

**RAPD MARKÖRLERİ İLE AKDENİZ
BÖLGESİNDE YETİSTİRİLEN
BAZI MISIR GENOTİPLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Sunay SALKIN
Yüksek Lisans Tezi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Ocak-2005

JÜRI VE ENSTITÜ ONAYI

Sunay SALKIN'nin "RAPD Markörleri ile Akdeniz Bölgesi'nde Yetistirilen Bazı Misir Genotiplerinin Karakterizasyonu" başlıklı Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezitarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) : Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN

Üye : Prof. Dr. Ersin YÜCEL

Üye : Yard. Doç. Dr. Nüket AKALIN BİNGÖL

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Altug İFTAR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RAPD MARKÖRLERİ İLE AKDENİZ BÖLGESİ'NDE YETİSTİRİLEN BAZI MISIR GENOTİPLERİNİN KARAKTERİZASYONU

SUNAY SALKIN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN

2005, 55 sayfa

Bu çalışmada ; Akdeniz Bölgesinde Yetistirilen P-3165, P-3394, Vero, Luce, OSKK-596 ticari mısır (*Zea mays*) çeşitlerinin genetik karakterizasyonunu RAPD-PCR tekniği ile belirlendi. Kullanılan 9 farklı RAPD primerinden toplam 75 markör bant elde edildi. Bant profilleri Jaccard eşitliği ile değerlendirilerek aralarındaki benzerlik değerleri hesaplandı. Çeşitler arasındaki genetik benzerlik değerleri 0.383 ile 0.561 arasında bulundu. Kümeleme analizi yapılarak dendrogram çizildi. Dendogramda 2 ana küme ve iki alt küme oluştu. Sonuçlar aynı tohum firmasında üretilen tohum çeşitlerinin aynı grupta yer aldığını gösterdi. Ayrıca bu çalışma ile, bu çeşitler arasındaki polimorfizmin belirlenmesini sağlayan ve çeşide özgü olan tanımlayıcı primerler belirlendi. Sonuç olarak farklı isimler altında satılan bu 5 ticari mısır çeşidinin genetik olarak da farklı oldukları gösterildi.

Anahtar Kelimeler: RAPD-PCR, Mısır (*Zea mays*), Genetik Benzerlik, DNA, Polimorfizm

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CHARACTERISATION OF CORN GENOTYPES GROWN IN MEDITERANIAN REGION WITH RAPD MARKERS

SUNAY SALKIN

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program**

Supervisor: Asist. Prof. Emel Sözen

2005, 55 pages

In this study, genetic characterisation of P-3165, P-3394, Vero, Luce and Tareks OSSK-596 corn varieties grown in Mediterranean region was determined by using RAPD_PCR technique. Total of 75 marker bands were obtained from 9 different RAPD primers. Similarity values were calculated with evaluating band profiles with Jaccard's coefficient. Genetic similarity values were found between 0.383 and 0.561. A dendrogram was drawn by cluster analysis. Two main cluster and two sub clusters were identified in this dendrogram. Results showed that corn varieties generated by the same company were in the same cluster. In addition, this study determined genotype specific identifying primers which provide polymorphisms between these varieties. As a result, it was shown that these 5 commercial corn varieties sold under different labels were genetically different.

**Keywords: RAPD-PCR, Corn (*Zea mays*), Genetic Similarity, DNA,
Polymorphisms**

TESEKKÜR

Öncelikle, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için gereken koşulların sağlanmasında çok büyük emegi olan, bilgileri, önerileri ve yapıcı eleştirileri ile beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın **Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN**'e ve bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı hocam Sayın **Prof. Dr. Merih KIVANÇ** a, içtenlikle teşekkür ederim. Deney çalışmalarım sırasında ders programlarında yaptığı düzenlemelerle benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Mahmudiye Lisesi Müdürü **Sayın Ömer ÇIL**' e ve **tüm öğretmen arkadaşlarıma** teşekkür ederim.

Ayrıca tüm yaşamım boyunca bana her konuda destek olan sevgili **aileme** ve büyük desteklerinden dolayı sevgili **Özcan HASAR**'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Sunay SALKIN

Ocak, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TESEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mısır Bitkisinin Genel Özellikleri.....	1
1.1.1. Mısır Tipleri.....	2
1.1.2. Mısırın Endüstride Kullanımı.....	4
1.1.3. Mısır Üretimi ve Tüketimi.....	5
1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	7
1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayalı Markörler.....	10
1.3.1. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR).....	12
1.3.1.1. RAPD-PCR Optimizasyonu.....	14
1.3.1.2. RAPD Markörlerin Avantajları ve Dezavantajları.....	16
1.3.1.3. RAPD Verilerinin Analizi.....	17
1.3.1.4. RAPD'lerin Kullanım Alanları.....	18
1.4. Konu ile ilgili Yapılmış Çalışmalar.....	19
2. MATERYAL METOD	22
2.1. Bitki Materyali.....	22
2.2. Tohum Çimlendirme.....	22

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA ogaltılması.....	25
2.7. DNA ve PCR rnlerinin Jel Elektroforezi.....	27
3. SONUÇLAR VE TARTISMA.....	28
3.1. Sonuçlar.....	28
3.2. Misir esitlerinde DNA izolasyonu.....	28
3.2.1. RAPD-PCR.....	30
3.2.2. RAPD Bant Profillerinin Analizi.....	40
3.3. Tartisma.....	48
KAYNAKLAR.....	51

SEKILLER DIZINI

1.1. Misir Tipleri.....	4
1.2. Bölgelere göre misir üretim oranları.....	6
1.3. Standart PCR.....	10
1.4. RAPD yöntemi ve olusan bantların ledeki görüntüsü.....	13
3.1. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 ticari çeşidin DNA görüntüleri.....	29
3.2. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 1 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	31
3.3. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 2 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	32
3.4. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 3 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	33
3.5. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 5 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	34
3.6. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 9 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	35
3.7. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 11 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	36
3.8. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 14 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	37
3.9. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 17 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	38
3.10. <i>Zea mays</i> 'a ait 5 çeşidin, OPAB 18 primerinin kullanılmasıyla elde edilen RAPD-PCR sonuçları.....	39
3.11. Misir çeşitlerinin kümeleme analiz sonuçları.....	47

ÇİZELGELER DIZINI

1.1. Türkiye misir üretim rakamları.....	7
2.1. DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.....	23
2.2. RAPD-PCR’da kullanılan primerler.....	24
2.3. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler.....	26
2.4. RAPD-PCR’da kullanılan termal döngü programı.....	26
3.1. <i>Zea mays</i> ’a ait 5 farklı çeşidin DNA’larının spektrofotometre ölçüm sonuçları.....	28
3.2. Vero, P-3165, P-3394, OSKK-596 ve Luce misir çeşitlerinin RAPD primerlerle oluşturduğu PCR ürünleri.....	40
3.3. OPAP 1 primeri ile elde edilen bantlar.....	41
3.4. OPAP 2 primeri ile elde edilen bantlar.....	41
3.5. OPAP 3 primeri ile elde edilen bantlar.....	42
3.6. OPAP 5 primeri ile elde edilen bantlar.....	43
3.7. OPAP 9 primeri ile elde edilen bantlar.....	44
3.8. OPAP 11 primeri ile elde edilen bantlar.....	44
3.9. OPAP 14 primeri ile elde edilen bantlar.....	45
3.10. OPAP 17 primeri ile elde edilen bantlar.....	45
3.11. OPAP 18 primeri ile elde edilen bantlar.....	46
3.12. RAPD verilerine göre SPSS programında jaccard eşitliği kullanılarak oluşturulmuş genetik benzerlik matrisi.....	47

SIMGELER VE KISALTMALAR DIZINI

°C	: Santigrad Derece
m	: Mikrolitre
mM	: Mikromolar
AFLP	: Amplified Fragment Length Polimorphism (Çogaltılmış Parça uzunluk Polimorfizmi)
DAF	: DNA Amplified Fingerprinting (DNA Çogaltılmış Parmak Izi)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNTP	: Deoksiribonükleotit Tri Fosfat
EtBr	: Ethidium Bromid
GC	: Guanin Sitozin Bazları.
H₂O	: Su.
Kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum Klorür
mg	: Miligram.
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
Ng	: Nanogram
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ph	: Hidrojen İyon Konsantrasyonu
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çogaltılmış Polimorfik DNA)
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Rotation per minute (Dakikadaki dönme hızı)
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
STS	: Sequence Tagged Site (Dizi Etiketli Bölge)
TBE	: Tris Borik Asit
TE	: Tris ETDA
Tris HCl	: Tris Hidroklorik Asit
U.V.	: Ultraviyole
V	: Volt

1. GIRIS

1.1. Misir Bitkisinin Genel Özellikleri

Misir tarla bitkileri arasında en iyi tanınan bitkilerdendir. Kültür misir çeşitlerinin dünyaya yayılması Kristof Kolomb'un Amerika'yi keşfinden sonra olmuştur [1]. Misir (*Zea mays* L.) bugdaygiller (Poaceae) familyasına ait bir tür olup $2n=20$ kromozoma sahiptir. Misir bitkisi morfolojik olarak kök, sap ve yaprak olmak üzere üç kısma ayrılır [2]. Misirda çim kökü, embriyonel kökler, adventif kökler ve destek kökleri yer alır. Embriyonel kökler bitki yaşamı boyunca görev yaparlar. Misirin asıl kök sistemi toprak yüzeyinin üstündeki destek köklerinden oluşur. Misir bitkisinde sap kısmi bogum (nod) ve bogum aralıklardan (internod) oluşur. En üst kısımda, erkek çiçek topluluğu olan tepe püskülü yer alır. En uzun ve en ince bogum arası tepe püskülünü taşıyan kısımdır. Bogumlardan yaprak kını ve koçan çıkar. Misiri diğer tahıllardan ayırt eden özellik sapın içinin öze dolu olmasıdır. Bugdaygiller familyasının yapraklarının genel özellikleri misir yapraklarında da görülür. Misir yaprağı, uzunluğuna paralel damarlı yaprak kını ve uzun bir yaprak ayasından oluşur. Yaprak ayasının üst yüzeyinde tüyler görülür. Stoma sayısı üst yüzeyde az, alt yüzeyde fazladır. Bitkide yer alan ortalama yaprak sayısı 12-18 kadar olabilmektedir [2]. Misir bitkisi monoiktir, erkek çiçekler tepe püskülünde, dişi çiçekler ise sap bogumundan çıkan koçanlar üzerinde toplanmıştır [3].

Erkek çiçeğin basakçığında iki çiçek bulunur. Çiçeğin iki çiçek kavuzu, üç erkek organı, gelişmemiş bir yumurtalığı ve iki pulcugu vardır. Bir misir bitkisi 3-5 milyon polen vermektedir [2]. Misirda dişi çiçek topluluğu koçan formundadır. Koçanlar yan dal olarak yaprak koltukları içerisinde meydana gelir. Her koçan bir koçan sapıyla, kalın bir koçan eksenini, bu eksen üzerindeki dişi çiçeklerden ve koçan yapraklarından oluşur. Dişi çiçekler disicik borularını uzatarak stigmalarını koçanın ucundan dışarı çıkarır ve koçan püskülünü oluşturur. Disicik borularının ucunda çatallı disicik tepesi bulunur. Püskül çıkar çıkmaz döllenmeye hazırdır. Her koçanda 300-1000 püskül oluşur ve polen tozu alıncaya kadar 10-15 gün canlı kalabilir [4].

1.1.1. Misir Tipleri

Tüm misir form ve çeşitleri tek bir tür içinde toplanmıştır. Bu tür içinde misir bazı araştırmacılara göre alt tür, bazılarına göre de varyete olarak kabul edilen 7 gruba ve tipe ayrılır. Gruplandırma esas olarak endosperm ve kavuz karakterlerine göre yapılmıştır.

Misirin gruplandırılmasında temel olan karakteristikler arasındaki ayrılıklar bir yada birkaç genle ifade edilir. Örneğin: “*Saccharata*” tipi endosperm resesif “su” geniyle “*ceratine*” tipi endosperm resesif “wx” geniyle, *tunicata* tipindeki başçık formu bir dominant “Tu” geniyle oluşturulmaktadır.

Misirda çeşit kavramı, ancak tozlaşma ve döllenme denetim altına alınmış, belli kendilemiş hatlar arasında ortaya konulmuş olan melez materyal (F1) için geçerlilik kazanır. Tane karakteristiklerine göre saptanan 7 grubun adlarıyla her birinin tane ve bitki özelliklerine ilişkin bilgiler şöyledir:

<u>Botanik Adi</u>	<u>İngilizce Adi</u>	<u>Türkçe Adi</u>
<i>Zea mays idendata</i> Strut.	dent corn	at dişi misir
<i>Zea mays indurata</i> strut.	flint corn	sert misir
<i>Zea mays amylaceae</i> strut.	flour corn	unlu misir
<i>Zea mays saccharata</i> strut.	sweet corn	seker misir
<i>Zea mays everta</i> strut .	pop corn	patlak misir
<i>Zea mays ceratina</i> kulesch.	wavy corn	mumlu misir
<i>Zea mays tunicata</i> Strut.	pop corn	kavuzlu misir

Zea mays idendata Sturt.’in (at dişi misir) taneleri hem sert hem de yumuşak nisasta ile doludur. Boy genellikle uzundur 1,5-6 m arasında değişir. Ticari önemi olan misirler, sarı ve beyaz taneli olanlardır. Dünya misir üretiminin %80’inden fazlası at dişine aittir. Samsun, Sakarya, Kocaeli, Adana, Antalya ve İzmir illerimizde yetismektedir. Daha çok glikoz sanayinde kullanılır (Şekil.1.a) [1].

Zea mays indurata Strut.’in (sert misir) endosperminin orta kısmı genellikle yumuşak nisasta ile doludur. İri taneli sert misir ve küçük taneli sert misir olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Ticari yönden önemli olanlar sarı ve beyaz tanelidir. Ülkemizde daha çok Karadeniz Bölgesinde yetistirilir. Taneleri sert ve yüksek proteindir (Şekil.1.1.b) [1].

Zea mays amyloacea Sturt. (unlu misir) tanelerinin içi ve disi her tarafı yumusak nisasta ile kaplidir. Taneleri sekil itibari ile sert misirinkine çok benzer. Dünya misir tarimi için önemli bir çesit degildir (Sekil.1.1.c) [1].

Zea mays saccharata Strut.'in (seker misiri) ergin taneleri saydam ve kirisiktir. Endosperm sekerle dolu olduğundan taze iken tatlidir. Tanesinde protein ve yağ orani öteki misirlardan yüksektir. Son yıllarda ülkemizde yaygın olarak yetistirilmeye baslanmistir (Sekil.1.1.d) [1].

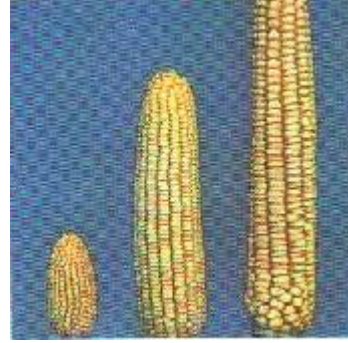
Zea mays evarta Strut. (cin misir) çok sert nisasta ve küçük taneleriyle karakterize edilir. Tane yapisi çok sert ve tane kabugu kalın olduğundan isitildiklerinde endospermdeki nem buharlasip genlesir ve kabugu birden yırtılarak taneyi patlatir, endosperm hacmi genisler. Ülkemizde özellikle Isparta ve Burdur dolaylarında ekilisi oldukça yaygindir (Sekil.1.1.e) [1].

