

170050

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY'DA YETİŞEN TRABZON HURMASININ
(*Diospyros kaki* L.) RAPD (RASTGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK
DNA) ANALİZİ

Merve GÜNERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2005

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. E. Sümer ARAS ve Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU danışmalığımda, Biyolog Merve GÜNERİ tarafından hazırlanan bu çalışma 04/03/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Doç. Dr. Leyla AÇIK

Yrd. Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK

Yrd. Doç. Dr. E. Sümer ARAS

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HATAY'DA YETİŞEN TRABZON HURMASININ (*Diospyros kaki* L.) RAPD (RASTGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK DNA) ANALİZİ

Merve GÜNERİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. E. Sümer ARAS
Eş Danışman: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

Bu çalışmada Hatay ili ve çevresinde yetişen *Diospyros kaki* L.' nin 18 ayrı bireyinin RAPD analizi ile genetik akrabalık araştırması yapılmıştır.

RAPD tekniğindeki gerekli olan ilk aşama DNA izolasyonu olup çalışmada çeşitli yöntemler denenmiş ancak bitkinin fenolik bileşenlerinin yoğun olmasından dolayı diğer bitkiler için kullanılmış olan farklı saflaştırma teknikleri bu bitki için başarılı olmamış ve bitkiye özgü yeni bir saflaştırma tekniği geliştirilmiştir.

Araştırmanın PCR aşamasında 10 adet dekamer primer kullanılmıştır. Bu primerlerin hepsi polimorfizm göstermiştir. 13 ve 5 numaralı bireyler (Karaköse Köyü ve Yayladağı merkezden alınan bireyler) 0,611 en düşük benzerlik indeksini vermiştir. 15 ve 4 numaralı bireyler ise (Hisarcık Köyü Güneysöğüt Köylerinden alınan bireyler) benzer şekilde 0,639 en düşük benzerlik oranını vermiştir. 2 ve 3 numaralı bireyler (Kocaman Köyü ve Yayladağı merkezden alınan bireyler) 0,89 ile en yüksek benzerlik indeksini vermişlerdir.

2005, 51 sayfa

ANAHTAR KELİMLER: DNA İzolasyonu, *Diospyros kaki* L., PCR, RAPD, benzerlik indeksi, dendrogram

ABSTRACT

Masters Thesis

RAPD (RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) ANALYSIS OF HATAY PROVINCE PERSIMMON (*Diospyros kaki* L.)

Merve GÜNERİ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Coadviser: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

In this study, genetic relationships among *Diospyros kaki* L. growing around Hatay province in Turkey were assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Ten decamer primers tested. Also one of the limited studies about this plant, on this area in our country.

The first stage of RAPD, is the isolation of DNA. In this different methods were tested. Because of the concentrated phenolic compounds, these extraction methods were not successful. For this reason a DNA isolation method was developed special to persimmon.

In PCR stage were used 10 decamer primers were tested. All of primers showed polymorphism. The lowest similarity obtained was found between samples 13 and 5 (Collected samples from; Karaköse village and center of Yayladağ) with a value of 0,611. On the other hand, 15 th and 4th samples (Collected samples from; Hisarcık village and Güneysöğüt village) gave the similar low value of 0,639. Samples number 2 and 3 (Collected samples from; Kocaman village and center of Yayladağı) gave the highest similarity ratio of 0,89.

2005, 51 pages

KEY WORDS: DNA Isolation, *Diospyros kaki* L., PCR, RAPD, similarity index, dendogram

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konumun belirlenmesinde ve araştırmamın yürütülmesinde her zaman gösterdiği yakın ilgisi yönlendirici yardımları için değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Sümer Aras' a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmanın yürütüldüğü Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarının her türlü imkanından yararlanmamı sağlayan sayın hocam, eş danışmanım Prof. Dr. Gökhan Söylemezoğlu' na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmam sırasında her türlü birikim ve deneyimini paylaşmayı esirgemeyen sayın Dr. Ali Ergül' e çok teşekkür ederim.

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca gösterdikleri yakın ilgi, destek ve fedakarlıklarından dolayı anneme, babama ve Evrim Yıldız' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve GÜNERİ
Ankara, Mart 2005

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	7
2.1. Protein Belirteçler (İzoenzimler)	7
2.2. DNA Belirteçler	8
2.2.1. Hibridizasyona dayalı DNA belirteçler	9
2.2.2. PCR (Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı DNA belirteçler	10
2.2.3. ESTs (Expressed Sequence Tags) belirteçler	18
2.3. Moleküler Belirteçlerin Biyokimyasal Belirteçlere göre Avantajları	18
2.4. RAPD Tekniğinin Avantajları ve Diğer Moleküler belirteçler ile Karşılaştırılması	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.2. Yöntem	23
3.2.1. DNA izolasyonu	23
3.2.2. PCR uygulamaları	27
3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1. DNA İzolasyonu	31
4.2. PCR Uygulamaları	32
4.3. Benzerlik İndeksi ve Genetik İlişki Dendogramı	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER DİZİNİ

AFLP(s)	(Amplified Fragment Length Polimorphism(s))- Çoğaltılmış DNA Parçaları Uzunluk Polimorfizmi
B.I.	Benzerlik İndeksi
bç	Baz çifti
CAPS	(Cleaved Amplified Polimorphic Sequence)-Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromid
dNTP	Deoksintükleotit trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EST	(Expressed Sequence Tags)-İfade Edilen Dizi Tayini
G+C	Guanin ve sitozin baz sayısı toplamı
kb	Kilobaz
LiCl ₂	Lityum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
NSTYS	(Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System)- Sayısal Taksonomik ve Çoklu Çeşitlilik Analiz Sistemi
OD	Optik yoğunluk
PCR	(Polymerase Chain Reaction)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVPP	Polivinil Poliprolidon
RAPD	(Randomly Amplified Polimorphic DNA (s))- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	(Restriction Fragment Length Polimorphism(s))- Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi
Rnaz A	Ribonükleaz enzimi
rpm	Dakikadaki döngü sayısı
SCAR(s)	(Sequence Characterized Amplified Region(s))- Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Dizi Bölgeleri
SSR	(Simple Sequence Repeats)- Basit Zincir Tekrarları
TBE	Tris- Borik Asit- EDTA
TE	Tris-HCl-EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Bireylerin toplandığı Hatay ili; birey numaraları ve toplandıkları bölgeler	22
Şekil 4.1. Çalışmada geliştirilen DNA ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılan DNA'ların agaroz jeldeki görünümü	32
Şekil 4.2. Uygun optimizasyon koşulları ile elde edilen agaroz jel (% 1.2) görüntüsü	32
Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 01 (5'CAG GCC GTT C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	33
Şekil 4.4. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 03 (5'AGT CAG CCA A 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	34
Şekil 4.5. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 18 (5'AGG TGA CCG T 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	34
Şekil 4.6. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 19 (5'CAA ACG TCG G 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	35
Şekil 4.7. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 11 (5'AAA GCT GCG G 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	35
Şekil 4.8. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 12 (5'TGT CAT CCC C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	36
Şekil 4.9. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 15 (5'GAC GGA TCA G 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	36

Şekil 4.10. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 20 (5'ACT TCG CCA C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	37
Şekil 4.11. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPO 07 (5'CAG CAC TGA C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	37
Şekil 4.12. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPO 10 (5'TCA GAG CGC C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder	38
Şekil 4.13. Bireylere ait genetik ilişki dendogramı	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Çalışmada kullanılan bireylerinin alındığı merkezlerdeki üretim değerleri	2
Çizelge 1.2. <i>Diospyros</i> cinsinin taksonomideki yeri	3
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bireylerin yeri ve denize olan yükseklikleri	21
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler ve baz dizileri	29
Çizelge 3.3. Araştırmada denenen ancak amplifikasyon göstermeyen primerler ve baz diziler	29
Çizelge 4.1. Farklı ekstraksiyon yöntemlerini karşılaştırılması	31
Çizelge 4.2. Bireylere ait benzerlik indeksi	39

1. GİRİŞ

Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) anavatanı Çin olan ve Uzak Doğu Ülkeleri ile ABD'nin bazı bölgelerinde yetiştirilen meyve türlerinden biridir (Onur 1990). Türün özellikle içerdiği mineraller ve vitaminler açısından zengin besin değeri, bir çok ülkede yetiştiriciliğini yaygınlaştırmaktadır (Tuzcu ve Yıldırım 2000).

Türkiye'ye hangi tarihte getirildiği bilinmemekle birlikte, çok eksiden beri Trabzon hurması yetiştiriciliği yapılmaktadır (Onur 1990). Bir subtropik iklim meyvesi olan Trabzon hurması, ülkemizde en çok Akdeniz Bölgesinde yetiştirilmektedir. Bu meyve türü, kışın yapraklarını döktüğü için daha serin bölgelerde de, özellikle Karadeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinde yetiştiriciliğine rastlanmaktadır.

Subtropik meyveler grubu içerisinde yer alan Trabzon hurmasının taze tüketimi dışında kurutularak, dondurularak, pasta, dondurma, reçel ve marmelat yapımında kullanılması ve endüstride çeşitli kullanım alanları olan tanen bakımından da çok zengin olması, bu meyveye ilginin artmasına neden olmuştur (Onur 1995).

Odunsu bitkiler grubunda yer alan türün yetiştiriciliğinde dünya sıralamasında 10. sırada olan ülkemizde başlıca yetiştiricilik alanlarını; Akdeniz, Karadeniz ve Marmara Bölgeleri oluşturmaktadır. İstatistiksel olarak 10 000 ton civarındaki üretimin % 80'ini (8 000 ton) Akdeniz Bölgesi karşılarken % 20'lik payı diğer bölgeler paylaşmaktadır. İller bazında düşünüldüğünde ise, Hatay ili 3762 ton ile ülke üretiminin % 37'sine sahiptir. Bunu daha düşük oranlardaki değerleri ile Adana ve Mersin illeri izlemektedir (Anonim 1992, Onur 1990, Özcan 1994).

Ülkemiz Trabzon hurması üretiminde bugün için üretici ülkeler arasında önemli bir yer almamakla birlikte, iklim ve toprak koşulları dikkate alındığında yetiştiricilik yönünden uygun bir ekolojiye sahip olduğu görülmektedir (Onur 1990). Ülkemizde Trabzon hurması yetiştiriciliğinin diğer ürünlerle karşılaştırıldığında üretimin çok az olduğu ancak, yıllara göre önemli artışların olduğu görülmektedir. Nitekim; 1994 yılında 9300

ton olan üretimimiz, 2002 yılında 15 000 tona ulaşmıştır (Şeker ve Toplu 2003).

Çizelge 1. 1. Çalışmada kullanılan bireylerin alındığı merkezlerdeki üretim değerleri (Anonim 2002)

	Toplu Meyvelikler			Dağınık Ağaç Sayısı				
İlçe Adı	Kap-ladı ğlı Alan (ha)	Meyve Veren Yaşta Ağaç sayısı	Meyve Verme- yen Yaşta Ağaç sayısı	Meyve Veren Yaşta	Meyve Vermeyen Yaşta	Toplam Meyve Veren Ağaç Sayısı	Ağaç Başına Ortalama Verim (kg/ağaç)	Üretim (ton)
Harbiye	340, 0	90000	4000	46000	3160	136000	15	2040
Belen	64,4	18700	2552	25157	3739	43857	25	1096
Samandağ				19800	2200	19800	50	450
Yayladağı	44,0	8000	750	5500	3100	13500	15	202
İskenderun				3400	500	3400	40	135

Trabzon hurması çeşitlerinin çoğunun kış dinlenme ihtiyaçları 7.2 °C'nin altında 200-400 saat kadardır. Bu soğuklama ihtiyacını bitki Hatay ilimizde çok rahat bir şekilde karşılamaktadır. Akdeniz Bölgesi kıyı şeridinde odun gözü sürmesi mart ayının ilk yarısında, çiçeklenme ise nisan sonlarında olmaktadır. Trabzon hurmaları geç çiçeklendikleri için ilkbahar geç donlarından etkilenmezler. Çeşitlerin meyvelerini olgunlaştırabilmeleri için 140-160 gün gibi uzun bir zaman aralığına ihtiyaçları vardır. Sertken yenilebilen çeşitler, meyvelerini olgunlaştırabilmeleri için diğerlerine göre daha fazla sıcaklık toplamına ihtiyaç duyarlar. Trabzon hurmaları yüksek hava nemi isterler ve en kaliteli meyveler nemli bölgelerden elde edilir. Bu koşullar ilimizde ve Akdeniz Bölgesinin sahil kesimlerinde çok rahat bir şekilde karşılanmaktadır. Bunların yanında Hatay insanının damak tadına uygun bir meyve türü olması, yetiştiriciliğinin bölge insanı tarafından çok iyi bir şekilde biliniyor olması Trabzon hurmasının Hatay'da diğer bölge ve illerimize göre çok daha fazla yetiştiriliyor olmasının temel nedenidir.

