksek Lisansa başladı ve öğrenimine devam etmektedir.