Zea mays ceratina Kulesch. (mumlu misir) taneleri puslu görünüslü olup endospermumlu bir kesit verir. Taneleri küçüktür. Nisastasi amilopektinden oluşur. Endospermi ve poleni iyotlu potasyum eriyigiyle kırmızı renk verir; fakat yaklaşık %78 amilopektin ve %22 amilaz içeren diğer misirlarin nisastasi maviye dönüşür [1].

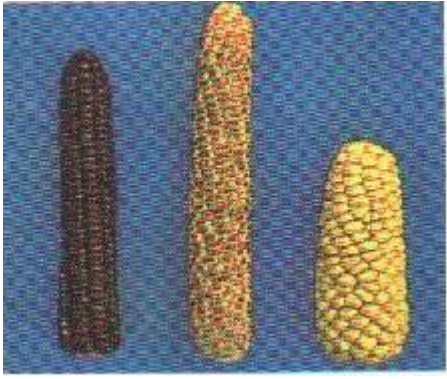
Zea mays tunicata Strut.'in (kavuzlu misir) ekonomik önemi yoktur. Başçık dis kavuzlari ve çiçek kavuzlari dumura ugramamis çok iyi gelişmemis tek misir çesididir (Sekil.1.1.f) [1].



a.



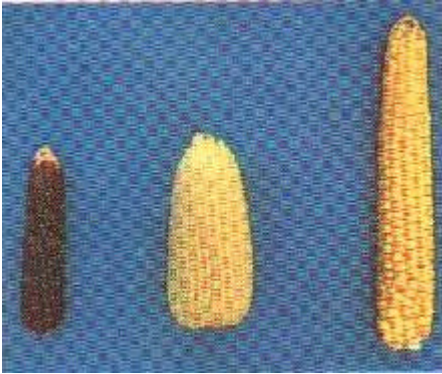
b.



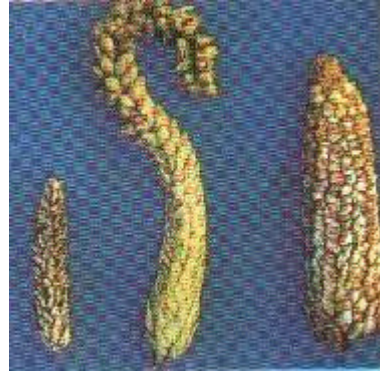
c.



d.



e.



f.

Sekil 1.1. Misir Tipleri **a.** At disi misir **b.** Sert misir **c.** Unlu misir **d.** Seker misiri

e. Cin misiri **f.** Kavuzlu misir

1.1.2. Misirin Endüstride Kullanımı

Misir hayvan yemi olarak kullanımının dışında, gerek doğrudan insan yiyeceği olarak gerekse sanayide kullanılan ürünlerin üretimi için genel olarak fabrikalarda yas isleme, kuru isleme ve fermentasyon gibi üç farklı isleme tabii tutulur. Yas öğütme işleminde mısır tanelerinin içeriğini birbirinden ayırmak üzere birtakım fiziksel ve kimyasal işlemlere tabii tutularak faydalı ürünler elde edilir. Bu ürünlerden başlıcaları nisastalar, şekerli ürünler, besin maddeleri ve mısır yağıdır.

Kuru öğütme işleminde ise genel olarak temizleme, nemlendirme, çimlenmeyi önleme, kurutma, soğutma, sınıflama, havalandırma, öğütme, eleme ve paketleme gibi devreler yer alır. Fabrikalarda işlenen kuru mısır ürünleri insan yiyeceği, bira sanayi, fermentasyonda karbonhidratların önemli bir kaynağı, evcil hayvan yiyeceği ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır [5].

Endüstrilemiş ülkelerde fermentasyon, hızla gelişen bir endüstri dalıdır. Fermentasyon yoluyla mısırdan elde edilen ürünlerin başında bira gelir. Bunun dışında fermentasyon yoluyla II. Dünya savaşında antibiyotik üretimi başlamış ve gelişerek günümüzde önemli bir endüstri kolu haline gelmiştir. Antibiyotik yapımında karbonhidrat kaynağı olarak mısır şurubu, dekstroz, mısır nisastası, laktoz ve sukroz tercih edilmektedir [5].

II. Dünya savaşında mısırdan ilk elde edilen antibiyotik penisilin olmuştur. Bunu daha sonra neomycin, bacitracin, streptomycin ve tetracycline antibiyotikleri takip etmiştir. Mısırdan günümüzde 85 farklı antibiyotik üretildiği bilinmektedir [5].

Ayrıca mısırdan fermentasyon yoluyla pek çok kimyasal üretilmektedir. Bunların sayısı 18'in üzerindedir. En önemlileri sitrik asit, glutamik asit, laktik asit, lizin, aseton, n-bütanol, etanol ve enzimlerdir [5].

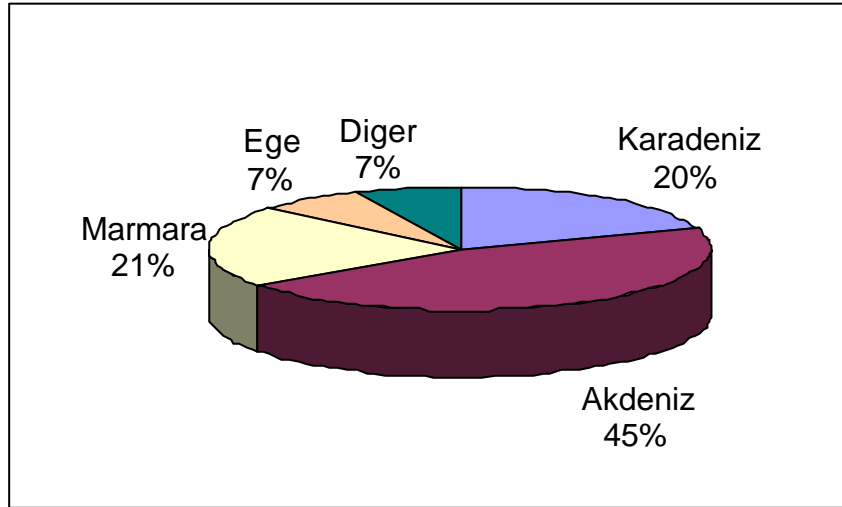
1.1.3. Türkiye'de Mısır Üretimi ve Tüketimi

Dünyada ortalama 138 milyon hektar alanda mısır ekimi yapılmaktadır. Toplam dünya üretimi ortalama 600 milyon ton, ortalama hektara verim ise 43 ton'dur. Mısır

üretiminde dünyada önde gelen ülkeler; Çin, Rusya, Hindistan, Polonya, ABD, Meksika, Brezilya ve Almanya'dır [6].

Ülkemizde ise mısır tarla ürünleri arasında ekili alan bakımından 500-550 bin ha. ile buğday, arpa, nohut, mercimek, pamuk, ayçiçeğinden sonra yedinci sırada, üretim miktarı bakımından (2.300.000 ton) buğday ve arpadan sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Hemen hemen ülkemizin tüm bölgelerinde yetistirilmesine rağmen ekonomik olarak Adana bosta olmak üzere Akdeniz Bölgesi'nde, Karadeniz Bölgesi'nde ve Marmara Bölgesi'nde yetistirilmektedir. Üretimin yaklaşık % 85'i bu bölgelerimizde yapılmaktadır (Şekil.1.2) [4].

Mısır tarımının belli ölçüde su istemesi nedeniyle, bu ürünün verimi diğer hububata göre daha yüksektir. Toplam üretimin yaklaşık yarısının gerçekleştirildiği Akdeniz Bölgesi (721 kg/da) verim bakımından Türkiye ve Dünya ortalama veriminin üzerindedir [6].



<http://www.cukurovataem.gov.tr/Misir%20Yetistiriciligiweb.htm>

Şekil 1.2. Bölgelere Göre Mısır Üretim Oranları

2001 yılı itibarıyla toplam tahıl ekim alanı içinde mısırın payı %4'dür. Mısır üretim miktarı 2000 yılında 2.3 milyon ton, 2001 yılında 2.2 milyon tondur. 2002

Yilinda ise misir üretiminin 2.1 milyon ton olarak gerçekteştiği tahmin edilmektedir (Çizelge 1.1) [6].

Ülkemizde üretilen misirin tamamına yakini yurt içinde tüketilmektedir. İçinde bulundurduğu zengin besin maddesi nedeniyle insan ve hayvan beslenmesinde büyük değer tasimaktadır. Dünyada üretilen misirin yaklaşık %27'si insan beslenmesinde ve kullanımında, %73'ü ise hayvan yemi olarak tüketilmektedir. Bizim gibi gelişmekte olan ülkelerde üretilen misirin %45.9'u hayvan beslenmesinde, %54.1'i insan beslenmesinde kullanılırken, gelişmiş ülkelerde hayvan yeminin payı %88.9'a ulaşmaktadır [6].

Çizelge 1.1. Türkiye misir üretim rakamları (www.izob.gov.tr)

Yıllar	Ekim alanı (1000 Ha)	Üretim (1000 Ton)	Verim (Kg/Ha)
1997	545	2.080	3817
1998	550	2.300	4182
1999	518	2.297	4434
2000	555	2.300	4144
2001	550	2.200	4000
2002(Tahmin)	-	2.100	-

Ülkemizde hayvancılığın gelişmesi ile paralel gelişme gösteren yem sanayi misira duyulan talebi arttırmıştır. Ülkemizde misir üretimi yurtiçi tüketimi karşılayamamakta ve her yıl ortalama 1 milyon ton civarında misir ithal edilmektedir. Hali hazır misir ekim sahalarında, bu miktar ilave misir ekimini karşılayacak tarım arazisi mevcut değildir. Bu nedenle birim alandan elde edilen verimi artırmak öncelikli hedef olmalı, bu amaçla kaliteli tohumluk kullanımı teşvik edilmelidir [6].

1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); genetikçiler, ekolojistler ve popülasyon biyologları için etkili bir yöntem olarak ilk kez 1985'te Kary B. Mullis tarafından

bulundu [7]. Bu teknigin kabul edilir olmasini saglayan baslica nitelikler sade, kolay ve hizli olmasidir. Analitik bir araç olan PCR bugün mevcut en hassas arastirmayi saglar. PCR, DNA veya RNA'nin in vitro çoğaltilmasina imkân veren bir yöntemdir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), uzunluklari yaklasik 2 kb (kilobaz)'a kadar olan DNA ve RNA dizilerinin seçilerek çoğaltilmasini saglar [8].

PCR yönteminde gerekli olan ve çoğaltilmasi istenen dizinin her iki ucunu taniyan sentetik baslatici oligonükleotitler (primerler), zit ve birbirleriyle çakisan yönlerde ilerleyen enzimatik sentezlerin gerçekleştirilmesinde kullanilir ve istenilen ürünün elde edilmesiyle sonuçlanir (Sekil.1.3). PCR'in önemli bir özelligi özel bir DNA dizisini seçip çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çikmasini önlemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanımlamasini kolaylastirmakla kalmaz, ek olarak DNA'nin analiz edilmesini de saglar. PCR, DNA'nin önemli ölçüde saflastirilmesini gerektirmedigi için, nükleik asitlerle calismada harcanan zaman ve emegi azaltmakta ve hücretsiz klonlama olarak da adlandırilmaktadir [9].

PCR'in temeli; DNA denatürasyonu, primerlerin birlesmesi ve DNA polimerizasyonu ilkelerine dayanir [10]. PCR yönteminin uygulanabilmesi için tam ve dogru bir baz dizisi bilgisine ihtiyaç duyulmaktadir. Yöntemin çok duyarli olmasi nedeniyle çok küçük miktarlardaki kontaminasyon bile yanlis sonuçlara neden olur. PCR çalismalarında bir dezavantaj ise her primer çiftinin kendine özgü birlesme ve uzama kosullarina sahip olmasidir. Bu kosullar; isi, devir uzunlugu, primer yogunlugu, Mg konsantrasyonu, enzim ve DNA miktarı olarak söylenebilir [10]. Uygun primer seçimi PCR'in basarisini etkileyen faktörlerin basinda gelir [9]. Genellikle 15-30 baz uzunlugunda sentetik oligonükleotitler kullanilir. Ideal bir primerde G-C orani %50 olmalı, amplifiye edilecek kaliba özellikle 3' ucu olmak üzere muntazam uymalidir. Iki primer hemen hemen aynı erime özelliklerine sahip olmalı ve birbirinin tamamlayicisi olmalıdır [11].

PCR isleminde *Thermus aquaticus*'tan elde edilen DNA polimeraz enzimi kullanilir. Bu enzim *taq* polimeraz olarak adlandırilir. Termal denatürasyona oldukça dirençli (95 °C'ye kadar dayanikli), optimal aktivitesi 70-80 °C arasinda ve 37 °C de çok

düşük bir aktiviteye sahiptir. Enzimin verimliliği yüksek olduğundan birkaç kilobaz uzunluğundaki segmentler kolaylıkla amplifiye edilebilir [k].

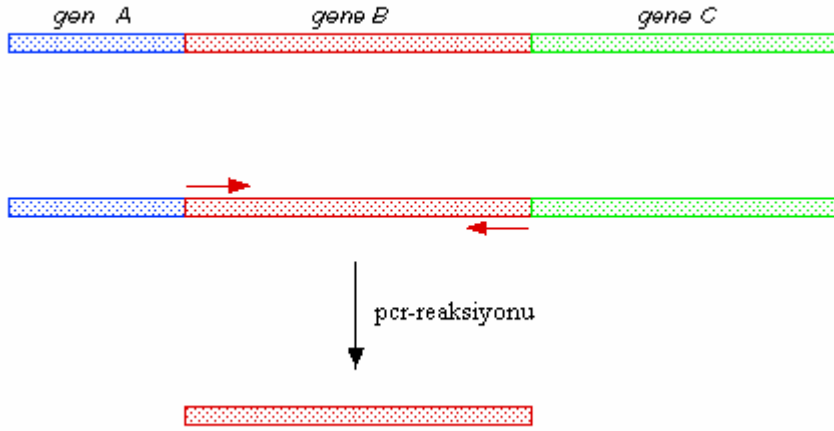
PCR 3 aşamada gerçekleştirilmektedir; DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (Denatürasyon), primerlerin birleşmesi (Annealing), primelerin uzaması (Extension).

DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (Denatürasyon) aşamasında, sıcaklık ile çoğaltılması istenen DNA çift iplikten tek ipliğe dönüşür. Genellikle protokollerde kullanılan denatürasyon isisi 94°C'dir. Böyle yüksek isilerde sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarının ayrılması için DNA denatüre edilir [8].

Primerlerin Birleşmesi (Annealing) aşamasında DNA için spesifik olan ve primer adı verilen oligonükleotid, ilk evede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine tamamlayıcı olan nükleotid dizisi ile birleşir (hibridize olur). Primerler hedef DNA'nın amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanılırlar. Bu nedenle primer (öncü) olarak adlandırılırlar. Primerlerin bağlanması aşamasında isisi 40-60°C'ye düşürülür. Primerlerin bağlanması için gereken isisi ve süre amplifikasyon primerlerinin konsantrasyon ve uzunluklarına bağlıdır [8].