Uzak Doğu Asya Ülkeleri dışında Trabzon hurması meyve üretiminin ve tüketiminin çok düşük olması, bu meyve türüne olan ilginin artması yönünde bazı ülkelerin elinde ciddi fırsatlar olduğunu göstermektedir. Bunun başarılabilmesi için buruk olmayan, tohumuz, sert etli ve dış görünüş itibarıyla parlak, kırmızı renkli ve homojen irilikte, taşımaya ve muhafazaya dayanıklı meyvelerin bol miktarda üretilmesi ve bunların lezzet, kuru madde ve meyve yapısı gibi önemli parametreler bakımından tüketiciyi tatmin etmesi gerekmektedir (Şeker ve Toplu 2003).

Trabzon hurması sistematik sınıflandırmada 4 tür içerir ;

- 1- *Diospyros kaki* L. : Meyveleri taze veya işlenerek tüketilen tüm Trabzon hurması çeşitleri bu tür içerisindedir. Kökeni Çin'dir
- 2- *Diospyros lotus* L. : Kökeni Asya'dır ve sadece anaç olarak değeri vardır. Tanen kaynağı olarak da kullanılmaktadır.
- 3- *Diospyros virginiana* L. : Kökeni Kuzey Amerika'dır. Sadece anaç olarak değeri vardır.
- 4- *Diospyros oleifera* Cheng. : Kökeni Çin'dir. Tanen kaynağı ve anaç olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 1. 2. *Diospyros* cinsinin taksonomideki yeri

Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Altsınıf	Dilleniidae
Takım	Ebenales
Aile	Ebenaceae
Cins	Diospyros

Bitkinin ağaç yapısı çeşitlere göre değişmekle beraber, 8 metreye kadar büyüyen ağaçlar oluşturabilen bir türdür. Dik, yarı dik ve yayvan taç şekilleri oluşturabilir.

Kök, baskın bir kazık kök ve az miktarda saçak kök yapısındadırlar. *Diospyros kaki* L. türü nemli toprak koşullarına diğer türler kadar dayanıklı değildir. *Diospyros kaki* L. dışındaki türlerin anaç olarak kullanılmasının sebebi budur (Miller ve Crocker 1992). Basit yapraklı bir türdür ve yaprak şekli oval yada sivri olmaktadır. Yaprak kenarları düzdür. Yapraklar ve orta damar kalın, yaprak sapı kısadır (Tuzcu 1998).

Ağaçlarında erdişi çiçek, dişi çiçek ve erkek çiçek olmak üzere 3 tip çiçek bulunmaktadır. Bazı çeşitler yıldan yıla değişen oranlarda erkek ve dişi çiçekler oluşturmaktadır. Bazı yıllar erkek çiçeklerin sayısı oldukça fazla, bazı yıllar ise oldukça az erkek çiçek oluşur. Düzenli olarak çok sayıda erkek çiçek oluşturan çeşitler tozlayıcı olarak kullanılır (Kitagawa ve Glucina 1984).

Diospyros kaki L. türünde yer alan Hachia ve Fuyu çeşitleri ülkemiz dahil dünyada en çok yetiştirilen çeşitlerin başında gelmektedir. Bununla birlikte, ülkemizin türe ait genetik potansiyelinin çıkarılarak, üstün özellikli bireylerin seçilip çeşit olarak belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu yöndeki çalışmaların tamamının Karadeniz Bölgesinde yoğunlaştırılması ise (Onur ve Onur 1996), üretimde büyük paya sahip Akdeniz Bölgesindeki çalışmaların yetersizliğinin bir göstergesidir. Halbuki, ülke üretiminin % 37'sini karşılayan Hatay ilinde, türe ait zengin potansiyelin öncelikle incelenerek, çeşit adaylarının belirlenmesi ülkenin adına tescil edilecek üstün özellikli çeşitleri seçme şansını artıracaktır.

Trabzon hurmasının ıslahı ele alınırsa; araştırmacı verimli, erken olgunlaşan, iri meyveli, buruk olmayan, meyve eti sert olan, vitamin A içeriği yüksek olan, muhafazaya dayanıklılık gibi özelliklerin tamamını bir bitkide arayabileceği gibi sadece verimlilik, iri meyvelilik gibi tek bir özelliği de hedef edinebilir.

Meyvecilikte seleksiyon ıslahında amaç, yukarıda belirtildiği şekilde sadece meyve özellikleri olmayabilir. Yani bitki özellikleri de, taç iriliği, taç şekli, hastalıklara dayanıklılık durumu, zararlılara dayanıklılık durumu, uygunsuz ekolojik koşullara dayanıklılık (kireçli topraklara, nematodlu topraklara, çok soğuk iklimlere dayanıklılık gibi) gibi ağaç özellikleri de araştırmacının seçim kriterlerinden olabilir.

Bahsedilen bu gibi özelliklere sahip Trabzon hurması bitkilerinin bulunma şansı bitki sayısı arttıkça artacaktır. Bu açıdan Hatay, ağaç varlığındaki fazlalık nedeniyle bu şansa sahip demektir.

Bir popülasyonda bulunan bitkilerde genetik yapının aynı olup olmadığını anlamanın klasik ıslahta şimdiye kadar kullanılan tek bir yolu olmuştur. Bu yol, aynı ekolojik koşullarda ve aynı bakım koşullarında bitkileri yetiştirmek ve morfolojik, fenolojik, pomolojik özelliklerini incelemektir. Bu işlemler hem uzun bir süre almakta ve hem de çok masraflı işlemlerdir. Ancak son yıllarda RAPD, SSR, RFLP, AFLP gibi moleküler analiz yöntemlerinin geliştirilmesiyle gerek süre ve gerekse de masraflar çok kısalmıştır.

Moleküler biyolojide DNA teknolojisinin en geniş kullanım alanlarından birisi de tarımsal uygulamalardır. Tarımsal biyoteknoloji, bitki biyoteknolojisi, yetiştiriciliği ve ıslahı ile uğraşanlar için yeni ve oldukça geniş bir çalışma alanı oluşturmıştır. Bu nedenle moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen transferi yöntemleri hızlı bir gelişim içine girmiştir.

Özellikle tanımlamada kesin sonuç, uygulamada kolaylık ve ekonomiklik sağlayan belirteçlerin yenilerinin bulunmasına ve geliştirilmesine dair çalışmalar hızla sürdürülmektedir.

Yapılan değerlendirmeler sonucu Trabzon hurmasına yönelik bir seleksiyon çalışmasının ilde tam anlamı ile başlatılmadığı, fakat bu yöndeki girişimlerin yapıldığı belirlenmiştir (Bayazıt 2001).

Yapılan çalışma Hatay'ın çeşitli bölgelerinden alınmış bireylerden elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bölgede yetiştirilen Trabzon hurmalarının, akrabalık durumları hakkında bilgi vermesi açısından önem arz etmektedir.

Bu çalışma ile türün Hatay ili bazındaki dağılımı dikkate alınarak, olası çeşit ve tip zenginliği moleküler düzeyde DNA belirteçlerden RAPD

(Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği ile incelenerek, ele alınan popölasyonun genetik benzerlikleri ve farklılıkları araştırılmıştır.

Ölkemiz bir çok meyve ve sebze türünün anavatanı olup bunların yetiştiriciliğinde dünya sıralamasında önemli paylara sahiptir. Ancak türlere ait mevcut potansiyelimizin değeriendirilmesi, her bir genotipe ait özelliklerin belirlenerek, bu doğrultuda üretimde kullanılması ile orantılıdır. Bu amaca yönelik çalışmalarda ise, türlere yönelik seleksiyon çalışmaları ön plana çıkmaktadır.

Eğer söz konusu tür çok yıllık ve geniş adaptasyon alanlarına sahip ise, seçim çalışmalarındaki güçlükler o derece artmaktadır. Bu çalışmalar sonunda seçilen bireyin özellikle fenolojik açıdan benzerlikler göstermesi ve morfolojik karşılaştırmalarla kesin olarak birbirlerinden ayırt edilememeleri ise, seçim çalışmalarının en önemli dezavantajıdır. Bu nedenle ölkemizde çok yıllık bitkilerde yapılan bir çok seleksiyon çalışmasında tanımlama açısından kesin verilere ulaşılammamaktadır.

Yapılan kaynak taramalarından, ölkemizde Trabzon hurmasına ait seleksiyon çalışmalarının Karadeniz Bölgesinde tanımlanmış ve 44 tipin belirlenmiş olduğu anlaşılmaktadır (Onur ve Onur 1996). Ancak bu tiplerin genetik anlamda birbirlerinden farklılığına yönelik çalışmalara rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığı altında araştırma konusu olan Hatay ilinde, Trabzon hurması genetik farklılık ve benzerlikleri materyal toplama esnasında olası morfolojik farklılıkları da göz önüne alınarak değeriendirilmiş ve türde seleksiyon ve genetik tanımlama çalışmaları iç içe yürütölmüştür.

Çalışmanın önemini; ele alınan tiplerde seçim süresinin kısaltılması ve DNA düzeyindeki verilerle kesin kimlik tanımlarının belirlenmesi oluşturmuştur. Bu bölgede türde ileride yürütölecek seçim çalışmalarında da ön bilgi sağlayacaktır. Ayrıca bu çalışmada geliştirilen DNA izolasyon metodu ile kullanılan primerlerden uygun kombinasyonların belirlenmesi, türde az sayıda gerçekleştirilmiş (Nakamura ve Kobayashi 1993), (Luo *et al.* 1995) araştırmaları desteklerken, ölkemizde DNA düzeyinde yapılacak çalışmalarda öncölük sağlanması beklenmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

Belirteç, genetik ve moleküler açıdan tanımlandığında; DNA'nın bir parçasını, diğer bir deyişle belirli bir genle kalıtılan bir DNA parçasını ifade eder. Aslında tanımlanan bir gendir, ancak genomun belirli bir noktasını işaret ettiğinden belirteç denmiştir. Moleküler belirteçler, esas olarak kullanılan hücresel materyale göre değişim gösterir. Bu belirteçler protein ve DNA olabilir. Günümüzde kromozom haritalamaları ve klasik ıslah yöntemlerinin etkinliğinin artırılması olmak üzere gen kaynaklarının karakterizasyonu, evrimsel gelişim analizi, transformasyonda başarı düzeyinin belirlenmesi gibi konularda da hızla kullanıma girmişlerdir (Ergül 2000).

Populasyonların genetik yapısının belirlenmesi için yapılan ilk çalışmalar morfolojik özelliklere dayanmaktadır. Genetik çeşitliliğin tamamı morfolojiye yansımaz. Morfolojiden gelen bulgular her ne kadar populasyonların ayırt edilmesinde kullanılmışsa da, genotip- çevre etkileşimleri ve bir genin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi gibi durumlardan dolayı morfoloji yeterli olmamaktadır. Morfolojik karakterler kullanılarak yapılan çalışmalar günümüzde geliştirilmiş tekniklerle yapılan çalışmalara göre daha az sayıdadır. Yeni teknikler özellikle bitki ekolojisi araştırmalarının hızlanmasını sağlamıştır (Cruzan 1998).

Belirteçler iki grupta toplanır;

1. Protein belirteçler: İzoenzimler
2. Moleküler ya da genetik belirteçler: DNA belirteçleri (RAPD, RFLP, AFLP, SSR vb.)

2.1. Protein Belirteçler (İzoenzimler)

Protein ve DNA temelli belirteçler genel olarak moleküler belirteçler olarak adlandırılırlar. Kullanılmaya başlanmaları 1960'lı yıllar olup izoenzimler en yaygınlarıdır (Markert ve Moller 1959). Metabolizmada türe ve hücreye

özgü bir enzimin aynı biyokimyasal olayları katalize eden ancak değişik genler tarafından kodlanan, farklı elektrik yüklü çoklu formları izoenzim olarak tanımlanır (Rothwell 1988).