Primerlerin Uzaması (Extension) aşamasında tamamlayıcı diziyle birleşen primer hibritleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen *Taq* polimeraz enzimi kullanılır. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75 °C'lerde sıcaklık uygulanır. 72°C de bir dakikalık uzama süresi 2 kb uzunluğundaki bir amplifikasyon ürünü için yeterli kabul edilir [8].

PCR, DNA dizilerinin hızlı bir şekilde ortaya çıkarılmasında, insan gen haritasının geliştirilmesinde, gen aktivitesi çalışmalarında tek veya birkaç hücrenin analizini olası kılarak moleküler biyoloji alanına katkıda bulunmaktadır. Tıp alanında ise; mutasyonların doğrudan dizi analizi ile tanınması ve genetik hastalıkların bir kısmının genel popülasyonda taranmasını sağlamaktadır [12].



avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapid.html - 4k -

Sekil.1.3. Standart PCR

1.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayali Markörler

DNA parmak izi çalışmalarında kullanılmak üzere çok sayıda moleküler markör geliştirilmiştir. Bu markörler arasında baslıca DAF, STS, SSR, AFLP, RAPD'ler bulunmaktadır. DAF, genomun ayrılmış parçalarının çoğaltımına baslamak için, çok kısa rastgele seçilmiş oligonükleotidleri (yaklaşık 5 nükleotid uzunluğunda) kullanır ve karakteristik parmak izi oluşturur. DAF RAPD'e göre düşük primer konsantrasyonu, minimum primer uzunluğu ve yüksek bağlanma derecelerinde reaksiyonu yürütmektedir [11].

DAF birbiri ile çok yakın ilişkili organizmaların parmakizi, adli tip, taksonomi ve filogenetik çalışmalarında kullanılabilir. Ayrıca fenotipi tanımlanmış genetik lokuslara sıkıca bağlı markörleri bulmak ve mutasyonel olarak tanımlanmış genomik bölgelerin bilinen dizi etiketli markörlerini oluşturmak amacıyla kullanılabilir. Ancak bu teknikle PCR çoğaltımı için, önceki dizinin bilgisine gerek duyulmaktadır [13].

Dizi Etiketli Bölgeler (STS) markörleri, PCR metoduna dayalı olmaları ve uygulamasında radyoaktif problemaya gerek olmaması nedeniyle RFLP'ye alternatif

olarak kullanılmaktadır. STS'ler RFLP probu olarak kullanılan bir klon veya bir RAPD ürününün ucuna tamamlayıcı olarak dizi bilgisinden 18-20 nükleotid uzunluğunda oligonükleotidler sentezlemektedir. Bu yeni primerler sonra, PCR yoluyla DNA çoğaltımı için kullanılmaktadır. Farklı DNA'lar arasındaki amplifikasyon ürünleri polimorfik olabilmektedir. Bu durumda polimorfizmi tanımlamak için farklı restriksiyon enzimleri ile ürünleri kesmek gerekmektedir.

PCR reaksiyonu daha yüksek uzama sıcaklıklarına ulaşabilmektedir. Çünkü bu teknikte kullanılan primerler RAPD haritalaması için kullanılanlardan daha uzundur. Özel ve basit amplifikasyon modeli, STS'de reaksiyon sıcaklıklarındaki kolay değişim tekniğinin sonuçlarını laboratuardan laboratuara tekrarlanabilir kılmaktadır. STS markörleri, bir moleküler haritalamada herhangi bir genin yerini hızlı bir şekilde belirleyebilir [14].

Basit Dizi Tekrarları (SSR) markörleri, yüksek miktarda polimorfik olmaları, kodominant olmaları, PCR yoluyla hızlı çoğaltıma olanak tanınmaları ve bilinen primer dizileri sayesinde öteki markör uygulamalarına göre daha kullanışlı olmaları nedeniyle idealdir [15].

SSR'ler her lokusta allostimlerden [16] veya RFLP'lerden [17] daha çok polimorfik aleller ortaya koymaktadır. Her geçen gün daha fazla sayıda laboratuarda bitkilerde haritalama ve genom analizi için bu markörlardan faydalanılmaktadır. SSR'ler tüm genom üzerinde adeta tek biçimde yayılmış olmaları nedeniyle genom haritalama projeleri için çok kullanışlıdır. SSR'lar 1-6 bp uzunluğunda kısa ardışık tekrarlanan dizi motiflerinden oluşmaktadır [18, 19]. Bitki genomunda çok miktarda buldukları ve polimorfik oldukları kanıtlanmıştır [20, 21, 22].

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism); Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu oluşan parçaların bir kısmının selektif amplifikasyonu esasına dayanan genotipleme metodudur. İki varyasyonu bulunmaktadır. Birinci varyasyonda iki farklı restriksiyon enzimi kullanılmakta, ikincisinde ise tek primer ve RE. kullanılmaktadır [23].

1.3.1 Rastgele ogaltılmis Polimorfik DNA (RAPD-PCR)

PCR teknolojisinin kesfinden sonra DNA polimorfizmini meydana çıkarmak için geliştirilen moleküler markörlerden biri de Rastgele ogaltılmis Polimorfik DNA (RAPD) markörleri olarak Williams ve arkadaşları (1990) tarafından tanımlanmıştır. RAPD markörleri tek oligonükleotitlerin rastgele dizilerinin primer olarak kullanıldığı PCR yöntemiyle ortaya konulmuştur [24].

Bu teknikte; rastgele nükleotid dizisine sahip 10 bazdan olusan tekli primerler genomik DNA nin esitli bölgelerinin ogaltılmasında kullanılır.

Bu ogaltma işleminde özetle;

Öncelikle DNA izole edilerek saf hale getirilir.

1- Sıcaklık 95°C ye yükseltilerek DNA denatüre edilir.

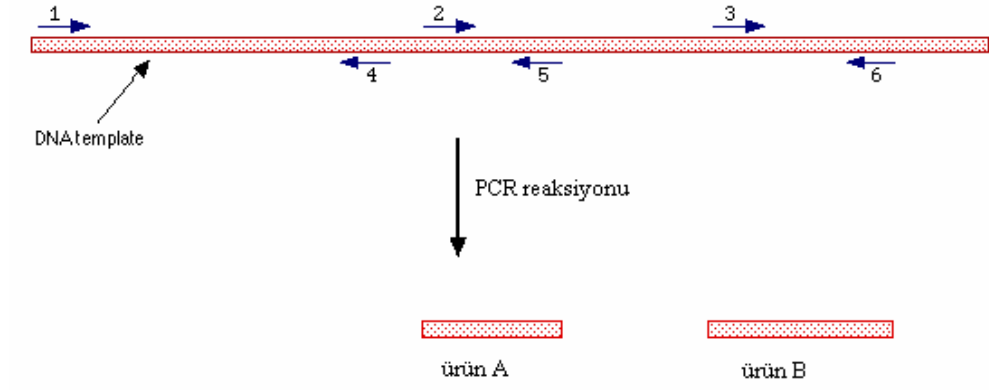
2- DNA ogaltımında genomik DNA nin belli bölgelerinde homolog olan primer dizileri (tek iplikli diziler) DNA sentezini başlatmada rol oynar.

3- Yüksek sıcaklıkta aktif olan *Taq* polimeraz enzimi ile iki primer bölgesi arasında kalan DNA bölgesi ogaltılır.

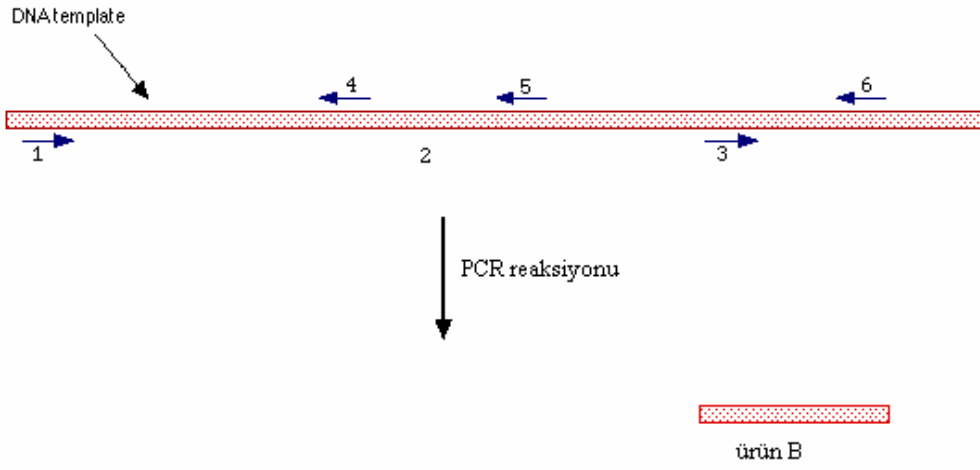
4- Reaksiyon sonunda elde edilen ürünler, ethidium-bromid ile boyanmış jelde yürütülerek DNA fragmentleri UV altında incelenir [25].

RAPD-PCR yönteminde primerlerin genomik DNA'ya bağlandığı bölgelerdeki nokta mutasyonları ile bu bölgeler arasındaki inversiyon ve delesyon gibi mekanizmalar polimorfizmin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır [26].

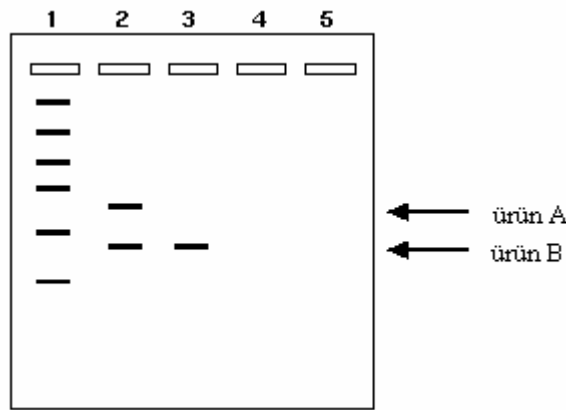
RAPD tekniğinde, primer bağlanma bölgelerinin bir genom boyunca rastgele dağılmış olduğu düşünülür ve bu bölgelerdeki polimorfizm farklı amplifikasyon ürünlerinin oluşmasıyla sonuçlanır (Şekil.1.4) ve bir tür parmak izi oluşturur. Bu da tür içi ve türler arası benzerlik ölçümünün hesaplanmasında RAPD verileri için en çok kullanılan yaklaşım olarak ortaya koyar.



a.



b.



c.

[avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/ project/archives/onions/rapid.html](http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapid.html) - 4k -

Sekil.1.4. RAPD yöntemi ve oluşan bantların jeldeki görüntüsü **a.** 1. türe ait RAPD reaksiyonu **b.** 2. türe ait RAPD reaksiyonu **c.** Oluşan RAPD reaksiyonları sonucunda oluşan bant görüntüleri

1.3.1.1. RAPD-PCR Optimizasyonu

Her PCR reaksiyonu için gerektiği gibi sağlıklı ve net ürün almak için RAPD primerlerin çalıştığı en uygun koşulların tespit edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple PCR reaksiyonunda kullanılan öğeler optimize edilir.

Enzim Konsantrasyonu; *Taq* DNA polimeraz için tavsiye edilen konsantrasyon, öteki bileşenlerin optimum olması durumunda 100µl reaksiyonda 1-2,5 ünite arasındadır [27]. Aslında enzim ihtiyaçları kalıp veya primerlerle ilgili olarak değişiklik kazanabilir. Bir PCR'i planlarken her 100 ml de 0,5-5 ünite arasındaki enzim konsantrasyonları denenerek sonuçlar jel elektroforezinde incelenmiştir. Eğer enzim konsantrasyonu çok yüksekse özgün olmayan ürünler birikir, eğer çok düşükse istenen üründen yetersiz sayıda değişik miktarda oluşur [28].

Deoksiniükleotit Trifosfatlar; stok dNTP konsantrasyonları'nın değeri pH 7.0 olmalı ve konsantrasyonlar spektrofotometre ile belirlenmelidir. 5-10 mM dNTP içeren stok çalışmaları önerilir. 20-200 µM arasındaki nükleotid konsantrasyonlarında ürün miktarı, özellik ve doğruluk açısından optimal denge ile sonuçlanır. PCR'in özelliği ve doğruluğu orijinal Klenow aracılığıyla, PCR her biri 1,5 mM altında dNTP konsantrasyonu kullanılmasıyla artışı gösterir. Düşük dNTP konsantrasyonu hedef olmayan yerlerde yanlış primer seçimini minimuma indirir ve yanlış birleşim nükleotidlerin çoğalma ihtimalini azaltır. Hedef dizinin konsantrasyonu ve uzunluğu için uygun olan düşük dNTP konsantrasyonuna karar verilir [28].

Magnezyum Konsantrasyonu; primerlerin birleşmesinde, PCR ürünleri ve kalıp DNA ipliklerinin ayrılma sıcaklığında yabancı primer-dimer oluşumuna, enzim aktivitesine ve doğruluğuna etki eder. PCR'da Mg² miktarı toplam dNTP konsantrasyonunun 0,5-2,5 mM üzerinde olmalıdır [28].

Diğer Reaksiyon Komponentleri; PCR için önerilen tampon 10-50 mM Tris-HCL (pH 8.3-8.8)'dür. Bununla birlikte diğer tamponların kapsamlı incelenmesi yapılmamıştır. Primerin DNA ipliğine birleşmesini kolaylaştırmak için reaksiyon karışımına 50 mM'e kadar KCL eklenebilir. 50 mM altında NaCL veya 50 mM üzerinde KCL *Taq* polimeraz aktivitesini inhibe eder. Tween 20, Laureth 12, gelatin

veya bovine serum albumin (100 µ/ml) ve iyonik olmayan deterjanlar enzimi dengede tutar [28].

Tipik RAPD primerler 10 nükleotid uzunluguna sahiptirler Primerlerin DNA ipligine birlesmesi (Primer Annealing) için gereken sicaklik ve süre, primerlerin konsantrasyonuna, uzunluguna ve baz kombinasyonuna baglidir. Uygun birlesme sicakligi primerlerin gerçek erime derecesinin (T_m) 5°C altındadır. Genellikle RAPD primerler kısa oldugundan 35-42 °C de birlesme sicakliklari en iyi sonucu verir. Tipik primer konsantrasyonlarında (0,2 µM) birlesme, sadece birkaç saniye ister. Birlesme sicakliginin artmasi yanlis birlesen primerlere karsi ayrimi artirir ve primerlerin 3'ucundaki yanlis nükleotid büyümesini azaltir. Bu yüzden birlesme sicakligi ilk önce bazi devirler esnasında özelliklerin artisina yardım eder. İlk devirde maksimum özellik için *Taq* DNA polimeraz primer baglanması esnasında denatürasyon adimından sonra eklenebilir [28].

Primer uzama zamanı hedef dizinin uzunluğu, sicakligi ve konsantrasyonuna göre değişir. Genellikle 72 °C'de primer uzamalar gerçekleşir. 72 °C'de bir dakikalık uzama zamanı 2 kb uzunluguna kadar olan ürünler için yeterli olmaktadır [28].