İzoenzim- protein belirteçlerin araştırılma tekniğinin esasını, bir enzimin uygun substrat ve kofaktörler ile gerçekleştirilen reaksiyon ürünlerinin, ürüne özgü uygun boyama ve elektroforez yöntemleri ile açığa çıkarılması oluşturmaktadır. İzoenzim analizleri bitki ve hayvan ıslahında, genetik yapının incelenmesinde, evrimsel akrabalıkların araştırılmasında, popülasyonlar arası genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan en hızlı ve etkili metotlardan birisidir (Ergül 2000).

Trabzon hurması anavatanının Uzak Doğu olmasından dolayı bitkiyle ilgili yapılan çalışmalar genellikle bu bölgede yoğunlaşmıştır. Literatürde, Trabzon hurması ile ilgili izoenzim çalışmasının bu bölgeye ait tanımlama çalışmaları için yapıldığı görülmüştür (Sugiura *et al.* 1988). Bunun üzerine DNA'ya dayalı teknikler üzerinde yoğunlaşmıştır.

İzoenzimler, morfolojik karakterlendirilmelere göre oldukça etkili olmalarına rağmen bazı dezavantajları vardır. Bunlar; sıcaklık, stres koşulları, hastalık gibi faktörlerden etkilenmeleri, etkili oldukları yer ve mevsimsel değişimlere göre farklılık göstermeleri ve izoenzim sistemlerinin (lokus ve allellerin) sayıca azlığıdır (Meredith 1992, Thomas *et al.* 1993).

Belirteçlerden izoenzimler, kalıtımda kodominant olup hem hızlı sonuç verir hem de ekonomiktirler. Bunların yanı sıra sınırlı düzeyde polimorfik bant eldesi ve her bir izoenzim belirteci için ayrı bir boyama işleminin zorunluluğu gibi dezavantajları da vardır (Bernatzky ve Tanksley 1989).

2.2. DNA Belirteçler

Bu belirteçler tanımlama çalışmalarında daha doğru ve net sonuçlar veren ve bitki ıslahında kullanılan belirteçlerdir. Bunlar aralarında; hibridizasyona dayalı DNA belirteçler, PCR (Polymerase Chain Reaction)'a dayalı

belirteçler ve ESTs (Expressed Sequence Tags) belirteçler olarak sınıflandırılırlar.

2.2.1. Hibridizasyona dayalı DNA belirteçler

Bu grupta yer alan belirteçler içerisinde en önemli olanı RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Enzimlerle Kesilen DNA Parçacıklarının Uzunluk Polimorfizmi) tekniğidir. Restiksasyon endonüklezlarla kesilen DNA'dan oluşan parçacıkların, agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak, 'southern blot' tekniği ile uygun bir membrana aktarılması ve radyoaktif işaretlenmiş bir prob ile hibridizasyonunun yapılarak, bitki tür ve çeşidine özgü kesimleme bantlarının belirlenmesi, yöntemin aşamalarını oluşturmaktadır (Ergül 2000).

RFLP belirteçleri izoenzim belirteçler bulunan bir çok dezavantaja sahip olmamasına rağmen, çok pahalı ve yoğun işgücü gerektiren bir teknik olması ve çoğunlukla cDNA (Bir mRNA ürünü kodlayan dizilere komplementer DNA) problemleri kullanılması nedeniyle, genomda kodlama bölgelerinin çoğunlukla sınırlı kalması ve radyoaktif madde kullanma zorunluluğu gibi dezavantajları vardır (Malyshev ve Kartel 1997).

Bireyler arasındaki genomik farklılığın yanında, kesimleme bölgesinde meydana gelebilecek bazı değişimleri (mutasyon vb.), metilasyonlar ile eşit olmayan crossing-over ve replikasyon kaymaları polimorfizme neden olan diğer sebeplerdir (Chao *et al.* 1989).

Tekniğin en önemli aşaması problemlerin seçilmesidir. Bu amaçla rastgele genomik veya cDNA kütüphanelerinden oluşturulan homolog ve heterolog problemler kullanılmaktadır (Striem *et al.* 1990, Gogorcena *et al.* 1993, Kochert 1994).

Trabzon hurmasında daha önce yapılmış mitokondrial DNA (mt DNA) ve kloroplast DNA (cp DNA)'sında yapılan RFLP çalışmalarında 16 örneğin filogenetik ilişkisi ve evrimsel bağlantıları tespit edilmiştir (Nakamura ve Kobayashi 1993).

2.2.2. PCR (Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)’a dayalı DNA belirteçler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu; spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. PCR tekniği ile istenilen genler yada DNA dizilerinin replikasyonu hızlandırılmış bir şekilde gerçekleşir. Yaklaşık 30 döngü sonunda istenilen DNA milyarlarca kez kopyalanmış olur. PCR tekniği DNA’ya dayalı belirteçlerin geliştirilmesine temel olmuştur. (Mullis *et al.* 1986). Günümüzde uygulama ve temel prensipleri itibari ile çok değişik PCR belirteçler bitki ıslahında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları;

- AFLP(s) (Amplified Fragment Length Polymorphism(s)- Çoğaltılmış DNA Parçacıkları Büyüklüğü Polimorfizmi)
- SSR (Simple Sequence Repeats- Basit Dizi Tekrarları)
- SCAR(s) (Sequence Characterized Amplified Region(s)- Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Dizi Bölgeleri)
- CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence- Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler)
- RAPD(s) (Random Amplified Polymorphic DNA(s)- Rastele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

AFLP(s) (Amplified Fragment Length Polymorphisms(s)- Çoğaltılmış DNA Parçacıkları Büyüklüğü Polimorfizmi)

Kesimleme enzimleri ile kesilmiş DNA parçalarının selektif amplifikasyonuna dayanmaktadır. AFLP; PCR ile RFLP tekniğinin kombinasyonudur. Primerler hem diziye özgü hem de rastgele olabilir. Tekniğin uygulama aşamaları şöyledir;

1. DNA spesifik kesimleme enzimleri ile (ECoR1/ Mse I) kesilir. Kesilen parçalar biyotinle işaretlenmiş iki adaptör ile bir DNA ligaz vasıtası ile birleştirilir.
2. PCR ile yapılandırılan adaptörlere uygun primerler ve kesimleme fragmentler bir ön çoğaltma işlemine tabi tutulur.

3. Radyoaktif olarak işaretlenen özel primerler ile gerçek amplifikasyon sağlanır. Sonuçlar poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenir. Poliakrilamid jel bir baz uzunluğunu dahi ayırt edebilecek niteliktedir. Görüntülemeye gümüş boyama da kullanılabilir (Ergül 2000).

SSR (Simple Sequence Repeats- Basit Zincir Tekrarları)

DNA'da sık tekrarlayan basit dizilere verilen diğer bir isim de mikrosatellitlerdir. Mikrosatellitler, 20 kb uzunluktaki tekrar üniteleri içerir. Ökaryotik kromozomlarda yaygın şekilde bulunurlar. $(GA)_n$, $(CA)_n$, $(AT)_n$, $(ATA)_n$, $(CTT)_n$, $(GATA)_n$ gibi çekirdek dizileri içerir. 'n' değeri ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. Tekrarlı bölgelerin her iki yanındaki dizilere komplementer primer kullanılarak bu bölgeler çoğaltılırlar. Ard arda tekrarlanan zincir elemanı sayısındaki fark bireyler arasındaki farkı belirler. Lokusa özgü olmaları tercih sebebidir (Weising *et al.* 1995).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region(s)- Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Dizi Bölgeleri)

Belirli büyüklükteki bir RAPD bandının klonlanması ve uç bölgelerinden dizi belirlendikten sonra, bu fragmente yönelik orijinal RAPD primerini de içeren, primer çiftleri ile geliştirilen kodominant belirteçlerdir (Paran ve Micheltore 1993).

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence- Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler)

Kesilmiş çoğaltılmış polimorfik diziler olup, PCR ürünlerinin kesimlenmesi ile oluşturulmuş DNA parçalarının uzunluğundaki değişimlerle saptanan genetik varyasyondur. Kodominant belirteçlerdir (Staub *et al.* 1996).

RAPD(s) (Random Amplified Polymorphic DNA(s)- Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA)

PCR'a dayalı belirteçler başlangıçta dizisi bilinen DNA bölgelerini çift primer kullanmak suretiyle çoğaltma temeline dayanıyordu. Daha sonraları dizilerin belirlenmesinde bazı problemlerin ortaya çıkması, genom boyunca kısıtlı bölgelerin dizilerinin bilinmesi gibi dezavantajlardan dolayı zamanla oligonükleotidlerden (primerlerden) daha pratik bir şekilde yararlanma yoluna gidilmiştir. Bu amaçla RAPD tekniğı geliştirilmiştir (Williams *et al.* 1990).

Bu teknikte rastgele seçilen primerlerin (oligonükleotidlerin) genomik DNA üzerinde birbirine karşıt noktadaki komplementer bölgeleri bulunur. Bu ara bölge çoğaltılarak bireyler arasındaki polimorfizme bakılır. Diğer PCR uygulamalarında genellikle iki primer kullanılırken RAPD'de bir tane primer kullanılır. PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulanır (Welsh ve McClelland 1990).

Günümüzde Trabzon hurması ile ilgili yapılan RAPD çalışmaları oldukça sınırlı sayıdadır. Bunlardan bir tanesi Trabzon hurmasının iki türü olan *Diospyros kaki* ve *Diospyros lotus* OPA-6 ve OPA-8 oligonükleotidleri tarafından iki tür DNA düzeyinde ayrılmıştır (Luo *et al.* 1995).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise RAPD belirteçleri kullanılarak Karadeniz Bölgesi'nde bulunan 7 bireyin ve Hachia ile Fuyu çeşitlerinin genetik benzerlik oranı ortaya konmuştur (Polat *et al.* 1999).

Bu çalışma, Hatay ilinde yapılan Trabzon hurmasına ait ilk çalışmadır.

RAPD belirteçleri ile çok yüksek düzeyde polimorfik bant elde edilebilir. RFLP'ye göre daha ucuz, hızlı bir teknik olması ve radyoaktivite gerektirmemesi ve çok az miktarda DNA gerektirmesi gibi özelliklerinden dolayı gen haritalarının çıkarılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Grattapaglia *et al.* 1992, Paran ve Michelmore 1993, Hemmat *et al.* 1994, Malyshev ve Kartel 1997).

Tekniğin temel prensibi; PCR optimizasyonunu sağlamak, uygun primer seçmek ve agaroz jelinde görüntülenen bantlar içerisinde kuvvetli olanları değerlendirmeye almaktır. Bir çok değişik bitki örneğinde denenmiş bir tekniktir (Waugh ve Powell 1992, Ergül *et al.* 2002, Aras 2003).

Tekniğin avantajları sayesinde bir çok bitkinin tür içi genetik yakınlıkları araştırılmıştır. Bunlara örnek olarak, domates (Williams ve Clair 1993), arpa (De Bustos *et al.* 1998), üzüm (Ergül ve ark. 2002), kuşburnu (Aras 2003) ve güllerde genetik haritalama (Debener ve Mattiesch 1999), ladin (Arcade *et al.* 2000), çam (Costa *et al.* 2000) verilebilir.

RAPD tekniği uygulanması başlıca iki aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar DNA ekstraksiyonu ve PCR aşamalarıdır.

DNA izolasyonu (Ekstraksiyonu)

DNA belirteçlerle yapılan her türlü çalışmada olumlu sonuç alabilmek için materyalden uygun kalite ve miktarda DNA izolasyonu (ekstraksiyonu) yapmak gerekir. Materyalin saflığı bireyden bireye değişebileceğinden, her birey için gerekli olan ekstraksiyon yöntemi dikkatlice seçilmelidir. Materyal polifenolik bileşikler ve polisakkaritlerce zengin ise saflaştırılması daha zor olacaktır. Yeterince saf olarak izole edilemeyen DNA zamanla kaybolacaktır.

Bitki DNA'sı ekstraksiyonu için en çok kullanılan yöntemler; Muray ve Thompson (1980), Dellaporta *et al.* (1983), Doyle ve Doyle (1987), Lodhi *et al.* (1994), Kim *et al.* (1997) ve Lefort *et al.* (1998)'dir.

Trabzon hurması polifenolik maddelerce zengin bir bitki olduğundan bitkinin saf bir şekilde DNA izolasyonun gerçekleşmesi her DNA izolasyon metodu ile kolayca gerçekleşen bir durum değildir. Bu çalışmada gerek Trabzon hurmasında kullanılan, gerekse diğer bitki türleri için kullanılan DNA izolasyon yöntemleri PCR ürünlerinin net bir şekilde analiz edilmesini sağlayamamıştır. Bu nedenle çalışmada, var olan bazı DNA

izolasyon yöntemleri modifiye edilerek bu bitkiye uygun bir yöntem geliştirilmiştir.

PCR aşamaları

PCR tekniğinde genomik DNA tüpte çoğaltılır. Bu çoğaltma, yani amplifikasyon işlemi için genomik DNA; primer, $MgCl_2$ dNTP karışımı, DNA polimeraz enzimi ve uygun bir tampon çözeltinin varlığında PCR tekniği ile çoğaltılır. Primerin genomik DNA üzerinde komplementer bölgeyi bulabilmesi için uygun bir bağlanma sıcaklığının sağlanması gereklidir. DNA sentezi bir sonraki primerin bağlandığı noktaya kadar devam eder. Böylece primerlerin bağlandığı genomik DNA'nın parçası çoğaltılmış olur. Polimorfizmler; amplifikasyon bantlarının varlığına ya da yokluğuna göre belirlenir. Bu, RAPD bantlarının dominant olduğu anlamına gelir. Primerlerin seçiminde ya da dizaynında DNA problemlerine ya da sekansının bilinmesine gerek yoktur. Çoğaltma rastgele gerçekleşir. Hibridizasyon olayı olmadığı için herhangi bir blotlama işlemine gerek yoktur. Radyoaktif madde kullanımını gerektirmez. Hızlı ve pratik bir yöntemdir. RAPD tekniğinin rastgele olması tekniğin tekrarlanabilirliğini zorlaştırır. Bunun için şartları olabildiğince değiştirmeden tekrarlamak gereklidir.

RAPD belirteçlerle polimorfizmi ortaya çıkaran bantların tespit edilmesi için PCR için gerekli olan her parametre çok iyi optimize edilmelidir. Optimizasyon işlemleri bitki türüne göre oldukça değişiklik göstermektedir

Primer bağlanma bölgelerinin moleküler yapısı

Kullanılan bazı PCR uygulamalarının aksine RAPD'de kullanılan primer sadece bir tiptir. Bu primer genellikle 9-10 baz uzunluğundadır. Rastgele seçilir. PCR sırasında genomik DNA'da karşıt iplikçiklerde yaklaşık 200-200 bp'lik mesafedeki iki noktada komplementerini bulması ile gerçekleşir (Tingey *et al.* 1992).

Uygun PCR döngülerinin oluşturulması

Bir PCR döngüsü; DNA çift sarmalının ayrılması (denaturasyon), primerlerin bağlanması (annealing, primer binding), yeni DNA iplikçığının sentezi (extension) aşamalarından oluşur. Primerlerin rastgele oluşundan dolayı bağlanma sıcaklığı (T_m)'nın belirlenmesi oldukça kritik bir noktadır. Bu sıcaklığın belirlenmesinde primerin uzunluğu, GC içeriği, ve enzim ile beraber kullanılan tampon çözeltinin tuz konsantrasyonu etkilidir (Yu *et al.* 1993).

Amplifikasyon koşullarının belirlenmesi

Yöntemin en önemli aşamasıdır. Diğer belirteçlerin kullanımı açısından da PCR tekniğinin kavranması önemlidir. Bu ise, amplifikasyonun gerçekleştiği kalıp DNA başta olmak üzere, kullanılan her bir öğenin (primer, magnezyum klorid ($MgCl_2$), deoksitrikleotid trifosfat (dNTP), DNA polimeraz (Taq polimeraz ve tampon çözelti oranlarının), kullanılan bitki türü ve çalışma koşullarına göre optimum olarak belirlenmesi ve PCR uygulamalarında sık karşılaşılan bulaşma (kontaminasyon) nın önlenmesi amacıyla, her uygulamaya yönelik kontrol (negatif kontrol) kullanımı sağlanmalıdır (Ergül 2000).

Yüksek konsantrasyonlarda kullanılan DNA, amplifikasyon ürünlerinde 'smear' olarak adlandırılan bantların birbiri üzerinde yığılarak netliğinde bozulmaları artırırken, düşük konsantrasyonlar, sonuçların tekrar edilebilirliğini engellemektedir. Primer konsantrasyonu da DNA konsantrasyonuna benzer bir etki göstermekte, yoğun konsantrasyonlarda smear şeklinde bantlarla karşılaşılırken, düşük konsantrasyonlarda bantlara ait amplifikasyon oranı azalmaktadır. $MgCl_2$ optimumun üzerindeki konsantrasyonlarda, bantlar arasında farklı amplifikasyon derecelerine neden olurken, dNTP özellikle düşük konsantrasyonlarda bant parlaklıklarını azaltmaktadır. DNA polimerazın kullanımı ise diğer komponentlerin oranlarına uygun şekilde ayarlanmalıdır (Welsh ve McClelland 1990, Weeden *et al.* 1992, Ellsworth *et al.* 1993, Levi *et al.* 1993, Muralidharan ve Wakeland 1993).

Primer dizilerinin belirlenmesi

RAPD tekniğın primer dizilerinin belirlenmesi açısından diğerk PCR belirteçlere göre daha hassastır.

Kullanılan primerlerin uzunluğu 9-10 baz olmakla beraber polimorfizm oranını artırmak amacıyla kullanılan ve RAPD ile aynı yöntem aşamalarında gerçekleştirilen 'DNA amplified fingerprinting (DAF)' belirteçlerde kısa primerlerin (5-8) baz (Caetano-Anolles *et al.* 1991) veya değişik haritalama ve parmak izi analizlerinde 17-24 baz uzunluğuında (Ye *et al.* 1996) primerlerin kullanıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır.

RAPD tekniği primer dizilerinin uzunluğu açısından diğerk PCR belirteçlere göre daha hassaslık gösterir. Bu teknikte kullanılan 9-10 bazlık primerler seçilirken; G+C içeriğinin % 50- 80 olması, 6 bazdan uzun palindrom dizi içermemeleri ve primerin 3' ucunun tamamlayıcı olmaması en önemli faktörlerdir (Williams *et al.* 1993)

Genom büyüklüğü ve amplifikasyon ürünlerinin oranı

Bir primere ait bağlanma bölgeleri ve bu bölgelerin amplifikasyonu, 'genom kompleksi' olarak adlandırılan genom büyüklüğü ve tekrar bölgelerinin çokluğu ile orantılı dşnlmekte ve daha kompleks genomların daha fazla RAPD fragmenti oluşturulması beklenmektedir. Ancak yapılan araştırma sonuçları çoğaltılan fragment sayısını, genom büyüklüğünden bağımsız olarak, PCR reaksiyonu sırasında primer bağlanma bölgelerinin birbiri ile olan yarışına dayandırmaktadır (Grattapaglia *et al.* 1992).

RAPD belirteçlerinin tekrarlanabilirliği

RAPD tekniğinin en önemli avantajı olarak, genom analizlerinde rastgele primerlerin kullanılması gösterilmektedir. Ancak, hem rastgele primer kullanılması hem de PCR aşamalarının çok hassas olması yöntem sonuçlarının tekrarlanabilirliğin araştırmalarını ön plana çıkartmaktadır. Bir

çok araştırmacı tarafından değişik faktörler kombine ve tek başına değerlendirilerek, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası uygulamalarla yöntem bu yönü ile araştırılmıştır.

Tekniğin uygulamadaki esas prensibi; uygun bir optimizasyon koşulu tespit edip bu koşula uygun primerleri seçmek ve sonuç değerlendirmelerinde amplifikasyonu iyi gerçekleştiren (kuvvetli bantları seçip zayıf bantları değerlendirme dışı bırakarak) bantları değerlendirmektir.

Sonuçların tekrarlanabilirliğine ait çalışmalarda bu temel prensip göz önüne alınmakta ve araştırmacıların hepsi kendi optimizasyonlarında, RAPD sonuçlarının tekrarlanabilirliğini çok iyi veya mükemmel olarak değerlendirmektedirler (Levi *et al.* 1993, Meunier ve Griment 1993, Colins ve Symons 1993, Ye *et al.* 1998). Tekrarlanabilirliğinin araştırma konularını ise; optimizasyonda yapılan değişiklik sonuçları oluşturmaktadır. Bunlar ise genel olarak 3 grupta toplanmaktadır;

- a) Reaksiyon karışımları,
- b) Farklı polimeraz zincir reaksiyonu cihazları,
- c) Bant okumaları ve sonuçların değerlendirildiği jel ortamlarıdır.

Reaksiyon karışımları kapsamında; DNA ekstraksiyonlarının tekrarı ve farklı miktarlarının etkisi yanında, değişik ticari DNA polimerazların etkileri de araştırılmıştır. Weeden *et al.* (1992), Ye *et al.* (1998) ve Vidal *et al.* (1999), tarafından gerek ekstraksiyon tekrarı gerekse farklı DNA miktarlarının etkileri sonuçlar üzerinde önemli bulunmamıştır.

Aynı optimizasyon koşulları ile, kullanılan cihazların tekrarlanabilirliği önemli ölçüde etkilediğini belirten Meunier ve Griment (1993)'e karşılık, Ye *et al.* (1998) primer/genotip kombinasyonlarının farklı cihazlarda aynı amplifikasyon ürünlerini verdiğini belirtmiştir.

Bant okuma ve jel ortamlarının tekrarlanabilirlik üzerindeki etkisi çeşitli yönleri ile araştırılmıştır. Weeden *et al.* (1992), bant okumalarında hata oranının % 2-7 olduğunu, zayıf bantların değerlendirmeye alınması

durumunda bu oranın artabileceğini belirtmiştir. Bunun yanında agaroz jel elektroforezi yerine, çözünürlüğü yüksek olan DGGE (Denature Gradient Gel Electrophoresis) veya TSGE (Temperature Sweep Gel Electrophoresis) kullanılması durumunda bant okumalarının kolaylaşacağı bildirilmektedir (Penner *et al.* 1996).

2.2.3. ESTs (Expressed Sequence Tags) belirteçler

EST belirteçler temel prensip itibari ile 150- 400 bp büyüklüğündeki mRNA'ların tamamı ya da belirli bir bölümüne yakın bir kısmına karşılık gelen cDNA klonlarının dizi analiz sonucu oluşturulmuş DNA belirteçleridir. Etkinliği çok yüksek bir tekniktir. Bu teknik tanımlamanın yanı sıra, haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır (Yamamoto ve Sasaki 1997).

2.3. Moleküler Belirteçlerin Biyokimyasal Belirteçlere Göre Avantajları

DNA belirteçleri diğer biyokimyasal belirteçlere göre önemli avantajlara sahiptir. Bunlar;

- Sonsuz sayıda DNA belirteç tespit edilebilir. Biyokimyasal belirteç sayısı ise izoenzim sayısı ile sınırlıdır.
- DNA belirteçlerinde, gen ürünleri değil DNA kullanıldığı için, bu belirteçler seçilen dokuya ya da bitkinin yaşam evresine göre değişiklik göstermez. İzoenzimlerin üretimi ise doku tipine göre oldukça farklılık göstermektedir.
- DNA belirteçleri ile çalışılırken, çevresel faktörler sonucu çok fazla etkilemezken izoenzimler ve biyokimyasal diğer belirteçler çevresel faktörlerden etkilenir

2.4. RAPD Tekniğinin Avantajları ve Diğer Moleküler Belirteçler ile Karşılaştırılması

RAPD tekniği ön bilgi gerektirmemesi, az miktarda DNA ile çalışabilmesinden dolayı basit ve hızlı bir tekniktir. Değerlendirme aşamasında radyoaktif madde kullanılması gerekmez. Bu teknik diğer tekniklere oranla yüksek düzeyde polimorfizm göstermekle beraber daha ekonomik bir tekniktir (Robinson ve Harris 1999).