PCR'in yetersizligi için en büyük sebep, kalıp DNA ve PCR ürünlerinin eksik denatürasyonudur. Genelde 95°C'de 30sn tipik olarak denatürasyon için yeterlidir. Eksik denatürasyon DNA tortularının geri yükselmesine ve bu sebeple de ürün veriminin düşmesine neden olur. Tam tersi olarak da çok yüksek ve çok uzun denatürasyon da gereksiz yere enzim aktivitesinin kaybına neden olur [28].

PAPD-PCR'da optimum devir sayısı diğer koşullar optimize edildiğinde hedef DNA'nın başlangıç konsantrasyonuna oldukça baglidir. Genel hata çok fazla uygulanmasıdır. Gereğinden fazla devir, spesifik olmayan yan ürünlerin miktarını ve karışıklığını artırabilir ve çok az devirde düşük ürün verimine neden olur. RAPD-PCR'da sıklıkla kullanılan devir sayısı 40-45'tir [28].

Bir RAPD reaksiyonunda 0.1 ve 0.5 µM arasında primer konsantrasyonları genellikle optimaldir. Yüksek primer konsantrasyonlarında beklenen ürünler elde edilemez yerine primerlerin kendi aralarında birlesmesinden oluşan primer-dimer yapıları meydana gelir [28].

1.3.1.2. RAPD Markörlerinin Avantajları Ve Dezavantajları

RAPD markörler nisbeten ucuz olması, çok fazla sayıdaki genetik lokusları rastgele örnekleme ve primer dizaynı için nükleotid dizi bilgisine ihtiyaç olmaması ve az miktarda DNA kullanımını gerektirmesi nedeniyle genetik varyasyon çalışmalarında, sistematik için DNA-temelli karakterlerin belirlenmesinde oldukça yoğun talep görmektedir ve herhangi bir taksona kolayca uygulanabilir [29]. RAPD tekniği; genomun moleküler karakterizasyonunu, dizileme, klonlama gerektirmemesi ve az miktarda DNA ya ihtiyaç duyulması nedeniyle basit ve hızlıdır [30,24].

Radyoaktif olmayan ve basit bir deneysel kurulumu gerektiren bir tekniktir. RAPD'de kullanılacak uygun kısa primerler ticari olarak elde edilebilir. Bir termal döngü cihazı, agaroz jel düzeneginden başka özel bir ekipman gerektirmez [31].

Genetik haritalamada kullanılan RAPD tekniği diğer tekniklere göre; türlerin yabancı bir varyetesinde genomik analiz için evrensel set durumundaki primerlerle çalışılması, klonlanmış DNA problemlerinin izolasyonu, hibridizasyon için filtrelerin hazırlanması veya nükleotit sıralanması için ön hazırlık çalışması gerektirmemesi, her bir RAPD markörünün grup araştırma programlarında bilgi transferini kolaylaştıran dizi etiketli bölgeye karşılık gelmesi ve genotip saptamasını otomatik olarak yapabilmeleri nedeniyle avantajlı bir metottür [32].

Bununla beraber, RAPD markörlerinin en büyük dezavantajı bu markörlerle yapılan PCR'in ortam şartlarındaki ufak değişikliklerden çok kolay etkilenmesidir. $MgCl_2$, DNA, gibi reaksiyon bileşenlerine ve döngü sıcaklıklarına hassas olmasıdır. Bu hassaslık yeniden üretilebilirlik olayını RAPD analizlerinde onaylanmış bir problem haline getirmektedir. RAPD'le yapılan bir deneyin her tekrarında aynı sonuçların elde edilebilmesi için bir deney prosedürünün titiz ve katı bir şekilde standartlaştırılması ve optimizasyonu gereklidir. Tüm PCR analizlerinde olduğu gibi, DNA kontaminasyonu ve jel sistemlerinden kaynaklanan sorunlar da RAPD-PCR'da bir problem olarak karşımıza çıkabilir [33].

Dolayısıyla elde edilen ürün profilinin karşılaştırılan gruplardaki genetik farklılıktan mı yoksa ortam şartlarından mı kaynaklandığından emin olmak zordur. Bu sebeple her markör için yapılan PCR'in birkaç kez tekrarlanması ve hepsinden aynı

sonucu elde ettikten sonra veri degerlendirmesine geçilmesi uygundur. Bununla beraber, kisitlamalar göz önünde tutulduğu ve teknik uygun bir şekilde kullanıldığı zaman RAPD ilk baslayanlar için bile çok hızlı, kolay elde edilebilen ve tekrarlanabilir sonuçlar verecektir

1.3.1.3 RAPD Verilerinin Analizi

RAPD veri analizinin ilk adımı PCR ürününün varlığı veya yokluğunun sayılması ya da PCR ürününün yoğunluğunun hesaplanması arasında seçim yapılmasını gerektirir [34]. RAPD verileri genellikle ürünlerin varlığı/yokluğu temeline dayanarak sayılır, çünkü ürünlerin yoğunluk farklarını belirlemek zordur [35].

RAPD profilinin tutucu bir şekilde değerlendirilmesi önerilir [36]. Buna göre sadece sınırlı büyüklük aralığındaki PCR ürünleri sayılmalı, sadece yüksek yoğunluktaki ürünler değerlendirilmeli, çünkü bunlar genellikle düşük yoğunluktaki ürünlere kıyasla daha fazla çoğaltılır. Ayrıca, monomorfik büyük ve küçük ürünler tarafından sınırlandırılmış bölgedeki ürünler sayılarak RAPD amplifikasyonunun kalitesi belirlenmelidir. DNA'nın tekrar izolasyonu, PCR reaksiyonları ile RAPD amplifikasyonlarının tekrarlanması ve RAPD ürünlerinin aynı şekilde çoğaltıldığına denetlenmesi için uygun kontrollerin PCR çalışmasına dahil edilmesi ve kontaminasyonun olmaması RAPD verilerinin güvenilirliğini daha da artırır [36].

Jel çözünürlüğü genellikle standart tip agarozda düşüktür, bu tip jellerde farklı büyüklükteki ürünler aynı pozisyona göç edebilir. Daha detaylı veri toplamak için Southern blot ve restriksiyon deneyleri önerilmektedir. RAPD verileri sayıldıktan sonra deneyin dizaynına bağlı olarak verileri analiz etmek için genelde 3 yöntem kullanılır: Benzerlik ölçümü, karakter ölçümü, sıklık ölçümü.

RAPD verileri için en çok kullanılan yaklaşım benzerlik ölçümünün hesaplanmasıdır. Bu da 3 yolla yapılır.

1- Basit uyumluluk katsayısı kullanılarak yapılır; bu iki farklı RAPD profili arasındaki paylaşılan PCR ürünlerinin varlığı ve yokluğu oranını ölçer [37].

2- Jaccard'ın katsayısıdır; varolan ortak ürünlerin oranını ölçer [38].

3- Nei ve Li katsayisidir; bir örnekte çoğaltılmış ayrıca başka bir örnekte de çoğaltılabilecek ürünlerin olasılığını ölçer. Bu yöntemde karşılaştırması yapılan her iki fenotipin tasıdığı ortak bant sayısının iki katı yine her iki fenotipin toplam bant sayısına bölünür. Bu üç yöntemin veri analizinde kullanılmalarının avantajı hepsinin istatistiksel özelliklerinin iyi anlaşılmasıdır [39].

1.3.1.4. RAPD'lerin Kullanım Alanları

RAPD markörler, çok geniş aralıktaki sistematik problemlerin incelenmesi için geliştirilmiş hızlı, güvenilir ve kolaylıkla kullanılabilen DNA temelli bir teknolojidir. RAPD'ler ile ilgili problemlerin çoğunun, çoğalma ve ürün homolojisiyle ilgili problemler olduğu özetlenebilir. Eğer bunların üstesinden başarılı bir şekilde gelinirse, RAPD'ler takson sınırlandırılması, hibridizasyon, genetik çeşitlilik ve filogenetik yapıyı anlamayı da kapsayan çok geniş çaptaki sistematik problemler için etkili ve kullanışlı bir araç olabilir. Bu yolla farklı taksonomik seviyedeki bitki grupları arasında ve içindeki çeşitliliğin derecesi hakkında değerli bilgiler elde edilebilir. Metot, genom üzerinde rastgele dağılmış DNA verisi oluşturduğundan RAPD markörler, aynı türler arasındaki farklılaşma, hibritleşme ve çeşitliliğin belirlenmesini içine alan çalışmalar için de çekicidir [40]. RAPD'ler birbirleri ile yakından ilişkili türler arasında ya da tür içindeki araştırmalar için kullanışlıdır. RAPDlerin rastgele doğasının anlamı bunların bir tür üzerinde türün DNA dizisi bilgisine gerek duymaksızın kullanılabilmesidir. RAPDler tür içi genetik çeşitlilik çalışmalarında, yakın akraba türlerin akrabalık derecesinin belirlenmesinde, tür içindeki genotiplerin belirlenmesinde, kültüre alınan bitkilerin kimliklerinin saptanmasında [41] ve aseksüel yolla üretilmiş bitki klonlarıyla yapılan zirai ve ekolojik amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır [42].

Ayrıca RAPD tekniği, alt tür ve varyete seviyesinde bitki taksonomik akrabalıklarının açıklığa kavuşturulmasında yaygın olarak kullanılmıştır [43,44]. Bu tür çalışmalarda RFLP ve allozim markörleri ile yapılan ve direkt olarak heterozigotluluğun tahminine izin veren tekniklerden elde edilen verilerle, RAPD tekniğiyle toplanan verilerin çoğu durumda tutarlılık sergiledikleri de bulunmuştur [45,46].

1.4. Konu Ile Ilgili Yapilmiş Çalışmalar

Asma bitkisine ait 7 aday çesit ve 8 yeni çesit ile bunların toplam ebeveynlerinin genetik özellikleri yönünden karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bu amaçla moleküler yöntemlerden RAPD-PCR tekniği kullanılmış, 20 farklı primer ile 30 çesit ve çesit adayının birbirleri ve ebeveynleri ile farklı düzeylerde oluşturdıkları genetik benzerlik oranları ortaya konularak, tanımlamaları yapılmıştır [47].

Tipulidae familyasına ait 10 tür içerisinde RAPD-PCR tekniği ile türler arası ve tür içi genetik varyasyon belirlenmiştir. Yapılan alışma RAPD-PCR tekniğinin türler arası ve tür içi varyasyonların belirlenmesinde faydalı olabileceğini göstermiştir.

Nohutlarda solgunluga neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*'nin Türkiye'deki mevcut patotipleri rastgele oğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi ile saptanmıştır [48].

Karayemis (*Laurocerasus officinalis* Roem.) bitkisinin üç kültür tipi ve bir yabancı formu, daha önce morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılarak yapılan ayırımın doğru olup olmadığını anlamak için, aralarındaki ilişki RAPD markörleri ile çalışılmıştır. 14 random primer ile kültür formları ve yabancı form tamamen birbirinden ayrılmıştır. RAPD verileri ile elde edilen polimorfizm, kültür tipi ve yabancı form arasında daha önceden yapılan sınıflandırmayı doğrulamıştır [49].

Ülkemizin değişik bölgelerinden sağlanan tohumlardan çoğaltılan 17 idris (*Prunus mahaleb* L.) bitkisinde DNA polimorfizmi araştırılmıştır. RAPD tekniğinde kullanılan 15 primerden polimorfizme ulaşılmıştır. Çalışma sonucunda, türde RAPD düzeyinde polimorfizm gösteren primerler tespit edilerek, DNA düzeyinde yürütülecek bundan sonraki araştırmalar için temel optimizasyon koşulları belirlenmiştir [50].

Lens genusunda RAPD markörleri kullanılarak tür içi ve türler arası genetik varyasyonu ve genetik akrabalıkları çalışılmış. Sonucunda kültür mercimeğinin alt tür içi varyasyonlarının düşük, kültür mercimeği ile karşılaştırıldığında yabancı türlerde daha fazla polimorfizm saptanmıştır. Yapılan alışma ile, yabancı esitlerden *L.c.ssp. orientalis*'in kültür esitlerine en yakın tür olduğu ve kültür mercimeğinin atası için bir aday olduğu ortaya çıkartılmıştır [51].

RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) tekniği kullanılarak, ülkemizde yetisen fındık çeşitlerinden seçilmiş olan üç çeşide (Kalinkara, Palaz ve Tombul) ait tiplerin genetik benzerlikleri çalışılmıştır. Çeşitlerin kendileri arasındaki genetik ilişkiler belirlenmiştir[52].

Kara limon ve İtalyan memeli limon çeşitleri arasında mevcut çeşit karmaşasını çözmek için bu iki bitkinin DNA izolasyonu yapılarak, RAPD tekniği kullanılmış ve 49 RAPD primeri ile bitki genomları taranmıştır. Yapılan çalışma sonucunda bu iki limon çeşidinin aynı orijinden geldiği ancak farklı ekolojik koşullarda zaman içerisinde genomlarında değişiklik olduğu ve Kara limon ile İtalyan Memelinin aynı hatlar olmadığı ortaya konulmuştur [53].

Xantosoma sp. Türünün 18 kültür çeşidi RAPD analizi ile değerlendirilmiştir. 7 random primer toplam 40 banttandır 11'i tüm RAPD primerler için özdes bant profili olmuştur. RAPD bantlarının varlığı ve yokluğu temel alınarak bir benzerlik matrisi oluşturulmuştur. Kokoyem kültürleri arasındaki genetik benzerlik, 0.86 ile 0.97 arasında bulunmuş ve oluşturulan dendrogramla kültürlerin iki kümede toplandığı görülmüştür [54].

Türkiye kökenli yabancı arpa hatları (*Hordeum murinum*, *Hordeum bulbosum* ve *Hordeum vulgare spontaneum*) arasındaki çeşitlilik moleküler düzeyde RAPD tekniği kullanılarak karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Hatlar arasındaki en yüksek polimorfizm oranı % 60 olarak bulunurken, en düşük polimorfizm oranı %3 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, ekonomik öneme sahip karakterleri (hastalıklara, kuraklığa dirençlilik vb.) taşıyan yabancı arpa hatlarının RAPD markörleriyle belirlenebileceğini göstermiş ve bu hatların kullanımıyla da yüksek kaliteli arpa kültürlerinin geliştirilmesinin mümkün olabileceği ortaya konulmuştur [55].

Cucumis melo (kavun)'daki DNA polimorfizmi RFLP'ler ve RAPD'ler kullanılarak değerlendirilmiştir. Faklı kavun tiplerini temsil eden 13 tür, 18 RAPD primeri kullanarak incelenmiştir. Kümeleme analizi kavun türleri arasındaki en büyük farklılığın Hindistan kavunu ve Kuzey Amerika ile Avrupa'nın kokulu kavunu arasında ortaya çıktığını göstermiştir [56].

RAPD-PCR tekniği kullanılarak yapilmis diğer bir çalışma da, *Stenbergia* (*Amaryllidaceae*) türleri arasinda polimorfizm ve filogenetik iliskilerin belirlenmesi üzerine yapılmıştır. *Stenbergia* cinsi Türkiye’de 6 tür (*S.lutea* ve *S.sicula*, *S.colchiflora*, *S.fischeriana*, *S.candida* ve *S.clusiana*) ile temsil edilir. Bu türleri birbirinden ayirt etmek için rastgele oğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmıştır ve sonuçta *S.lutea* ve *S.sicula* türlerinin birbirinin aynı olduğu görülmüstür [57].