Bazı durumlarda primerin hatalı bağlanmaları sonucunda istenmeyen bantlar oluşmaktadır. Bu durum RAPD tekniğinde karşılaşılan sorunlardan birisidir (Andersen 2000). RAPD analizlerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için PCR için gerekli maddeler ve uygun PCR koşullarının sağlanması çok önemlidir. DNA'nın saf olması, $MgCl_2$ konsantrasyonu, bağlanma sıcaklığı, primer seçimi, kullanılan DNA polimerazlar PCR için gerekli unsurlardır. Bu faktörlerin sağlanması sırasında ortaya çıkabilecek karışıklıklar istenmeyen bantların oluşmasına neden olabilir. Bazı RAPD sonuçlarında kalıp DNA ve primerin yanlış eşleşmesine rağmen bantlar görülmektedir. Bazı durumlarda bireyden DNA izole edilmesi sırasında bitkide simbiyoz yaşayan organizmalardan ve parazit yaşayan canlılardan DNA kontaminasyonu sonucunda anormal RAPD bantları ortaya çıkmaktadır (Wolfe ve Liston 1998). Ayrıca RAPD belirteçleri uzaktan akraba olan bireyler arasındaki genetik uzaklıkları eksik değerlendirebilmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

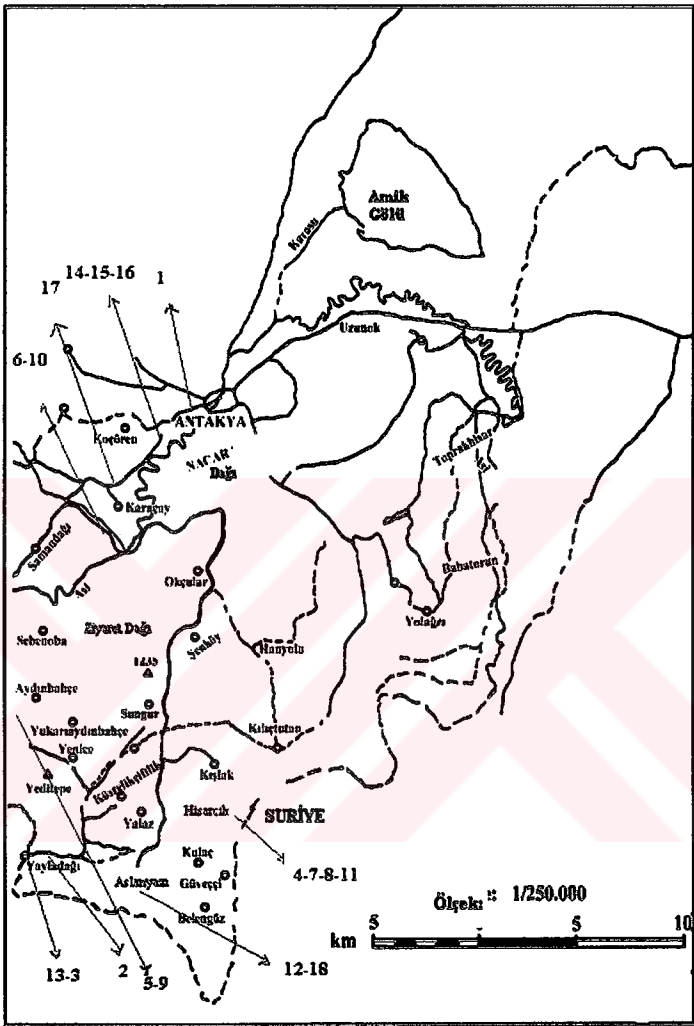
3.1. Materyal

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) yaprak materyali Hatay'ın çeşitli yörelerinden toplanmıştır. Çalışmada birbirinden farklı uzaklıkta 18 birey kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan bireylerin toplandığı yer ve deniz seviyesinden yükseklikleri çizelge 3. 1. 'de sunulmuştur.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan bireylerin yeri ve denize olan Yükseklikleri

Birey Numarası (D. kaki)	Yer (Antakya ili, Hatay ilçesi)	Deniz seviyesinden yüksekliği
1	Harbiye Şeyh Davut Caddesi. Antakya'ya 10 km.	142 m.
2	Kocaman köyü, Yayladağı. Yayladağı'na 30 km.	350 m.
3	Yayladağı merkez.	408 m.
4	Hisarcık Köyü. Antakya' ya 30 km.	703 m.
5	Karaköse köyü. Antakya' ya 40 km.	372 m.
6	Çögürlü Köyü. Antakya' ya 30 km.	24 m.
7	Hisarcık Köyü. Antakya' ya 40 km.	703 m.
8	Hisarcık Köyü. Antakya' ya 40 km.	703 m.
9	Karaköse Köyü. Antakya' ya 34 km.	372 m.
10	Çögürlü Köyü. Antakya' ya 30 km.	24 m.
11	Hisarcık Köyü. Antakya' ya 40 km.	703 m.
12	Aslanyazı Köyü. Antakya' ya 42 km.	630 m.
13	Yayladağı merkez.	408 m.
14	Güneysöğüt Köyü. Antakya' ya 6 km.	69 m.
15	Güneysöğüt Köyü. Antakya' ya 6 km.	69 m.
16	Güneysöğüt köyü, Antakya' ya 6 km.	69 m.
17	Uzunbağ Köyü. Antakya' ya 22 km.	20 m.
18	Aslanyazı Köyü, Antakya' ya 42 km.	630 m.



Şekil 3. 1. Bireylerin toplandığı Hatay ili; birey numaraları ve toplandıkları bölgeler

3.2. Yöntem

Araştırmada RAPD tekniği; DNA izolasyonu, PCR uygulamaları ve sonuçların değerlendirilmesi olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. DNA izolasyonu

PCR'a dayalı belirteçlerin tümünde olduğu gibi RAPD'de de teknik açısından iyi bir sonuç elde edebilmek için DNA'yı yeterli miktarda ve yeterli saflıkta elde etmek gereklidir. Ancak bazı bitkilere özgü olarak fazlaca bulunan, polisakkaritler ve fenolik komponentler, DNA ekstraksiyonu sırasında hücre patlatıldıktan sonra DNA'ya bağlanarak inhibe edici etki yaratmaktadır (Kim *et al.* 1997).

Çalışmada bazı DNA izolasyon yöntemleri denenmiştir. Bunlar; Doyle ve Doyle (1987), Kim *et al.* (1997) ve Lefort *et al.* (1998) dur. Bu DNA izolasyon yöntemleri aşağıda verilmiştir.

Doyle and Doyle (1987) DNA izolasyon yöntemi

- 0,5- 1,5 g yaprak havanda ezilir.
- Üzerine 7,5 ml ekstraksiyon çözeltisi eklenir.
- 30 ml hacimli deney tüpüne aktarılır.
- 60 °C'de 30- 60 dakika su banyosunda bekletilir.
- Kloroform- izoamil alkol çözeltisi eklenerek yavaşça ve çok defa karıştırılır.
- 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- Üst faz temiz tüpe aktarılarak, hacmin yaklaşık 2/3 katı soğuk izopropanol eklenir.
- Karıştırma işlemi sonunda tüpte toplanan DNA cam bir baget yardımı ile temiz tüpe aktarılır, üzerine 25 ml yıkama tamponu eklenir.
- Baget yardımı ile alınmazsa, 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Üst faz atılır ve üzerine 25 ml yıkama tamponu eklenir.
- Yıkama tamponunda 20 dakika bekletildikten sonra, tampondan alınır.

- Kurumaya bırakılır.
- Üzerine 1 ml çöktürme tamponu ve ardından RNaz A eklenir.
- Örnekler 2 hacim distile su ile sulandırıldıktan sonra son konsantrasyon 2,5 M olacak şekilde 7,5 M amonyum asetat eklenir ve karıştırılır.
- 2,5 hacim soğuk etanol eklenerek karıştırılır, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir
- Üst faz atılır, pellet TE çözeltisinde çözülür.

Çözeltiler

Ekstraksiyon çözeltisi	: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA % 2 CTAB, %2 β-merkaptoetanol
Kloroform-izoamil alkol	: 24/ 1 (hacim-hacim)
Yıkama tamponu	: % 76 Etil alkol, 10 mM amonyum asetat
Çöktürme tamponu	: 10 mM amonyum asetat, 0,25 mM EDTA
TE	: 10 mM Tris-Cl, pH 7,4 ve 1 mM EDTA, (pH 8,0)
RNaz A (Sigma R9009)	: 10 mg/ml

Kim *et al.* (1997) DNA izolasyon yöntemi

- 500 mg yaprak havanda ezilir. 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılır.
- Üzerine %1 β- merkaptotanol ve 300 µl ekstraksiyon çözeltisi eklenir.
- Oda sıcaklığında 1 saat beklenir.
- Son hacmin % 6'sı olacak kadar suda çözünebilen PVP, yarım hacim 7,5 M amonyum asetat eklenir.
- Buz üzerinde 30 dakika bekletilir.
- 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilir.
- Üst faz temiz tüpe aktarılarak üzerine 1 hacim izopropanol eklenir. 20 °C' de 30 dakika beklenir.
- 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, üst faz uzaklaştırılır ve DNA pelleti 500 µl TE tamponunda çözülür.
- 1 mg /ml RNaz A eklenir, 37 °C' de 15 dakika bekletilir.
- 1 hacim kloroform izoamilalkol eklenir.
- 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, pellet 1 ml % 80 etanolde yıkanır.
- Vakumla kurutulur.

- DNA pelleti TE çözeltisi ya da distile suda çözülür.

Çözeltiler

Ekstraksiyon çözeltisi	: 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, % 5 SDS, 200 mM Tris-HCl (pH 8,0)
TE	: 10 mM Tris- HCl (pH 8,1) ve 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
Kloroform-izoamil alkol	: 24/ 1 (hacim-hacim)

Lefort *et al.* (1998) DNA izolasyon yöntemi

- 0,1 g yaprak sıvı azot kullanılarak havanda ezilir.
- Üzerine 1 ml ekstraksiyon tamponu ve 10 µl β- merkaptoetanol eklenir.
- Karışım 1,5 ml' lik santrifüj tüpüne aktarılır.
- Karışım 65 °C'de 15 dakika su banyosunda bekletilir .
- 0,5 ml kloroform-izoamil alkol ile iyice karıştırılır (buz üzerinde tutulur).
- 14000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapılır. Santrifüj sonunda üst sıvıdan yaklaşık 0,8 ml yeni 1,5 ml' lik tüpe aktarılarak üzerine yaklaşık 0,8 ml izopropanol eklenir.
- DNA'nın çöktürülmesi amacı ile 15 dakika buz üzerinde tutulur.
- 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır, santrifüj sonunda üst sıvı uzaklaştırılır.
- 1 ml % 70'lik etanol eklenir.14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılır. Üst faz uzaklaştırılır.
- DNA 100 µl TE tamponunda çözülür.
- Her 100 µl solüsyon için 1 µl RNaz A eklenir ve 37 °C'de 15 dakika süre ile bekletilerek RNA uzaklaştırılır.

Çözeltiler

Kloroform: izoamil alkol	: 24/1 (hacim-hacim)
Ekstraksiyon tamponu	: 50 mM EDTA ve 50 mM Tris-HCL (pH 8), 4M LiCl, %1 CTAB, % 2 PVPP ve % 0,5 TWEEN 20 ilave edilir.

TE tamponu : 1 mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
RNaz A(Sigma R 9009) : 10 mg/ mL

Denenen bu yöntemlerin hiç birinde RAPD analizleri için yeterli miktarda ve saflıkta DNA elde edilememiştir. Bunun bir sonucu olarak çalışmada var olan yöntemler değiştirilerek *Diospyros kaki L.*'ye özgü bir DNA izolasyon yöntemi geliştirilmiştir. Kullanılan bu yöntem sayesinde yüksek kalitede, tahrip olmamış DNA izole edilmiştir.

Bu yeni yöntemin *Diospyros* türlerinde yapılacak diğer çalışmalara büyük ölçüde katkı sağlanması beklenmektedir.

Yeni geliştirilen DNA izolasyon yöntemi aşağıdaki gibidir;

- 300-400 mg yaprak sıvı azot kullanılarak havanda ezilerek eppendorf tüpüne alınır.
- Önceden ısıtılmış 800 µl ekstraksiyon tamponu eklenir.
- Her bir eppendorf tüpüne 1,5 µl RNaz A (10 mg/ml) eklenir.
- Örnekler önce oda sıcaklığında 15 dakika, sonra 65 °C' de 60 dakika bekletilir.
- İnkübasyon sonrasında bireyler oda sıcaklığına gelinceye kadar beklenir.
- Oda sıcaklığındaki bireylere 250µl, 5 M potasyum asetat eklenerek Buz üzerinde 30 dakika beklenir.
- Örnekler 14000 rpm (17000 g)' de 15 dakika santrifüj edilir. Üst faz temiz tüpe aktarılır.
- Üst fazın üzerine 500µl fenol, kloroform, izoamil alkol karışımı eklenir.
- Karışım oldukça yavaş 40-50 kere çalkalanır.
- Örnekler 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Üst faz atılır.
- 250 µl 0.3 M sodyum asetat ve % 100'lük etanol eklenerek -20 °C'de en az 40 dakika bekletilir
- 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- % 70 'lik etanol ile yıkanır.
- Pelletden etanolun uzaklaşması için tüpün kapağı açık olarak beklenir.
- Eğer bireyler yeterli saflıkta değil ise, ekstraksiyon aşamasına geri dönülerek aşamalar tekrarlanır.
- Pelletin uygun miktarda TE tamponunda çözünmesi sağlanır.
- DNA kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklanır.