Pyrus communis L. Türüne ait *William*, *Passa crassana* ve *Conference* kültür Çesitlerinin genotip tanımlanması RAPD primerler kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada kullanılan 32 primerden çok azı *William* kltvarını, *Passa crassana* kltvarından ayirt edebilmıştir. Sadece bir primer açık bir şekilde 3 kültür çesidi arasındaki farklılığı ortaya çıkartmıştır. Bu alışma ile RAPD markörlerin kültürle çoğaltılan bitkilerin taranması ve patentlesmesinde etkili bir yöntem olduğu gsterilmıştir [58].

1.5. Tez alışmasının Amacı

Bu çalışmanın amacı; Akdeniz Bölgesi’nde P-3165, P-3394, Vero, Luce ve OSSK-596 ticari mısır (*Zea Mays*) Çesitlerinin RAPD markörlerle aralarındaki benzerlik oranlarının genetik düzeyde incelenmesi, kümeleme analizi ile benzerliklerine göre gruplandırılması, bu sayede piyasada farklı isimler altında satılan bu mısır Çesitlerinin gerçekte de birbirinden farklı olup olmadığını anlamak ve bu esitler arasında moleküler düzeydeki çalışmalar için, polimorfizmi belirlemeyi sağlayan ve esitlere özgü tanımlayıcı olan primerleri tespit etmektir.

2. MATERYAL METOD

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada bitki materyali olarak Çukurova Tarımsal Araştırma Merkezi'nden temin edilen 5 ticari mısır çeşidi kullanıldı. Bu çeşitler P-3165, P-3394, OSSK-596, Vero ve Luce çeşitleridir. Bu mısır tohumlarından Vero ve Luce çeşitleri Pan tohum ve islah A.S. tarafından, P3165 ve P3394 çeşitleri Pioneer tohumculuk A.S. tarafından, OSSK-596 çeşidi ise Tareks tarım ürünleri araç gereçleri ithalat ve ihracat A.S. tarafından üretilmektedir.

2.2. Tohum Çimlendirme

Her bir mısır çeşidi için 15-20 tohum humuslu hazır toprak içeren saksılarda oda sıcaklığında 9 saat gündüz/ 15 saat gece fotoperiyotunda çimlendirildi. Fideler yaklaşık 10-15cm olduğunda genç yapraklar demetlenerek uçlarından 1cm kesildi, kesilen örnekler alüminyum folyoya sarılıp etiketlenerek derin dondurucuda (-80°C'de) saklandı.

2.3. Bitki Materyallerinden DNA İzolasyonu

Mısır bitkisinden toplam DNA'nın izolasyonu klasik bitki DNA izolasyon metodlarından CTAB metoduna [59] göre yapıldı. Buna göre,

- Mısır bitkisinin yaprakları (~1 gr) havan ve tokmak yardımıyla sıvı azot içinde ince pudra haline gelene dek öğütüldü. Öğütülen bitki materyali spatül yardımıyla santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Tüpün içine, aktarılan örnekle aynı volümde sıcak CTAB tamponu (2% CTAB w/v, 20 mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% PVP, 100 mM Tris, pH 8.0) eklendi.
- Karışım 65°C'ye ayarlı su banyosunda 30dk bekletildi.
- Daha sonra 1 volüm kloroform/ isoamil alkol (24:1) ya da kloroform ilave edilerek karıştırıldı.

- Santrifüj tüpündeki karışım 10 dk 7.500 rpm’de santrifüjlendi. Üstteki sulu kısım mikropipet yardımıyla yeni bir tüpe aktarıldı.
- Eger aktarılan sulu faz bulanık görünüyorsa, kloroform/isoamil alkol basamağı ve santrifüjleme tekrar edildi.
- Santrifüjlemeden sonra tüpün üst kısmındaki sulu kısım, supernatant, yine temiz bir tüpe aktarıldı ve tüp içine aynı oranda -20°C’deki isopropanolden eklendi. Tüp karıştırılarak -20°C’de en az 30dk, en fazla bir gece bekletilerek DNA’nın çökmesi sağlandı.
- Bunu izleyen santrifüjleme (10.000rpm’de 10dk) ile oluşan DNA pelleti %70’lik etanol ile yıkandıktan sonra kurutuldu ve 50-100µl TE tampon (Çizelge 2.1) içinde çözündürüldü.

Çizelge.2.1. DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar

Solüsyon Adı	İçerik	Konsantrasyon
İzolasyon tamponu (2X)	CTAB	%2 (w/v)
	PVP	%1 (w/v)
	Tris-HCl	100 mM
	EDTA	20 mM
	NaCl	1.4 M
TE tamponu (pH. 8)	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1 mM

2.4. DNA Miktar Tayini

Bitki örneklerinden elde edilen DNA’lar Nanodrop spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında okunarak miktar ve saflık dereceleri belirlendi. PCR analizi için kullanılmak üzere seçilen DNA örneklerinin miktar tayinleri çizelge halinde verildi (Çizelge.3.1).

2.5. RAPD-PCR'da Kullanılan Primerler

5 ticari mısır çeşidinin çalışıldığı RAPD-PCR analizinde, Qiagen Operon GMBH firmasından temin edilen Kit OPAB'nin içerdiği 10-mer (10 adet nükleotid dizisinden oluşan) primerler kullanıldı. Bu primerlerin nükleotid dizileri ve moleküler ağırlıkları Çizelge 2.2'de verilmistir.

Çizelge.2.2. PAPD-PCR'da kullanılan primerler

Kodu	5'-3'Nükleotid sırası	Moleküler ağırlık	pmoles	µg/tüp
OPAB-1	CCGTCGGTAG	3035	5495	16
OPAB-2	GGAAACCCCT	2988	5194	15
OPAB-3	TGGCGCACAC	3004	5379	16
OPAB-4	GGCACGCGTT	3035	5495	16
OPAB-5	GGCACGCGTT	3013	5058	15
OPAB-6	TGGCGCACAC	3090	5194	16
OPAB-7	GTGGCTTGGA	2988	5194	15
OPAB-8	GTAAACCGCC	3019	5302	16
OPAB-9	GGGCGACTAC	3044	5160	15
OPAB-10	TTCCCTCCCA	2890	6527	18
OPAB-11	GTGCGCAATG	3059	5090	15
OPAB-12	CCTGTACCGA	2979	5533	16
OPAB-14	AAGTGCGACC	3028	4990	15
OPAB-15	CCTCCTTCTC	2881	7072	20
OPAB-16	CCCGGATGGT	3035	5495	16
OPAB-17	TCGCATCCAG	2979	5533	16
OPAB-18	CTGGCGTGTC	3026	5876	17
OPAB-20	CTTCTCGGAC	2970	5919	17

Yalnızca isaretlenmiş primerler tekrar edilebilir bant oluşumu göstermişlerdir

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA ogaltılması

PCR amplifikasyonları; 25µl'lik reaksiyon volümlerinde gerçekleştirildi. Her bir reaksiyon volümü; 16.5µl deionize su, 2.5µl tampon (10x), 2µl MgCl₂ (25mM), 0.5µl dNTP (10mM), 2µl primer (Çizelge.2.2), 200ng DNA, 0.5µl enzim (*taq* polimeraz) içermektedir (Çizelge.2.3). Her primer için yapılan reaksiyonlar en az iki kez farklı zamanlarda tekrar edilerek tekrarlarında aynı bant profilini oluşturan primerler analiz için seçildi.

PCR işlemi Techgene (Techne Ltd.) PCR aygıtı kullanılarak yapıldı. PCR aleti, 94°C'de 3dk (başlangıç denatürasyon basamağı) ile 94°C'de 30sn (denatürasyon), 36,5°C'de 1dk (primer bağlanma) ve 72°C'de 1dk (primer uzama) siklusu ve 72°C'de 8dk son uzatma basamağını gerçekleştirmek üzere programlandı (Çizelge.2.4). PCR ürünleri agaroz jelde kosturulana kadar +4°C'de saklandı.

Çizelge.2.3. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler

Madde Adı	İçerik	Konsantrasyon (25µl için)
Distile su	-	-
10x PCR tamponu (MBI Fermentas)	Tris-HCl (100mM) K-Cl (500mM) Nonided P 40 (0,81mM) (pH 8,8 25 °C'de)	10 mM 50 mM % 0,08 (w/v)
MgCl ₂ (25 mM) (MBI Fermentas)	-	2 mM
dNTP karisimi (MBI Fermentas)	dATP (10 mM) dTTP (10 mM) dCTP (10 mM) dGTP (10 mM)	200 µM
Primer (Operon)	-	10 pmol
Genomik DNA	-	200 ng
Taq Polimeraz enzimi (5 U/µl) (MBI Fermentas)	-Taq Polimeraz	2,5 Ünite

Çizelge.2.4. RAPD PCR'da Kullanılan Termal Döngü Programı.

Sıcaklık	Süre	İşlem	Döngü Sayısı
94 °C	3 dk	Ön denatürasyon	1
94 °C	30 sn	DNA denatürasyon isisi	40
36,5 °C	1 dk	Primer bağlanma isisi	
72 °C	1 dk	Ürün sentezi isisi (Amplifikasyon)	
72 °C	8 dk	Son uzama basamağı	1

2.7. DNA ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Misir çeşitlerinden elde edilen DNA'lar %0.8'lik (w/v) agaroz (Sigma) jellerde, PCR ürünleri ise %1.4'lük (w/v) agaroz jellerde mini yatay elektroforez kiti (Thermo Ltd.) kullanılarak kosturuldu. Agaroz jeller 0.5X TBE tampon solüsyonu (0.445 M Tris, 0.445 M Borik asit, 0.01 M EDTA (pH 8.0) ile hazırlandı. Ayrıca her agaroz jeline katılmadan önce $0.5\mu\text{g ml}^{-1}$ oranında etidyum bromid ilave edildi. 0.5X TBE solüsyonu elektroforez tanklarında tampon olarak kullanıldı.

DNA örnekleri jelde 20 dk, 100V'da, PCR örnekleri ise 30-40dk. 80V'da kosturulduktan sonra UV kutusu üzerinde incelendi. Etidyum bromid sayesinde görünür hale gelen DNA bantları Uvitec marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

3. SONUÇLAR VE TARTISMA

3.1. Sonuçlar

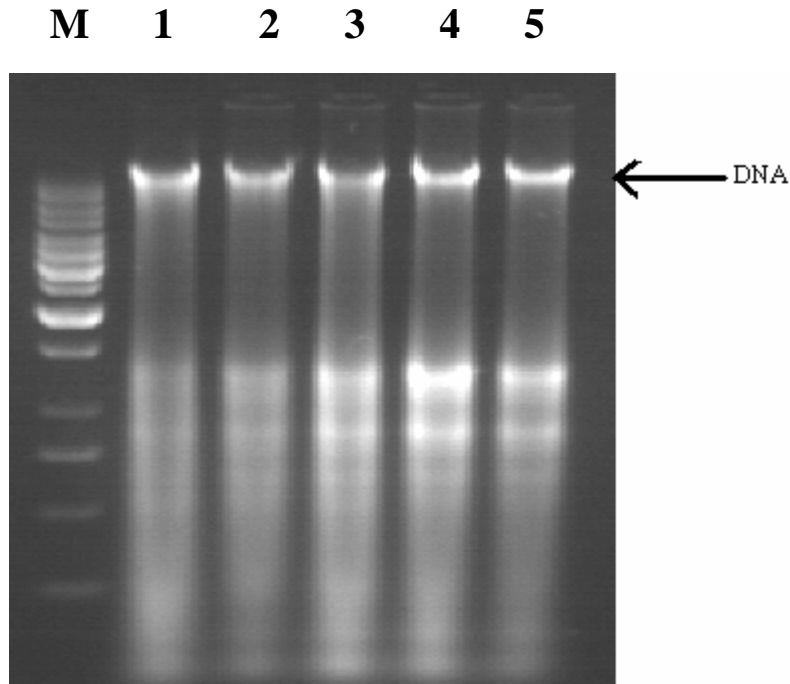
3.1.1. Misir esitlerinde DNA izolasyonu

Pan Tohum Islah ve Üretim A.S. tarafından üretilen Vero ve Luce, Pioneer Tohumculuk A.S. tarafından üretilen P3165 ve P3394, Tareks Tarım Ürünleri Araç Gereç İthalat İhracat ve Ticaret A.S. firmalari tarafından üretilen OSSK-596 esitlerine ait tohumlar imlendirilerek, fidelerden alınan örneklerle DNA izolasyonu yapıldı (bkz.2.3). DNA izolasyonunda klasik bir yöntem olan ve arastirmacilar tarafından siklikla kullanılan CTAB yöntemi [60] kullanildi. DNA örneklerinin miktar tayinleri nanodrop spektrometre'de okundu (izelge.3.1).

Çizelge.3.1. Zea mays'a ait 5 fakli esidin DNA'larinin spektrofotometre ölçüm sonuçlari

esitler	A ₂₆₀ (ng/µl)
Vero	445,7
Pioneer 3165	441,5
Pioneer 3394	529,1
Tareks OSSK 596	319,4
Luce	555,3

RAPD-PCR yönteminde kullanılacak DNA örneklerinin kaliteleri agaroz jel elektroforezi yapılarak belirlendi (Sekil.3.1). DNA örneklerinin yüksek moleküler ağırlığa sahip tek bir bant olarak jelde tespit edilmesi bu örneklerin PCR reaksiyonunda kullanılabilir kalitede olduğunu göstermektedir.



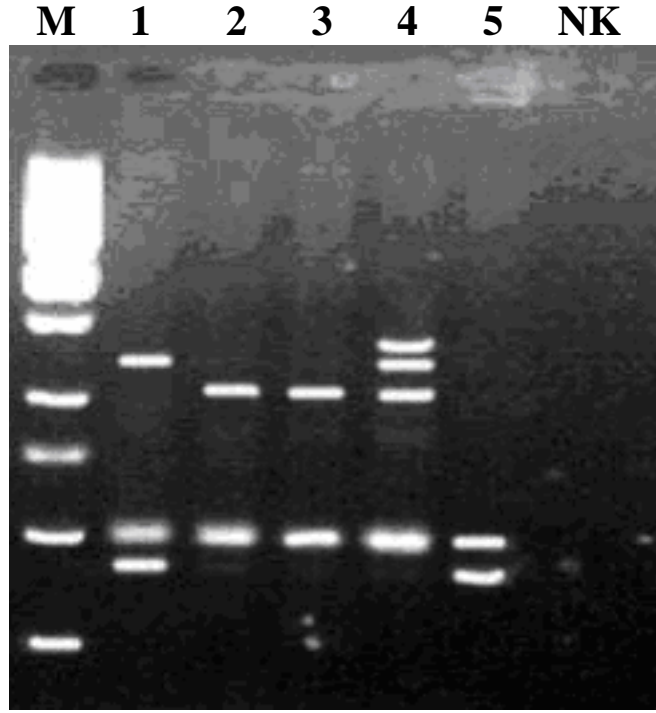
Sekil.3.1. *Zea mays*'a ait 5 ticari çesidin DNA görüntüleri M-1kb DNA Ladder 1-Vero 2- P-3165 3- P-3394 4- OSSK-599 5- Luce

3.1.2. RAPD-PCR

P-3165, P-3394, OSSK-596, Vero ve Luce mısır çeşitlerine ait DNA örnekleri ile 10 baz uzunluğuna sahip RAPD primerleri (bkz.çizelge.2.3) kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Her bir primerle yapılan PCR reaksiyonu en az iki defa tekrar edildi ve her tekrarda ilgili primerin aynı bant profilini verip vermediği kontrol edildi. Denenen primerlerden OPAB-1, OPAB-2, OPAB-3, OPAB-5, OPAB-9, OPAB-11, OPAB-14, OPAB-17, OPAB-18, primerleri kullanılan 5 mısır çeşidi içinde tekrar edilebilir bantlar oluşturdular.