Elde edilen DNA'nın konsantrasyonuna spektrofotometrede bakılmıştır (260/ 280 nm). Ayrıca % 1 oranında hazırlanmış agaroz jel ile elektroforezi yapılmış, bu sırada molekül ağırlığı bilinen (100 bp) bir DNA (marker) ile beraber koşturulmuştur.

Çözeltiler

Ekstraksiyon tamponu	: 100 mM Tris-HCl 50 mM EDTA (pH 8,0) 1.4 M NaCl, 2 % CTAB, 1 % PVPP eklenen çözeltiye 2 % β merkaptto etanol kullanım öncesi ilave edilir.
RNaz A (Sigma R9009)	: 10 mg/ml
Potasyum asetat	: 5 M
Fenol: kloroform: izoamil alkol	: 25:24:1 hacim olarak hazırlanır.
Sodyum asetat	: 0.3 M
TE tamponu	: 10 mM Tris-HCl ve 0,1 mM EDTA (pH 8,0)

3.2.2. PCR uygulamaları

En uygun amplifikasyon şartlarının belirlenmesi için bir çok ön deneme yapılmıştır. Bunun sonucunda elde edilen optimizasyon değerleri aşağıda verilmiştir.

Amplifikasyon koşulları

Laboratuvar aşamasında, uygun amplifikasyon koşullarını elde edene kadar, bazı ön deneme çalışmaları yapılmıştır ve en iyi sonucu veren son optimizasyon seçilmiştir.

Her bir tüpteki toplam madde miktarı 25 μ l olmak üzere 0.2 ml eppendorf tüpte;

200 ng genomik DNA
2.5 µl 10X ekstraksiyon tamponu
4 µl , 25 mM MgCl₂
2.5 mM dNTP (toplam)
100 ng primer
0.5 ünite Taq polimeraz
1 ünite Taq polimeraz kullanılmadan önce dH₂O ile 25 µl'ye tamamlanmıştır.

PCR döngü programı

- 94 °C'de 5 dakika, ön denatürasyonun ardından,
 - 94 °C'de 1 dakika, DNA çift iplikçığının ayrılması (denatürasyon)
 - 34 °C'de 1 dakika, primer bağlanması (annealing)
 - 72 °C'de 2 dakika yeni iplikçığın uzaması (extension)
 - 35 kez gerçekleşir
 - 72 °C'de 5 dakika son yazılım
- Şeklinde düzenlenmiştir. Reaksiyon MJ Research ve Teche Progene 'thermal cycler' (ısı döngü cihazı) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi

Amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi % 1.2' lik agaroz (% 0.6 agaroz + % 0.6 NuSieve GTG agaroz, FMC Corporation) jelinde yapılmış, jel 0.5 µg/mL etidium bromür ile boyanmıştır. 20 kuyudan oluşan jel tepsileri kullanılmış, bireylerin jele yüklenmesi sırasında yükleme tamponu kullanılmıştır (% 40 sükröz % 0.25 bromofenol mavisi). Elektroforez sırasında 1X TAE (Trisma Base, Glacial Acetic Acid, EDTA) tamponu ile yürütme gerçekleşmiştir. Elektroforez 100 volt 1.5 saat sürdürülmüştür. UV altında Polaroid type 667 siyah beyaz filmle görüntülenmiştir.

Primerler

Bu çalışmada bir çok primer denenmiştir. Ancak bu primerlerden, jelde net görüntü oluşturanlar değerlendirmeye alınmıştır. Net görüntü oluşturanlar çizelge 3.2.'de gösterilmektedir. Kullanılan primerlerin bir kısmı ise amplifikasyon vermediği için değerlendirilmeye alınmamıştır. Bu primerler ve dizileri ise çizelge 3. 3.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler ve baz dizileri

Primer	Dizi (5'-3')
OPA-01	CAG GCC GTT C
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-18	AGG TGA CCG T
OPA-19	CAA ACG TCG G
OPC-11	AAA GCT GCG G
OPC-12	TGT CAT CCC C
OPC-15	GAC GGA TCA G
OPC-20	ACT TCG CCA C
OPO-07	CAG CAC TGA C
OPO-10	TCA GAG CGC C

Çizelge 3. 3. Çalışmada denenilen ancak amplifikasyon göstermeyen primerler ve baz dizileri

Primer	Dizi (5'-3')
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-15	TTC CGA ACC C
OPA-17	GAC CGC ACC C
OPO-02	ACG TAG CGT C
OPO-04	AAG TCC GCT C
OPF-07	CCG ATA TCC C
OPF-06	GGG AAT TCG G

3.2.3. Sonuçların değerlendirilmesi

Polaroid film üzerinde görüntülenen amplifikasyon bantlarının okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirilmeye alınmıştır. Bantların okunması, çeşitlerde var olma ya da olmama durumuna göre bantlar 1 veya 0 şeklinde değerlendirilmiş ve benzerlik indeksleri oluşturulmuştur.

$$\text{Benzerlik indeksi} = \frac{a}{a+b}$$

İki birey arasındaki benzerlik karşılaştırmalarında, Sokal ve Sneath (1963) tarafından geliştirilen ve yukarıda belirtilen “Benzerlik İndeksi (B.I) ” formülü kullanılmıştır.

a: İki çeşit arasındaki homolog bant sayısı

b: İki çeşit arasındaki homolog olmayan bant sayısı

Çeşitler arasındaki genetik benzerlik ve farklılıklara dayalı dendrogram verileri ise, NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System, Version 1.80) (Rohlf 1990) programı kullanılarak “UPGMA cluster” analizi ile belirlenmiştir.

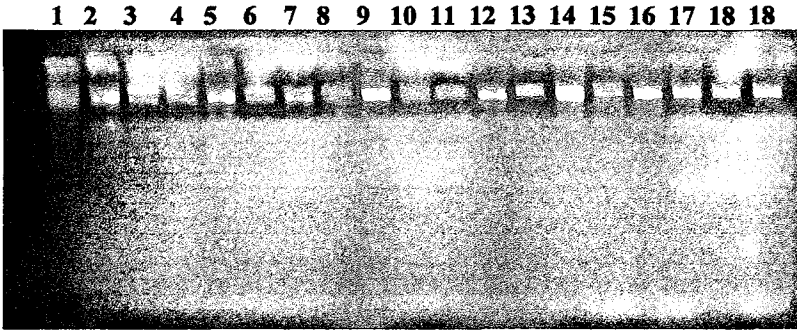
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA İzolasyonu

Çalışmada geliştirilen DNA izolasyon yöntemi ve denemesi yapılan diğer ekstraksiyon yöntemlerinin sonuçta elde edilen DNA miktarı bakımından karşılaştırılması çizelge 4.1. de verilmiştir. Şekil 4.1.'de ise araştırmada geliştirilen DNA ekstraksiyonun jel görüntüsü verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması

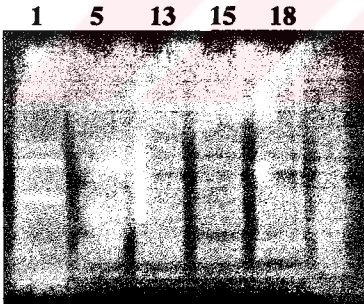
Ekstraksiyon Yöntemi	DNA miktarı mg g ⁻¹
Doyle and Doyle, (1987)	< 1
Kim <i>et al.</i> (1997)	≤1
Lefort <i>et al.</i> (1998)	< 1
Trabzon hurması için geliştirilen yöntem	20-35



Şekil 4. 1. Çalışmada geliştirilen DNA ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılan DNA' ların agaroz jeldeki görünümü

4.2. PCR Uygulamaları

Çalışmada genomik DNA ile yapılan PCR denemelerinde uygun optimizasyon koşulunun % 1.2'lik jeldeki görüntüsü şekil 4.2.'de verilmiştir.

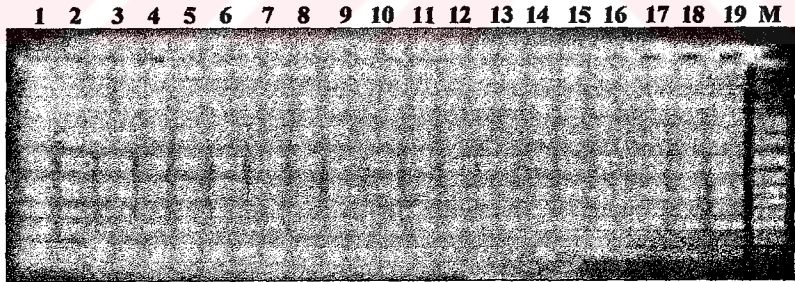


Şekil 4. 2. Uygun optimizasyon koşulları ile elde edilen agaroz jel (% 1.2) görüntüsü

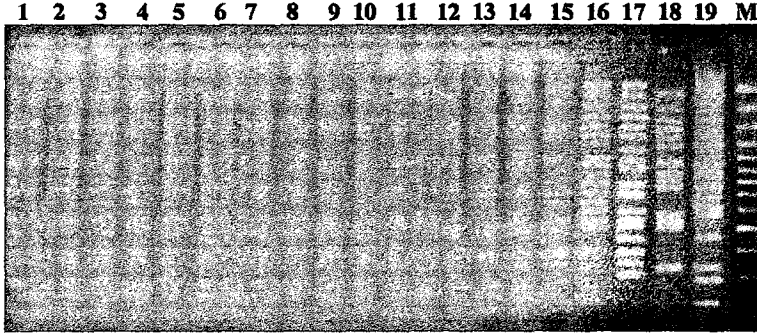
4.3. Benzerlik İndeksi ve Genetik İlişki Dendogramı

Benzerlik indeksi (B.I.) formülüne dayalı hesaplama yapılarak çıkan sonuçlardan, çeşitlere ait benzerlik indeksi ve buna bağlı olarak çeşitlere ait genetik ilişki dendogramı hazırlanmıştır. Sonuçlara bakıldığında; 13 ve 5 numaralı bireyler (Karaköse Köyü ve Yayladağı merkezden alınan bireyler) 0,611 ile en düşük benzerlik indeksini vermiştir. 15 ve 4 numaralı bireyler ise (Hisarcık Köyü Güneysöğüt Köylerinden alınan bireyler) benzer şekilde 0,639 ile düşük benzerlik oranını vermiştir. 2 ve 3 numaralı bireyler (Kocaman Köyü ve Yayladağı merkezinden alınan bireyler) 0,89 ile en yüksek benzerlik indeksini vermişlerdir (Çizelge 4.2.).

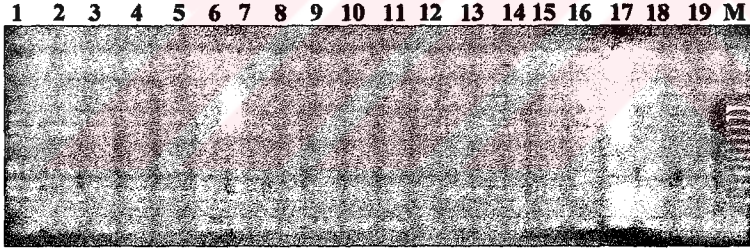
Dendograma göre; 2 ana grup belirlenmiştir. Birinci alt grupta 15. birey farklı bir alt grup daha oluşturmuştur. Bu alt grupta yer alan birey numaraları 15, 17, 18, 16 ve 13 olarak belirlenmiştir. Bu bireylerin benzerlik indeksleri 0,674 ve 0,784 arasında değişmektedir (Şekil 4.13). İkinci alt grupta ise büyük olan grup olup; 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 14, 4, 5, 3, 2, 1 numaraya sahip bireyler bulunmaktadır. Bu alt grup içerisindeki benzerlik indeksleri 0,646 ile 0,89 arasında değişmektedir. Alt grupta bulunan en yüksek benzerlik indeksi aynı zamanda çalışmada elde edilen en yüksek benzerlik indeksi olmuştur.