PCR amplifikasyonları; 25µl'lik reaksiyon volümlerinde gerçekleştirildi. Her bir reaksiyon volümü; 16.5µl deionize su, 2.5µl tampon (x10), 2µl MgCl₂ (25mM), 0.5µl dNTP (10mM), 2µl primer, 200ng DNA, 2.5U enzim (*taq* polimeraz) içerecek şekilde hazırlandı. Bütün bu işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi ve enzimin bozulmasını ve hazırlanan karışım içerisinde DNA ile tepkimeye girmesini engellemek için enzim en son aşamada derin dondurucudan çıkartılarak eklendi.

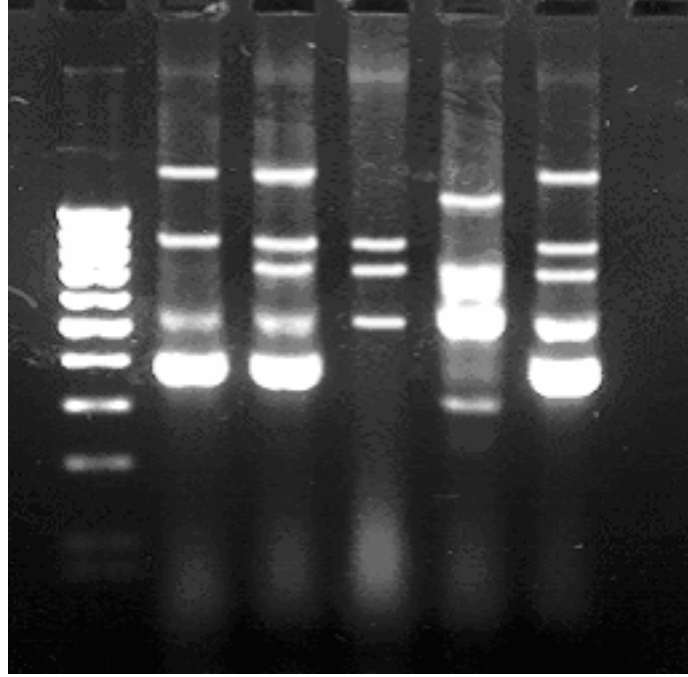
PCR işlemi Techgene (Techne Ltd.) PCR aygıtı kullanılarak yapıldı. PCR aleti, 94°C'de 3dk başlangıç denatürasyon basamağı ile 94°C'de 30sn denatürasyon, 36,5°C'de 1dk primer bağlanma ve 72°C'de 1dk primer uzama siklusları ve 72°C'de 8dk son uzatma basamağını gerçekleştirmek üzere programlandı (bkz. çizelge.2.4). PCR ürünleri yatay elektroforez kiti (Thermo Ltd.) kullanılarak agaroz jel üzerinde ayrıştırıldı ve fotoğrafları çekildi (Şekil 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10).



Sekil.3.2. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB1 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M-** 100 bç DNA Ladder **NK-** Negatif Kontrol **1-** Vero **2-** P-3165 **3-** P-3394 **4-** OSSK-596 **5-** Luce

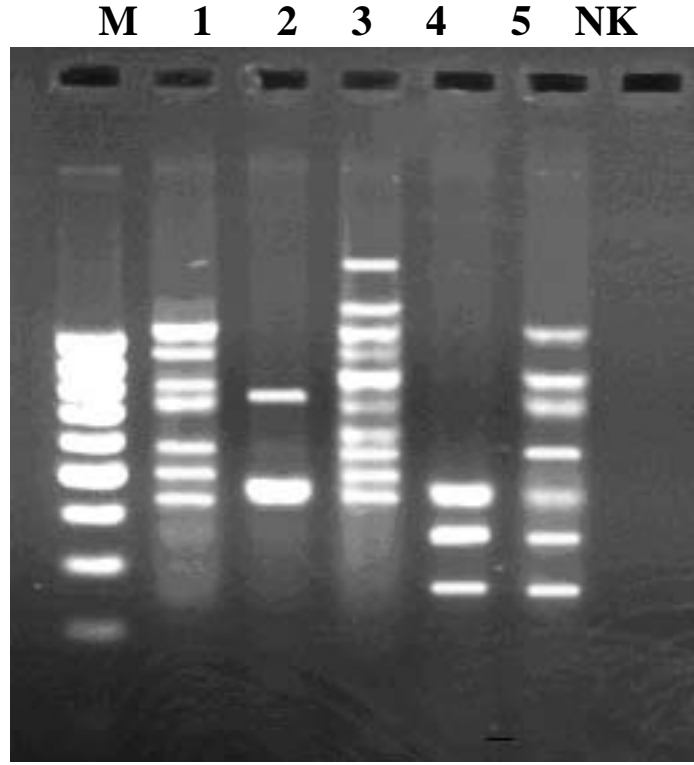
OPAB-1 primeri ile 5 ticari misir çesidinde yapılan RAPD-PCR sonucunda 6 markör bant elde edildi. Bunlardan 1 tanesi (markör bant 5) monomorfik, diger 5 markör bant polimorfikti. Markör bant 1 sadece OSSK-596 çesidinde olustu. Bu OPAB-1 primerinin OSSK-596 çesidini diger 4 misir çesidinden ayirt edilmesinde tanimlayici bir primer olarak kullanilabilecegini göstermektedir.

M 1 2 3 4 5 NK



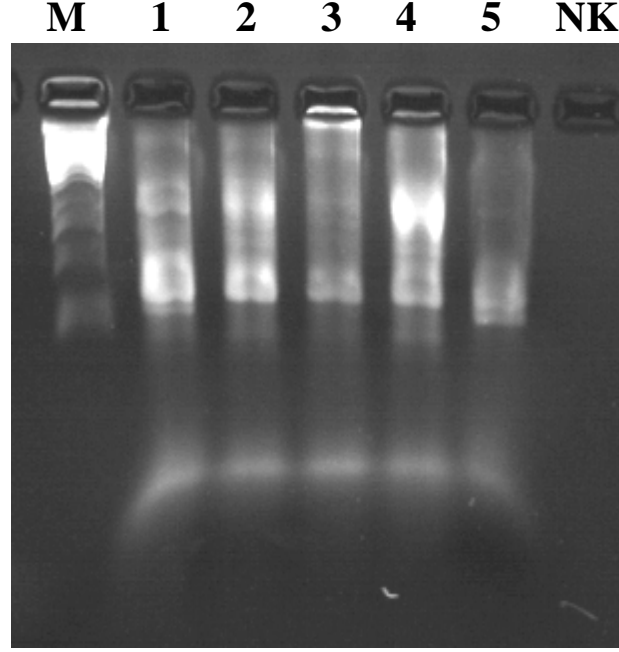
Sekil.3.3. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB 2 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M-** 100 bç DNA Ladder **NK-** Negatif Kontrol **1-** Vero **2-** P-3165 **3-** P-3394 **4-** OSSK-596 **5-** Luce

OPAB-2 primeri ile 5 misir çesidinde yapılan RAPD-PCR sonucunda 7 markör bant elde edildi. Bunlardan 3 tanesi (markör bant; 3, 4, 5) monomorfik, diger 4 markör bant polimorfikti. Markör bant 1 ve 7 sadece OSSK-596 çesidinde gözlendi. Bu sonuç da OPAB-2 primerinin bu 5 misir çesidi içerisinde OSSK-596 çesidinin ayirt edilmesinde tanimlayici bir primer olarak kullanilabilecegini göstermektedir.



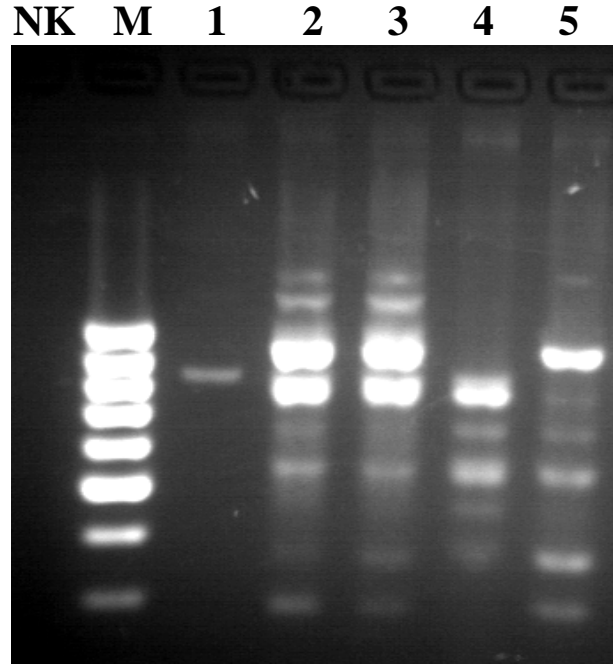
Sekil.3.4. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB 3 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M-** 100 bç DNA Ladder **NK-** Negatif Kontrol **1-** Vero **2-** P-3165 **3-** P-3394 **4-** OSSK-596 **5-** Luce

OPAB-3 primeri ile 5 misir çesidinde yapilan RAPD-PCR sonucunda 14 markör bant elde edildi. Bunlardan 1 tanesi (markör bant 12) monomorfik, diger 13 markör bant polimorfikti. Markör bant 1, 5 ve 9 sadece P-3394 çesidinde, markör bant 4 sadece Vero çesidinde, markör bant 7 ise sadece P-3165 çesidinde olustu. Bu nedenle OPAB-3 primeri bu 5 misir çesidi içerisinde Vero, P-3394 ve P-3165 çesitlerinin diger misir çesitlerinden ayirt edilmesinde tanımlayici bir primer olarak kullanılabilir.



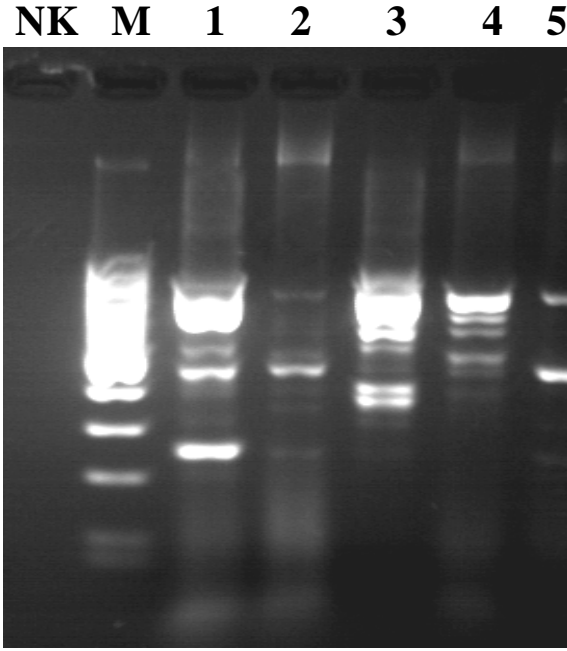
Sekil.3.5. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB 5 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M-** 100 bç DNA Ladder **NK-** Negatif Kontrol **1-** Vero **2-** P-3165 **3-** P-3394 **4-** OSSK-596 **5-** Luce

OPAB-5 primeri ile 5 ticari misir çesidinde yapılan RAPD-PCR sonucunda 8 markör bant elde edildi. Bunlardan 2 tanesi (markör bant; 5, 6) monomorfik, diger 6 markör bant polimorfikti. Markör bant 7 sadece Vero çesidinde olustu. Bu nedenle OPAB-5 primeri bu 5 misir çesidi içerisinde Vero çesidinin diger misir çesitlerinden ayirt edilmesinde tanımlayici bir primer olarak kullanılabilir.



Sekil.3.6. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB 9 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M-** 100 bç DNA Ladder **NK-** Negatif Kontrol **1-** Vero **2-** P-3165 **3-** P-3394 **4-** OSSK-596 **5-** Luce

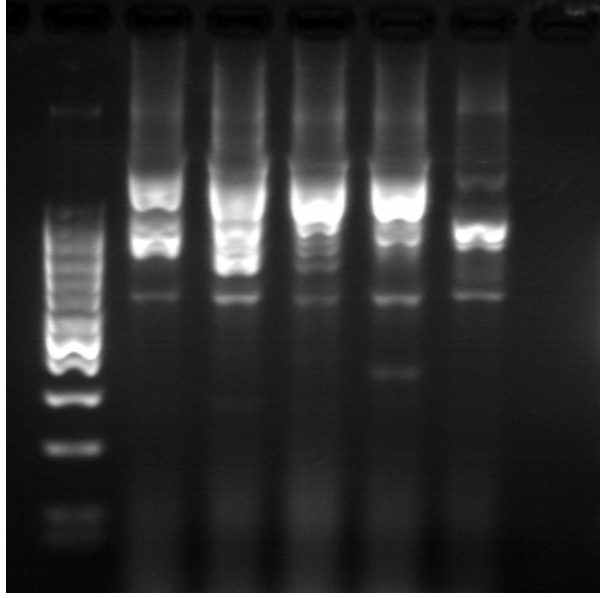
OPAB-9 primeri ile 5 ticari misir çesidinde yapılan RAPD-PCR sonucunda 10 markör bant elde edildi. Bunlardan tamami polimorfikti. Markör bant 8 sadece OSSK-596 çesidinde olustu. Bu nedenle OPAB-9 primeri bu 5 misir çesidi içerisinde OSSK-596 çesidinin diger misir çesitlerinden ayirt edilmesinde tanimlayici bir primer olarak kullanilabilir.