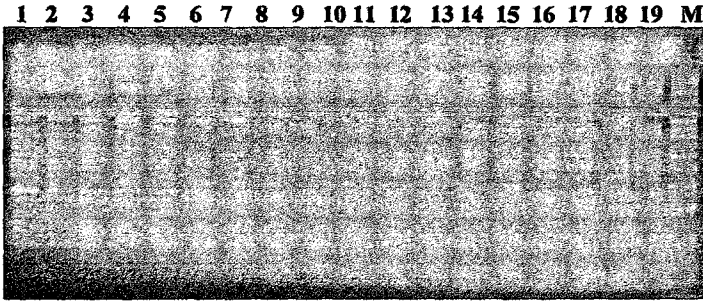
Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 01 (5'CAG GCC GTT C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bp DNA Ladder (Fermentas)



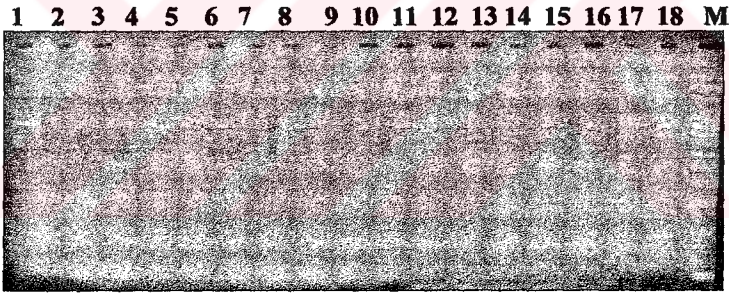
Şekil 4.4. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 03 (5'AGT CAG CCA A 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)



Şekil 4.5. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 18 (5' AGG TGA CCG T 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)

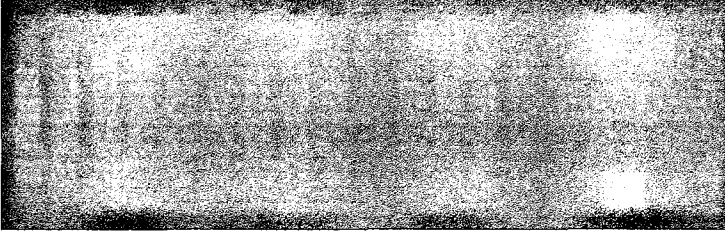


Şekil 4.6. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPA 19 (5'CAA ACG TCG G 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)



Şekil 4.7. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 11 (5'AAA GCT GCG G 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M

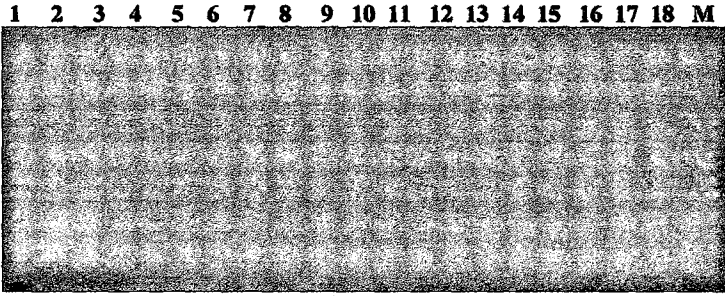


4.8. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 12 (5'TGT CAT CCC C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)

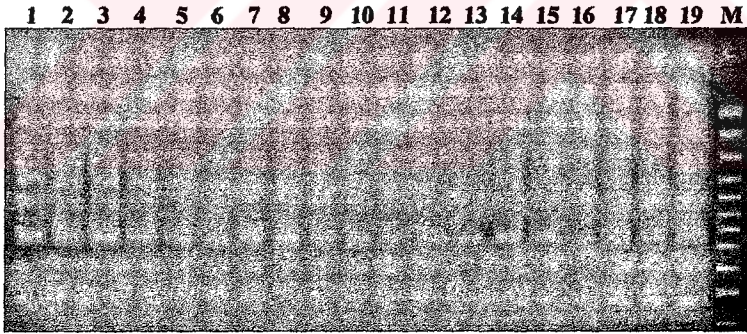
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M



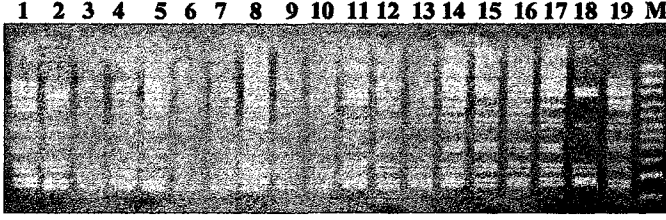
Şekil 4. 9. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 15 (5' GAC GGA TCA G 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç : 100 bç DNA Ladder (Fermentas)



Şekil 4. 10. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPC 20 (5'ACT TCG CCA C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)



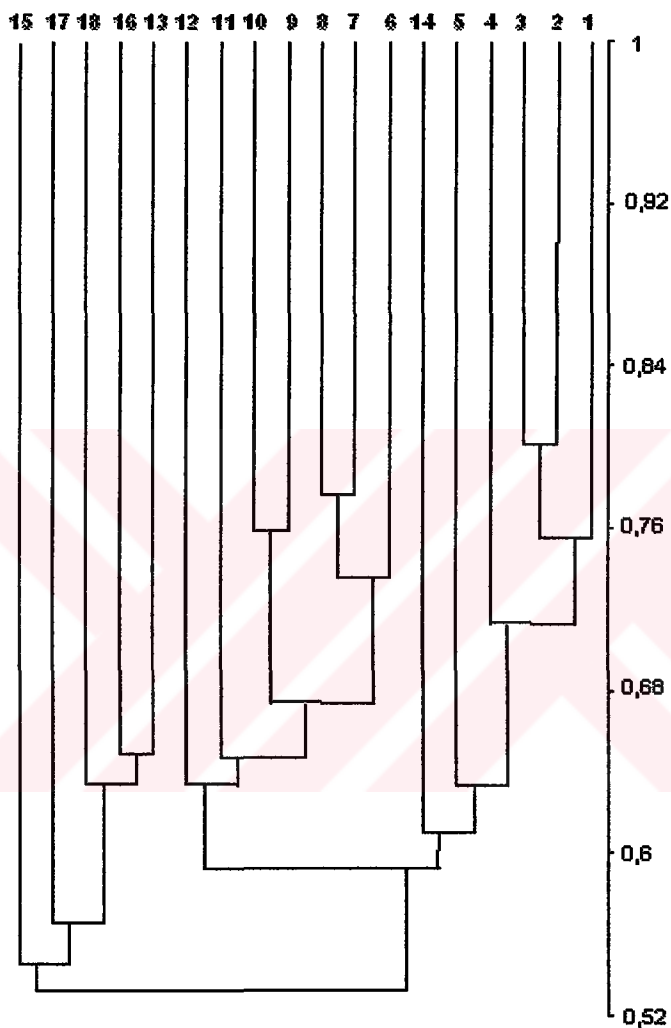
Şekil 4. 11. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPO 07 (5'CAG CAC TGA C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)



Şekil 4. 12. Araştırmada kullanılan Trabzon hurması bireylerinin OPO 10 (5'TCA GAG CGC C 3') primeri ile oluşturulan amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeli üzerindeki görüntüsü. Belirteç: 100 bç DNA Ladder (Fermentas)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1																	
2	0.85	1																
3	0.871	0.89	1															
4	0.808	0.828	0.86	1														
5	0.756	0.746	0.792	0.806	1													
6	0.766	0.786	0.819	0.804	0.773	1												
7	0.77	0.76	0.813	0.818	0.788	0.856	1											
8	0.734	0.724	0.769	0.792	0.75	0.84	0.874	1										
9	0.701	0.732	0.729	0.76	0.738	0.779	0.835	0.788	1									
10	0.735	0.714	0.771	0.763	0.762	0.782	0.837	0.81	0.863	1								
11	0.716	0.684	0.693	0.713	0.656	0.806	0.768	0.836	0.728	0.785	1							
12	0.646	0.677	0.696	0.714	0.66	0.764	0.758	0.761	0.792	0.814	0.766	1						
13	0.67	0.73	0.737	0.687	0.611	0.687	0.73	0.744	0.691	0.694	0.674	0.667	1					
14	0.743	0.762	0.787	0.76	0.738	0.739	0.752	0.766	0.776	0.768	0.75	0.72	0.772	1				
15	0.642	0.642	0.673	0.639	0.645	0.691	0.684	0.688	0.684	0.667	0.699	0.754	0.684	0.738	1			
16	0.674	0.684	0.723	0.67	0.667	0.68	0.705	0.708	0.684	0.72	0.732	0.691	0.788	0.779	0.763	1		
17	0.715	0.705	0.762	0.681	0.699	0.649	0.715	0.667	0.684	0.73	0.656	0.681	0.684	0.728	0.699	0.785	1	
18	0.66	0.701	0.709	0.698	0.684	0.687	0.701	0.746	0.67	0.695	0.717	0.656	0.784	0.694	0.674	0.77	0.695	1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Çizelge 4.2. Bireylere ait benzerlik indeksi



Şekil 4. 13. Bireylere ait genetik ilişki dendogramı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

DNA belirteçlerin kullanıldığı tüm araştırmalarda olduğu gibi RAPD belirteci ile yapılan bir araştırmada, saf ve yeterli miktarda DNA izole edebilmek araştırmanın ilk ve en önemli kısmıdır. Bu adım, çalışmanın ilerleyişinde oldukça belirleyici olmaktadır.

Literatürde bulunan, bitkilere özgü DNA ekstraksiyon yöntemleri her zaman her bitki için aynı sonuçları verememektedir. Bu durum bitkinin içerdiği fenolik bileşiklerden kaynaklanabilir. Bu çalışmada uygulanan bazı ekstraksiyon yöntemleri; Doyle ve Doyle (1987), Kim *et al.* (1997) Lefort *et al.* (1998) olmuştur. Bu yöntemlerden elde edilen DNA miktarları çizelge 4. 1.'de verilmiştir.

Çalışmada denenmiş olan yöntemlerden yeterli saflıkta ve miktarda DNA ekstraksiyonu yapılamamış olmasından dolayı var olan yöntemlerde modifikasyon yapılarak yeni bir DNA ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Yeni yöntemde, eski yöntemlere göre arındırma işlemi daha uzun tutulmuş, böylece bitkide var olan fenolik bileşiklerden de arındırılmıştır. Bundan sonraki Trabzon hurması ile yapılan çalışmalara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

RAPD analizi için ikinci önemli aşama, PCR aşamasıdır. En uygun PCR koşullarını elde etmek için DNA izolasyonu aşamasından sonra, bir seri optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen en uygun optimizasyon şartları ile çalışma yürütülmüştür. DNA polimerazın çalışma kapasitesini artırmak için ön denatürasyon uygulanmıştır.

PCR için kullanılan primerlerin seçiminde çeşitli denemeler sonucunda en iyi sonuç veren 10 tanesi seçilmiştir. Bunlar sırası ile; OPA-01, OPA-03, OPA-18, OPA-19, OPC-11, OPC-12, OPC-15, OPC-20, OPO-07 ve OPO-10 primerleridir. Bu oligonükleotid primerlerin sekansları çizelge 3. 2.'de verilmiştir. Çalışmada denenilen ancak PCR reaksiyonu ile sonuç vermeyen diğer primerler çizelge 3. 3.'de gösterilmektedir.

Kullanılan primerlerin amplifikasyon dereceleri ve bant sayıları farklılık göstermiştir. Tüm primerler polimorfizm göstermiştir.

Benzerlik indeksi (B.I.) formülüne dayalı hesaplama yapılarak, çıkan sonuçlardan çeşitlere ait benzerlik indeksi ve buna bağlı olarak, çeşitlere ait genetik ilişki dendogramı hazırlanmıştır. Yapılan bu araştırma sonucunda elde edilen benzerlik indeksi ve dendogram bulguları, çalışılan bireylerdeki genomik benzerlik ve farklılıklarını ortaya koymaktadır. Buna göre en düşük benzerlik oranı 0,611 ile 13 ve 5 numaralı bireyler (Karaköse Köyü ve Yayladağı merkez) dir. Bu bireylerin coğrafik olarak birbirinden uzakta olması bu durumu açıklayabilir. 15 ve 4 numaralı bireyler ise (Hisarcık Köyü Güneysöğüt köylerinden alınan bireyler) benzer şekilde 0,639 düşük benzerlik oranını vermiştir. Bu iki birey de, çalışmada kullanılan bireyler içinde birbirine uzak olanlardır.(Şekil 3.1.) 2 ve 3 numaralı bireyler (Kocaman Köyü ve Yayladağı merkezinden alınan bireyler) 0,89 ile en yüksek benzerlik indeksini vermişlerdir.Bu iki birey de aynı coğrafyada yetişmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, aynı ekolojide yetişen bireyler arasında daha yüksek benzerlik olduğu söylenebilir. Bireylerin toplandığı yer ve denize olan yükseklikleri çizelge 3.1. 'de verilmiştir.