Sekil.3.7. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB 11 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M**- 100 bç DNA Ladder **NK**- Negatif Kontrol **1**- Vero **2**- P-3165 **3**- P-3394 **4**- OSSK-596 **5**- Luce

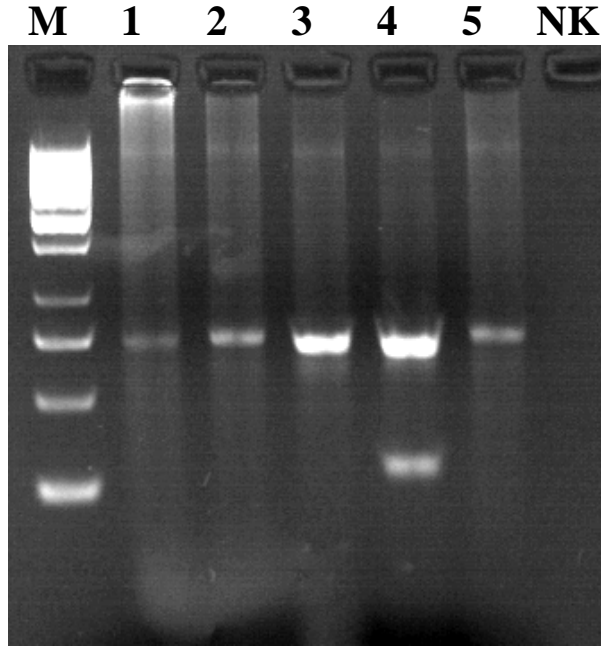
OPAB-11 primeri ile 5 ticari misir çesidinde yapılan RAPD-PCR sonucunda 10 markör bant elde edildi. Bunlardan tamamı polimorfikti. Markör bant 6 sadece OSSK-596 çesidinde, markör bant 8 ve 9 sadece P-3394 çesidinde, markör bant 10 ise sadece Vero çesidinde olustu. Bu nedenle OPAB-11 primeri bu 5 misir çesidi içerisinde OSSK-596, Vero ve P-3394 çesitlerinin diger misir çesitlerinden ayirt edilmesinde tanımlayıcı bir primer olarak kullanılabilir.

M 1 2 3 4 5 NK



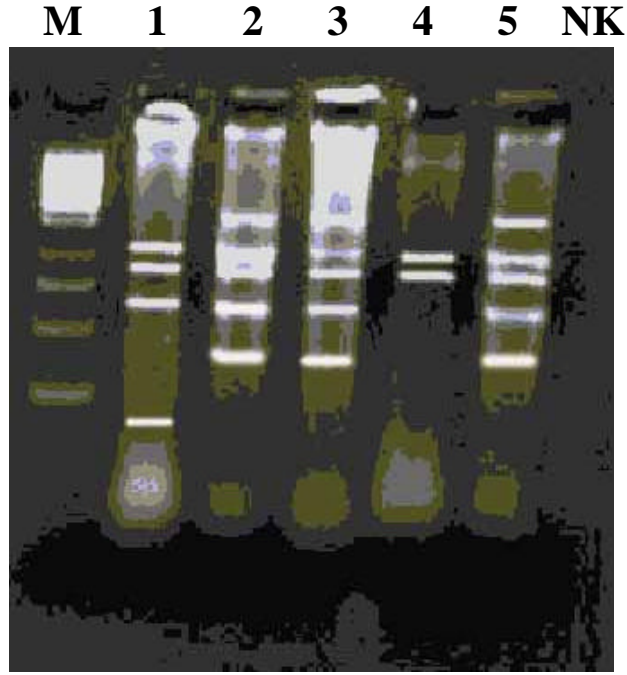
Sekil.3.8. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB 14 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M-** 100 bç DNA Ladder **NK-** Negatif Kontrol **1-** Vero **2-** P-3165 **3-** P-3394 **4-** OSSK-596 **5-** Luce

OPAB-14 primeri ile 5 ticari misir çesidinde yapılan RAPD-PCR sonucunda 12 markör bant elde edildi. Bunlardan 2 tanesi (markör bant; 6, 7) monomorfik, diger 10 markör bant polimorfikti. Markör bant 10 sadece Luce çesidinde, markör bant 12 ise sadece OSSK-596 çesidinde gözlendi. Bu nedenle OPAB-14 primeri bu 5 misir çesidi içerisinde OSSK-596 ve Luce çesitlerinin diger misir çesitlerinden ayirt edilmesinde tanımlayici bir primer olarak kullanılabilir.



Sekil.3.9. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB 17 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuclari **M**- 100 bç DNA Ladder **NK**- Negatif Kontrol **1**- Vero **2**- P-3165 **3**- P-3394 **4**- OSSK-596 **5**- Luce

OPAB-17 primeri ile 5 ticari misir çesidinde yapilan RAPD-PCR sonucunda 2 markör bant elde edildi. Bunlardan 1 tanesi (markör bant 1) monomorfik, markör bant 2 ise polimorfikti. Markör bant 2 sadece OSSK-596 çesidinde olustu. Bu nedenle OPAB-17 primeri bu 5 misir çesidi içerisinde OSSK-596 çesidinin diger misir çesitlerinden ayirt edilmesinde tanimlayici bir primer olarak kullanilabilir.



Sekil.3.10. *Zea mays*'a ait 5 çesidin, OPAB-18 primerinin kullanilmasiyla elde edilen RAPD-PCR sonuçlari **M-** 100 bç DNA Ladder **NK-** Negatif Kontrol **1-** Vero **2-** P-3165 **3-** P-3394 **4-** OSSK-596 **5-** Luce

OPAB-18 primeri ile 5 ticari misir çesidinde yapilan RAPD-PCR sonucunda 8 markör bant elde edildi. Bunlardan 2 tanesi (markör bant; 2 ve 3) monomorfik, diger 6 markör bant polimorfikti. Markör bant 6 sadece Vero çesidinde olustu. Bu nedenle OPAB-18 primeri bu 5 misir çesidi içerisinde Vero çesidinin diger misir çesitlerinden ayirt edilmesinde tanimlayici bir primer olarak kullanilabilir.

Çizelge.3.2. Vero, P-3165, P-3394, OSKK-596 ve Luce mısır (Z. Mays) çeşitlerinin RAPD primerlerle oluşturulan PCR Ürünleri

Primer	Her Primer için Toplam RAPD Ürün Sayısı	Toplam Polimorfik RAPD Ürün Sayısı	Toplam monomorfik RAPD ürün sayısı
OPAB-1	6	5	1
OPAB-2	7	4	3
OPAB-3	14	13	1
OPAB-5	8	6	2
OPAB-9	10	10	-
OPAB-11	10	10	-
OPA B-14	12	9	3
OPAB-17	2	1	1
OPAB-18	6	4	2
Toplam	75	62	13

3.1.3. RAPD Bant Profillerinin Analizi

Jel fotoğrafları üzerinden RAPD bantları her bir bant için var (1) ya da yok (0) olarak sayıldı ve her bir primer için sonuçlar çizelgelendirildi (Çizelge 3.3-Çizelge 3.10) Genetik benzerlik (S_{AB}) RAPD profili verilerinin Jaccard esitliği hesaplandı. Genetik uzaklık değerleri ile dendrogram SPSS programı kullanılarak çizildi.

Jaccard benzerlik ölçümü; Mikrobiyolojik ve taksonomik bulgularda ikili değerleri saptanan birimlerin belirli bir özelliğe sahip olmalarının artı (+) ve eksi (-) özellikler gösterenlere oranını belirten bir benzerlik ölçüsü olarak ele alınmıştır.

$$J = \text{Sim}_{kl} = (nS^+) / (nS^+ + nd)$$

Biçiminde hesaplanır. Burada ns, k ve l birimlerinde + karakterlerin sayısını, nd birimlerden birinde + diğerinde - olan karakterlerin sayısını göstermektedir.

Çizelge.3.3. OPAB 1 Primerleri ile Elde Edilen Bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	0	0	0	1	0
B2	1	0	0	1	0
B3	0	1	1	1	0
B4	0	0	1	1	0
B5	1	1	1	1	1
B6	1	0	0	0	1

Çizelge.3.4. OPAB 2 primeri ile elde edilen bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	1	1	0	0	1
B2	0	0	0	1	0
B3	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	1	1
B5	1	1	1	1	1
B6	1	1	0	1	1
B7	0	0	0	1	0

Çizelge.3.5. OPAB 3 primeri ile elde edilen bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	0	0	1	0	0
B2	1	0	1	0	0
B3	1	0	1	0	1
B4	1	0	0	0	0
B5	0	0	1	0	0
B6	1	0	1	0	1
B7	0	1	0	0	0
B8	1	0	1	0	1
B9	0	0	1	0	0
B10	1	1	1	0	1
B11	1	0	1	0	1
B12	1	1	1	1	1
B13	1	0	0	1	1
B14	0	0	0	1	1

Çizelge.3.6. OPAB 5 primeri ile elde edilen bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	1	1	0	1	0
B2	1	1	0	1	0
B3	0	1	0	1	0
B4	1	0	0	1	1
B5	1	1	1	1	1
B6	1	1	1	1	1
B7	1	0	0	0	1
B8	1	1	0	1	0

Çizelge.3.7. OPAB 9 primeri ile elde edilen bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	0	1	1	0	1
B2	0	1	1	0	0
B3	0	1	1	0	1
B4	1	1	1	1	0
B5	0	1	1	1	1
B6	0	1	0	1	1
B7	0	1	1	1	1
B8	0	0	0	1	0
B9	0	1	1	1	1
B10	0	1	1	0	1

Çizelge.3.8. OPAB 11 primeri ile elde edilen bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	1	0	1	0	0
B2	1	0	1	1	1
B3	1	0	1	1	0
B4	0	0	1	1	0
B5	1	0	1	0	0
B6	0	0	0	1	0
B7	1	1	0	0	1
B8	0	0	1	0	0
B9	0	0	1	0	0
B10	1	0	0	0	0

Çizelge.3.9. OPAB 14 primeri ile elde edilen bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	0	1	1	1	0
B2	1	0	0	1	1
B3	1	1	1	1	0
B4	0	1	1	1	0
B5	0	1	1	1	0
B6	1	1	1	1	1
B7	1	1	1	1	1
B8	1	1	1	0	0
B9	0	1	1	0	0
B10	0	0	0	0	1
B11	1	1	1	1	1
B12	0	0	0	1	0

Çizelge.3.10. OPAB 17 primeri ile elde edilen bantlar

Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	1	1	1	1	1
B2	0	0	0	1	0

Çizelge.3.11. OPAB 18 primeri ile elde edilen bantlar

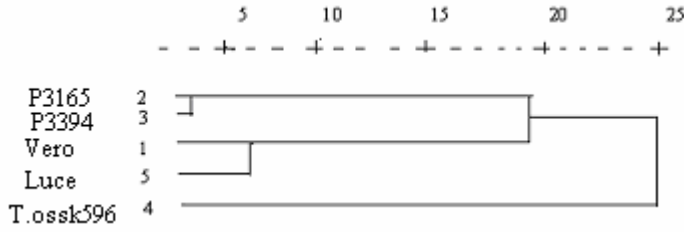
Bantlar	Vero	P3165	P3394	Tareks	Luce
B1	0	1	1	0	1
B2	1	1	1	1	1
B3	1	1	1	1	1
B4	1	1	1	0	1
B5	0	1	1	0	1
B6	1	0	0	0	0

RAPD analizi sonucu elde edilen verilere göre tescilli ticari mısır çeşitlerinden Vero, P-3165, P-3394, OSSK-596 ve Luce arasındaki genetik benzerlik değerleri Çizelge 3.11' de verilmiştir. Jaccard benzerlik indeksi ile yapılan çalışmaya göre; *Z.mays*'a ait bu 5 çeşit arasındaki genetik benzerlik değerleri 0,383 ile 0,561 arasında hesaplanmıştır. P-3165 ve P-3394 çeşitleri 0.561 ile en yüksek genetik benzerliğe sahiptirler. OSSK-596 ile Luce çeşitleri ise 0.338 değeri ile en az genetik benzerliğe sahiptirler. Vero'nun diğer çeşitlerle olan genetik benzerlikleri P-3165 ile 0.475, P-3394 ile 0.429, OSSK-596 ile 0.410, Luce çeşidi ile de 0.528'dir. P-3165 çeşidinin P-3394 ile genetik benzerliği 0.561, OSSK-596 ile 0.491, Luce ile 0.509'dur. P-3394 çeşidinin OSSK-596 ile genetik benzerliği 0.394, Luce ile 0.475'dir, OSSK-596 çeşidinin Luce ile olan genetik benzerliği ise 0.383 ile en düşük değerdir.

Çizelge.3.12. RAPD verilerine göre SPSS programında Jaccard esitligi kullanılarak oluşturulmuş genetik benzerlik matrisi

Çesitler	Vero	P3165	P3394	T.ossk596	Luce
Vero	-				
P3165	0.475	-			
P3394	0.429	0.561	-		
T.ossk596	0.410	0.491	0.394	-	
Luce	0.528	0.509	0.475	0.383	-

Jaccard benzerlik indeksine göre SPSS programında kümeleme analizi yapılarak bir dendrogram elde edilmiştir (Sekil 3.11).



Sekil.3.11. Misir çeşitlerinin kümeleme analiz sonuçları

Jaccard benzerlik esitligine göre yapılan kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrograma göre (Sekil.3.11) baslıca iki ana küme olmuştur. Birinci ana kümede OSK-596 bulunurken ikinci ana kümede; P-3165, P-3394, Vero, Luce çeşitleri bulunmaktadır. İki ana küme de yine kendi içinde iki alt kümeye ayrılmıştır. Birinci alt küme P-3165, P-3394 çeşitleri, ikinci alt kümede Vero ve Luce çeşitleri yer almaktadır. Tareks firmasına ait OSSK-596 çeşidi diğer çeşitlerden en uzakta kümelendirken, diğer çeşitler içerisinde Pioneer firmasının misir çeşitleri olan P-3165 ve P-3394 bir kümede, Pan tohum firmasına ait Vero ve Luce çeşitlerinin de bir kümede bulunması; her firmanın kendi tohumlarının birbirine daha yüksek oranda benzer olduğunu göstermektedir. Bunun temel nedeni büyük olasılıkla aynı firmaların belli ebeveynleri

yeni misir çeşitlerinin üretiminde kullanmaları olabilir. Bu çalışmada ayrıca 5 misir çeşidinin genotiplerini tanımlayan genotipe özgü RAPD markörler belirlenmeye çalışıldı.

RAPD primerleri tarafından oluşturulan bant profilleri karşılaştırıldı ve polimorfik ve monomorfik bant sayıları belirlendi. Buna göre kullanılan primerlerle çeşitler arasında polimorfik ve monomorfik toplam 75 bant oluştu. Polimorfik bantlardan misir çeşitlerini ayırt edici olanlar OPAP 1, OPAB 2, OPAB 3, OPAB 5, OPAB9, OPAB11 ve OPAB-14, OPAB 17 ve OPAB 18 ile elde edildi. Çalışılan çeşitler içerisinde en fazla tanımlayıcı bant oluşturan primer OPAB-3 olarak bulundu.

3.2. Tartışma

Bu çalışma ile *Zea Mays*'a ait 5 çeşidin DNA izolasyonu yapılmış ve RAPD tekniği ile türdeki çeşitler arasında genetik benzerlikler ortaya konmuştur. Misir çeşitlerinin toplam 9 RAPD primerle çalışılması sonucunda 75 bant oluşmuştur. Bu bantlardan 62 tanesi (%83) polimorfik, 13 tanesi (%17) monomorfiktir. Primerlerin oluşturduğu bant profilleri incelenerek bantların var ya da yok olmasına dayanan Jaccard eşitliği kullanılarak benzerlikleri hesaplanmıştır. Benzerlik değerleri 0.561 ile 0.328 arasında değişmektedir. P-3165 ve P-3394 0.561 oranı ile en çok benzer, OSSK-596 ve Luce çeşitleri ise 0.328 ile birbirine en az benzer iki çeşit olarak tespit edildi. Diğer çeşitler arasında ise bu iki değer arasında benzerlik oranları tespit edilmiştir. Bu sayede farklı isimler altında satılan P-3165, P-3394, Vero, Luce ve OSKK-596 misir çeşitlerinin genetik olarak değerlendirilmeleri yapılarak farklılıkları ortaya konmuştur. Farklı firmalar tarafından tescil olarak ülkemizde satılan tohumların belki de aynı olabilecekleri konusundaki çelişkiler bunların genetik düzeyde karşılaştırılmaları yapılmadıkça her zaman bir soru olarak kalacaktır. Görüntü olarak birbirinin aynı olan ve ülkemize farklı zamanlarda farklı ülkelere ithal olarak gelen Kara Limon ve İtalyan memeli çeşitleri arasında yaşanan karmaşayı çözmek için de RAPD markörler kullanılmış ve bunların birbirinden farklı çeşitler olduğu tespit edilmiştir.

5 misir çeşidi genetik benzerlik değerlerine göre yapılan kümeleme analizinde 2 ana kümede toplanmıştır. 1. ana kümede kendi içinde iki alt kümeden oluşmuştur. Bu

kümenin birinci alt kümede Pioneer tohumculuk A.S tarafından üretilen P-3165 ve P-3394 çeşitlerini içermektedir. 2. alt kümede ise Pan tohumculuk ve islah A.S tarafından üretilen Vero ve Luce çeşitleri yer almaktadır. Dendrogramın ikinci ana kümesinde ise Tareks tohumculuk firması tarafından üretilen OSKK-596 çeşidi bulunmaktadır. OSKK-596 çeşidi diğer çeşitlere en uzak olandır. Bu veriler göstermiştir ki çalıştığımız ticari mısır çeşitlerinin birbirlerinden genotipik olarak farklı olmaları sonucunun yanı sıra, aynı firmaların tescillenmiş tohumlarının aynı kümelerde yer almaları çeşitlerin oluşturulması esnasında aynı ebeveynlerden yararlanıyor olduklarını göstermektedir.

Eskiden hiç kimse bitkilerin "patent"lenmesi üzerine düşünmemisti. Hiç kimse bir hayvan ve bitki geninin bir firmanın "özel mülkü" haline gelebileceğini düşünmemisti. Ancak genetik mühendisliğin gelişiminde endüstri sektörü sadece yaşamayan malzemelere değil, "yaşayan ünitelere" de patent verilmesinin mümkün olabileceğini göstermiştir.

Genotip veya çeşit tanımlaması yetiştiricinin haklarını korumak için ilk basamaktır. Eğer tescillenmiş çeşitler ve tohumlar herhangi bir mekanizma ile ayırt edilemez olsaydı, yeni çıkan varyetelerin tohum üretimi kontrol edilemezdi. *Vitis vinifera* bitkisine ait 7 aday çeşit ve 8 çeşit ile bunların toplam ebeveynlerinin genetik karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bu amaçla moleküler yöntemlerden RAPD-PCR tekniği kullanılmış, 20 farklı primerle 30 çeşit ve çeşit adayının genetik benzerlikleri ortaya koyularak, tanımlamaları yapılmıştır.

Bu çalışmada ayrıca RAPD tekniğinde polimorfiklik sağlayan primer dizileri belirlenerek bundan sonra DNA düzeyinde yapılacak araştırmalar için temel optimizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler çalışma materyalimiz olan 5 farklı mısır çeşidinde de bantlar oluşturularak aralarındaki polimorfizmi sergilemiş, bir tür parmak izi ortaya çıkartmış ve bu çeşitleri birbirinden ayırt etmede kullanılacak genotipe özgü markörler üretmiştir. Çalışılan çeşitler içerisinde en fazla tanımlayıcı bant oluşturan OPAB-3 primeridir; P-3394 çeşidi için 3, P-3165 için 1 ve Vero için 1 tane olmak üzere toplam 5 tane genotipe özgü markör bant oluşturdu. OPAP-1 primeri; OSKK-596 için 1 tane OPAB-2 primeri; OSKK-596 için 2 tane OPAB-5 primeri; Vero için 1 tane, OPAB-9 primeri OSKK-596 için 1 tane, OPAB-11 primeri; Vero için 1, P-3394 için 2, Vero için, OSKK-596 çeşidi için 1 tane,

OPAB-14 primeri; Luce için 1 tane, OSKK-596 için 1 tane, OPAB-17 primeri; OSSK-596 için 1 tane, OPAB-18 primeri ise Vero için 1 tane tanımlayıcı markör bant oluşturdular. Bu markörler sadece o çeşide özgü olan genotipin ipucunu vererek monomorfik özelliklerin genotipten okunmasını ve istenilen özelliklere sahip tohum çeşitlerinin üretilmesinde etkili olur. Türkiye kökenli yabancı arpa hatları (*Hordeum murinum*, *Hordeum bulbosum* ve *Hordeum vulgare spontaneum*) arasındaki çeşitlilik moleküler düzeyde RAPD tekniği kullanılarak karşılaştırılabilir olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, ekonomik öneme sahip karakterleri (hastalıklara, kuraklığa dirençlilik vb.) taşıyan yabancı arpa hatlarının RAPD markörleriyle belirlenebileceğini göstermiş ve bu hatların kullanımıyla da yüksek kaliteli arpa kültürlerinin geliştirilmesinin mümkün olabileceği ortaya konulmuştur [55]. Mısır bitkisiyle yapılan bu çalışma RAPD markörlerin diğer ekonomik değere sahip türlerde olduğu gibi yüksek kaliteli mısır tohumu üretiminde de kullanılabilirliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] KIRTOK, Y., *Misir Üretimi ve Kullanımı*, kocaolu yayinevi, İstanbul, Türkiye, (1988).
- [2] DAVIS, P.H., *in Flora of Turkey and East Aegean Islands*, 9 Suplment, University Pres, Edinburg, (1985).
- [3] KÜNT, E., *Tahillar II (Sicak Iklim Tahillari)*, Ankara Üniversitesi Ders Kitabı, (1994).
- [4] <http://www.cukurovataem.gov.tr/Misir%20Yetistiriciligiweb.htm>
- [5] www.izob.gov.tr
- [6] NEUKOM, H., ve BUCHI, W., *Industrial utilization of, CIBA-GEIGY Arochemicals*. Switzerland, pp.95-96, 1997.
- [7] SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN G. T., 6-ERLICH, H. A. ve ARNHEIM, N., Enzymatic amplification of beta-globulin Genomic secuencias and restriction site analiysis for diagnosis of sickle anemia, *Science*, **230**, pp.1350-1354, (1985).
- [8] SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., SOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. ve ERLIC, H. A., *Primer-directed anzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, *Science*, **239**, 487-491, 1988.
- [9] KUMAR, R., *The Tecnique of polymerase chain reacition, Tecnique, Tercnique A jornal of methods in Cell and Molecular Biology*, **1** No:3, pp:133-153, (1989).
- [10] MULLIS, K., B. ve FALOONA, F. A., *Specitif syynthesis of DNA in vitro via a Poliymerase catalyzed chain reaction, Meth. Enzymol*, **15**, 335-350,(1987).
- [11] PROBHU, R., JENSEN, H., WEBB, D., LUK, S., SMITH, S., ve GRESSHOFF, P. M., *Genetic relatednes among soybean lines revaaled by DNA amplification Fingerprenting, FFLP, and pedigree data, Crop Sci.* (in publication), (1996).
- [12] ÇAGLAYAN, H. S., Polimeraz Zincir Reaksiyonu: Nükleik asitleri çoğaltma teknigi uygulama alanlari, *Tr. J. Of Biology*, **15**, 9-21, (1990).
- [13] CAETANO-ANOLLES G ve GRESSHOFF P. M., DNA amplificaton fingerprinting : A general tool with applications in breeding idendification and phylogenetic analysis of plants. *Moleküler Ecology and Evulution : Approaches and Applications Switzerland*, 17-31, (1994).

- [14] McCLEAN, O., *Mopping plant genomens with molecular markers* (1994).
- [15] SAGHAI MAROOF, M.A., BIYASHEV, R.B., YANG, G.P.,ZHANG, Q ve ALLARD, R.V, *Extra ordinarly polimorphic microsatalite DNA barley spscies diversity, choromazal location, and popilation diynamichs*,(1994).
- [16] TERAUCHI, R., ve KONUMA, A., *Microsatalittle polymorphism in Dioscorea tokoro, a wild yam species*. *Genome*, **37**, pp.794-801, (1994).
- [17] RÖDER, M. S., PLASCHKE, J., KÖNING, S. U., BÖRNER, A., SORRELLS, M. E., TANKSLEY S. D., ve GANAL M. W., Abundance variability and chromosomal location of microsatalites on wheat, *Mol. Gen. Genet.* **246**:327-333 (1994)
- [18] DIETRICH, W. F., *Nature*, 380:149
- [19] DIB, C., *Nature*, 380:152, 1996
- [20] CONDIT, R., and HUBBER, S. P.,*Abundance DNA sequence of two base reppeat regions in tropicaltree genom in tropical tree, genome.*, **34**:66-71 (1991).
- [21] LAGERCHRANTZ U., ELLEGREN H., ve ANDERSON L., *The abundance of various polimorphich microsatalite motifs differs between plants and vertabrates*. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1111-1115, (1993).
- [22] MORGENTE, M., ve OLIVERI, A.M., *PCR Amplified mikrosatelleties as markers in plant genetics*. *Plant J.*, **3**,175-182 (1993)
- [23] TAUTZ, D., ve SCLÖTTER, C., *Curr. Opin. Genet.*, **4**, 832, (1994).
- [24] WAUGH, R. ve POWELL, W., *Using RAPD markers for crop improvement*, *Trends in Biotec.*, **10**, 186-191, (1992)
- [25] MANIATIS, T., FRITSH, E. F., ve SAMBROOK, J., *In Molecular Cioning: A Laboratory Monual*, Cold Spring Harbor, New York, (1989)
- [26] CAETANO-ANOLLES, G., BASSAM, B. J., GRESSOFF, P. M.,*DNA ampification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers*, *Biotecology*, **9**, pp.553-557
- [27] LAVYER F. C., STOFFELS., SAIKI R. K., MYAMBOK., DURUMMOND R., ve GELFAND, D. H., *Isolation, caracterization, and exparation Escherichia coli of the DNA Polymerase gene from Thermus aquaticus*. *J. Bio. Chem.*, **246**: 6427-6437, (1989).

- [28] INNIS, M. A., ve GELFAND, D. H., in *PCR protocols: A Guide to methods and Applications*, Academic Press, San Diego, pp. 3-11, (1990).
- [29] HADRYS, H., BALICK, M. ve SCHIERWATER, B., Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**:55-63, (1992).
- [30] WELSH, J. ve McCLELLAND, M., *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*, *Nucl. Acids Res.*, **82**, 7213-7221, (1990).
- [31] RAFALSKI, J. A., ve TINGEY S. V., *Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines*. Review, **9 (8)**: 275-279, (1993).
- [32] WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, K., LIVAK, J. A., RAFALSKY, J. A. ve TINGEY, S. V., *DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*, *Nucleic Acid Research* **18**: 531-6535, (1990).
- [33] WILLIAMS, J. G. K., HAFANEY, M. K., RAFALSKY J. A. ve TINGEY, S. V., *Genetic analysis using RAPD markers*, *Methods in Enzymology* **218**: 704-740, (1993).
- [34] ADAMS, R. P. ve DEMEKE, T., *Systematic relationships in Juniperus based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs)*, *Taxon* **31**: 262-266, (1996).
- [35] STAUB, J., BACHER, J. ve POETTER, K., Sources of potential errors in the application of RAPDs in cucumber. *Hortscience* **31**, 262-266, (1996).
- [36] HARRIS, S.A, RAPDs in systematics-a useful methodology? In *Molecular systematics and Plant Evolution*. Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Gornall, R.J. edited, Taylor and Francis, London, 211-228, (1999).
- [37] SNEATH, P.H.A. ve SOKAL R.R. *Numerical taxonomy*, Freeman , San Francisco, (1937).
- [38] JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bulletin de la Societe Vaudense des Sciences Naturelles* **44**, 223-270, (1908).
- [39] NEI, M. S., ve LI, W., *Mathematical model of for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*, *Proceedings of the National Acad. Sci. of the USA* **76**: 5269-5273, (1979).
- [40] RIESBERG, L. H., Homology and RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* **5**: 99-105, (1996).
- [41] KARP, A., SEBERG, O. ve BUIATTI , M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* **78**: 143-149, (1996).

- [42] CONGIU, L., CHICCA, M., CELLA, R., ROSSI, R. ve BERNACCHIA, G., The use of RAPD markers to identify strawberry varieties: A Forensic Application. *Molecular Ecology*, **9**: 229-232, (2000).
- [43] VAN BUREN, R., HARPER, K. T., ANDERSON, W.R., STANTON, D. J., SEYOUM, S. ve ENGLAND, J. L., *Evaluating the relationship of Autumn buttercup (Ranunculus acriformis var. aestivalis) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA*, American Journal of Botany **81**, 514-519, (1994).
- [44] STEWARD, C. N., ROSSON, G., SHIRLEY, B. W. ve PORTER, D. M., *Population genetic variation in rare and endangered Iliamna (Malvaceae) in Virginia*, Biological Journal of the Linnean Society **58**, 357-369, (1996).
- [45] LIU Z. ve FURNIER G.R., Comparisons of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen, *Theoretical and Applied Genetics* **87**, 97-(1993).
- [46] DIAZ, Z. ve AGUINAGALDE, I., *The use of Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) markers of the study taxonomical relationships among species of Asphodelus sect. Verinea (Asphodelaceae)*. American Journal of Botany **83**, 949-953 (1996).
- [47] www.tagem.gov.tr
- [48] www.gazi.edu.tr
- [49] SANDIKLI, C., Karayemis (*Louroceasus officinalus* Roem) bitkisinin RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markörleri ile karakterizasyonu, Yüksek Lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, (2002).
- [50] www.arg.ege.edu.tr/~fitekno/Doc31.htm-36k-
- [51] AKSOY, S., Mercimek (*Lens culinaris*)'te farklı çeşitler arasındaki genetik polimorfizmin DNA markör teknolojisi ile tanımlanması, Yüksek lisans tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, (2001).
- [52] www.ktu.edu.tr
- [53] www.tagem.gov.tr/yeni%20web/projeler/uygulamaya%20aktarilan/projeler99/BAHCE99/14.htm-5k-EkSonuç-

- [54] SCHNELL R. J., GOENAGA, R. ve OLANGO, C. T., Genetic Similarities among cocoyam cultivars based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Scientia Horticulturae* **80**: 267, (1999).
- [55] www.fp6genomics.boun.edu.tr/Akkaya%203.pdf-EkSonuc-
- [56] LEAH S., IRINA, K., RUGUO H., KOSTAS, A., MOLLY, M., KYLE, J. Ve RAFAEL, P. T., Molecular variation in melon (*Cucumis melo*) as revealed by RFLP and RAPD markers *Scientia Horticulturae* **79**, 101-102, (1999).
- [57] Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı verileri, 2001
- [58] ELISABETTA S., STEFANO P., ve ASSUNTA B., Use of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis to Detect Genetic Variation in *Pyrus* Species Plant Molecular Biology Reporter **19**: 271, (2001).
- [59] DOYLE, J. J., DNA protocols for plants-CTABtotal DNA isolation in *Taxonomy*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 283-293 (1991).