Dendogram incelendiğinde, 2 grup oluşturduğu görülmüştür. Her bir grup 5 ve 13 birey içermektedir. Bahsedilen ilk 5 bireyli grupta bulunan bireyler; 15,17, 18, 16, ve 13 numaralı bireylerdir. Bu ana grup 15. birey ve diğerleri olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. 4 birey içeren ikinci alt grup ise sırası ile tek, tek, tek ve iki birey içerir. Bahsedilen, 5'li gruptaki en yüksek benzerlik indeksi; 16 ve 13. bireyler (Güneysöğüt Köyü, Samandağ ve Yayladağı merkez), en düşük benzerlik indeksi ise 17 ve 15. bireyler (Uzunbağ Köyü, Samandağ ve Güneysöğüt Köyü, Samandağ) olarak tespit edilmiştir.

13 bireyden oluşmuş ikinci grup ise; 11, 10, 9, 8, 7, 6, 14, 5, 4, 3, 2, 1 numaralı bireyleri ihtiva etmektedir. Bu grup iki ana gruba ayrılmaktadır. Ana grup sırası ile, 7 ve 6 bireyden oluşmuş iki alt gruba ayrılmıştır.

Bahsedilen alt gruplardan 7 bireyden oluşanı, sırası ile tek, tek, ikili, ikili ve tek bireyden oluşan gruplara ayrılmıştır. Diğer alt gruptaki 6 birey ise; tek,

tek, tek, ikili ve tek bireyden oluşan gruplara ayrılmıştır. Bahsedilen ana grupta bulunan en yüksek benzerlik indeksi 0,890 ile 11 ve 5 (Hisarcık Köyü, Antakya ve Karaköse Köyü, Samandağı) numaralı bireylerdir. En düşük benzerlik indeksi 0,656 ile 3 ve 2 (Yayladağ merkez ve Kocaman Köyü, Yayladağ) numaralı bireylerdir.

Dendogramda 5'li ve 13'lü iki grup incelendiğinde; coğrafik bir ayrımın söz konusu olduğu, aynı ekolojide yetiştirilen bitkilerde genetik benzerliklerin daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür. Ancak, Güneysöğüt Köyünde aynı ekolojide bulunan bireylerde nispeten düşük benzerlik indeksi olduğu da görülmüştür.

Morfolojik verilerden başka, benzer ekolojide yetiştirilen bireyler arasında genetik yakınlığın bulunabilmesi, tanımlamada morfolojiden gelen verilerin yetersiz olduğu ve DNA düzeyindeki tanımlamaların gerekli olduğunu düşündürmektedir. Bireye özgü polimorfizmi sağlayan DNA amplifikasyon ürünlerinin ortaya çıkarılması, diğer bir deyişle, diğer bireylerden farklı olarak çoğaltılmış bir bandın bulunması, tanımlamada yeterli olmaktadır. Bu yüzden RAPD tekniği uygulamada oldukça etkin bir yöntemdir. Farklı tanımlama yöntemlerinde ortaya çıkabilecek çelişkiler DNA'nın kullanıldığı yöntemlerle ortadan kalkmaktadır.

Diğer DNA belirteçlerinden hibridizasyona bağlı olanlar (RFLP ve AFLP gibi) RAPD tekniğine göre daha kısıtlayıcıdır. Örneğin bu belirteçlerden bazıları oldukça fazla bilgi birikimi ve tecrübe gerektirmektedir. Radyoaktif işaretleme gerekliliği yöntemin ekonomikliğini ve azaltmaktadır. Hibridizasyonda önemli bir unsur uygun probun bulunması olduğundan, bu faktör de kısıtlayıcı bir etmen olarak düşünülebilir. Diğer PCR'a dayalı belirteçlerden (Örneğin SSR) bazılarında ise, tanımlama için gerekli olan polimorfik bant eldesi oldukça zordur. Dolayısıyla yapılacak olan çalışmada mevcut koşullar; zaman, ekonomik olması beraber düşünülmesi gereken parametrelerdir.

Çalışmada kullanılan teknik olan RAPD, uygun optimizasyon şartları sağlandığı zaman, çok iyi sonuç verdiği bilinmektedir. Bu nedenle, bir çok araştırmacı tarafından sıklıkla tercih edildiği bilinmektedir.

Hatay ilinin ülke üretiminde büyük paya sahip olması, ve bu bölgede Trabzon hurmasına ait tanımlama çalışmalarının henüz yetersiz olması araştırmanın önemini ortaya koymaktadır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalara diğerk bir fayda da bu bitkiye özgü geliştirilen DNA izolasyon yöntemi olacaktır. lkemizde bulunan potansiyelin değerlendirilmesinde; bundan sonraki gelecek olan AFLP, RFLP, SSR gibi DNA belirteçleri ile yapılan tanımlama ve ışlah çalışmalarının önemi büyük olacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim. 1992. Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık D. İ. E. Yayınları No:1865. Ankara.
- Anonoim. 2002. Hatay Tarım İl Müdürlüğü Proje İstatistik Şube Müdürlüğü 2002 kayıtları.
- Aras, S. 2003. Molecular discrimination of some Dogrose (*Rosa* sp.) growing around Tokat region in Turkey by RAPD markers. *Biotech. and Biotech. Eq.* 17: 27- 34.
- Arcade, A., Anselin, F., Faivre Rampant P., Lesage M.C., Laurans F., Paques, L.E. and Prat. D. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European larch and Japanese larch. *Theor Appl Genet* 100: 299-307.
- Andersen, S.B. 2000. Random Amplified Polymorphic DNA web sitesi <http://www.agsci.kvl.dk/breed/kortlejl/background/markerty.pes/rapdmarkers.htm>. Erişim tarihi : 05.02.2001
- Bayazıt, S. 2001. **Sözlü görüşme.** Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Hatay.
- Bernatzky, R. and Tanksley, S.D. 1989. Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilization. In: Brown A.D.H, Marshall, D.R., Frankel, O.H., Williams J.T (eds). *The Use of Plant Genetic Resources*, Cambridge University Pres, Cambridge. Pp. 353-362.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9; 553-557
- Chao, S., Sharp, P.J., Worlend, A.J., Warham, E.J., Koeber, R.M.D. and Gale, M.D. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78;495-504.
- Colins, G.G. and Symons, R.H. 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rept.* 11 (2): 105-112.
- Costa, P., Pot, D., Dubos, C., Frigerio, J-M., Pionneau, C., Bodénès, C., Bertocchi, E., Cervera, M., Remington, D.L. and Plomion, C. 2000. A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theor Appl Genet* 100:39-48.
- Cruzan, M.B. 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, 79 (2); 400-412.

- Debener, T. and Mattiesch, L. 1999. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. Theoret. Appl. Genet.5; 891-899.
- De Bustos, A.C., Casanova, C., Soler, C. and Jouve, N. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). Theoretical and Applied Genetics, 96;101-111.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA mini preparation : version II. Plant Mol. Bio. Repr, 1; 19-21
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19; 11-15.
- Ellsworth, D.D., Rittenhouse , K.D. and Honeycutt, R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. Bio Techniques 14; 214-217.
- Ergül, 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera*. L. cvs) Genomik DNA parmak izi analizi ile moleküler karakterizasyon. A.Ü. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi ss. 86. Ankara
- Ergül, A., Aras, S., Söylemezoglu, G. ve Ağaoğlu, Y.S. 2002. Kalecik Karası üzüm çeşidi klonlarında AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Tekniği ile polimorfizmin belirlenmesi. Türkiye V. Bağcılık ve şarapçılık sempozyumu. 5-9 Ekim 2002. Kapadokya- Nevşehir.
- Gogorcena, Y., Arulsekar, S., Dandekar, A.M. and Parfitt, D.E. 1993. Molecular markers for grape characterization. Vitis 32; 183-185.
- Grattapaglia, D., Chapparro J., Wilcox, P., McCord, S., Werner, D., Amerson, H., McKeand, S., Bridgewater, F., Whetten, R., O' Malley, D. and Sederoff, R. 1992. Mapping in woody plants with RAPD markers: Application of RAPD technology and plant breeding. Plant Sci. Soc. Of Am. Madison, WI, pp: 37-40.
- Hemmat, A.M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G. and Lawson, D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. J. Hered.v 85:4-11.
- Kim, C.S., Lee, G.H., Shin, J.S., Chung, Y.S. and Hyung, N.I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nuc. Acid. Reserach, 25(5); 1085-1086.
- Kitagawa, H. and Glucina, P.G. 1984. Persimmon culture in New Zealand. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research, DSIR Information Series No: 159, Wellington, New Zealand 74 p.

- Kochert, G. 1994. RFLP Tecnology In: Phillips, R.L. and Vasil, I.K. (eds). DNA Based Markers in Plants. P.8-38. Kluwer Acedemic Publishers, USA.
- Lefort, F., Lally, M., Thompon, D. and Douglas, G.C. 1998. Morphological traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite Oaks (*Q. Robur L.*) AT Tullynally. *Silvae Genetica*, 47; 5-6. Ireland.
- Levi, A., Rowland, J. and Hartung, J.S. 1993. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA woody plants. *Hort Science* 28; 1188-1190.
- Lodhi, M.A., Ye G-N., Weeden, F. and Reisch, B.I. 1994. A Simple and effcient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Repr.* 12(1); 6-13.
- Luo, Z., Yomemori, K. and Syigura, A. 1995. Evaluation of RAPD analysis for cultivar identification of persimmons. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64(3): 535-541.
- Malyshev, S.V. and Kartel, N.A. 1997. Molecular markers in mapping plant genomes, *Molecular Biology*, 31(2); 163-171.
- Markert, C.L. and Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 45; 753-463.
- Meredith, C.P. 1992. DNA fingerprinting: What is the true identity of your grapes?. *Grapes Growing*. November-December p. 27-31.
- Meunier, J.R and Griment, P.A.D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144:373-379.
- Miller, E.P. and Crocker, T.E. 1992. Oriental Persimmons in Florida. Cooperative Extension Service, University of Florida, Ins. Of Food and Agr. Sciences. Gainesville, 15p.
- Muralidharan, K. and Wakeland, E.K. 1993. Concentration of primer and template qualitatively effects products in random amplified polymorphic DNA PCR. *Bio Techniques* 14; 362-363.
- Muray, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8(19); 4321-4325.
- Mullis, K.B, Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. and Erlick, H.A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51; 263-273.
- Nakamura, Y. and Kobayashi, S. 1993. DNA restriction fragment lenght variability in *Diospyros kaki* and some related *Diospyros* ssp. *Techniques on Gene Diagnosis and Breeding in Fruit Trees* (ed. T. Hayashi et al). Fruit Tree Research Station, Japan

- Onur, S. 1990. Trabzon Hurması. *Derim* 7(1); 4-47.
- Onur, S. 1995. Trabzon hurması çeşitlerinin Adaptasyonu. *Derim* 12(1):8-18.
- Onur, C. ve Onur, S. 1996. Karadeniz Bölgesi Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) seleksiyonu araştırma sonuç raporu.
- Özcan, M. 1994. Karadeniz Bölgesinin Trabzon hurması üretim potansiyeli. *O. M. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi* 9(3):133-147.
- Paran, I. and Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85; 985-993.
- Penner, G.A., Lee, S.J., Bezte, L.J. and Elgali, E. 1996. Rapid RAPD screening of plant DNA using dot blot hybridization. *Mol. Breeding* 2; 7-10.
- Polat, İ., Göçmen, M. ve Onur, C. 1999. Trabzonhurması (*Diospyros Kaki* L.) Tiplerinin RAPD Markörlerle Belirlenmesi. Bahçe Bitkileri Kongresi- Kızılcahamam. Sayfa; 22-26
- Rholf, F.J. 1990. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.8. Applied Biostatistics, New York.
- Robinson, J.P. and Haris, S.A. 1999. Amplified lenght polymorphisms and microsatellites phenetic perspective <http://www.vebdock.sub>
- Rothwell, N.V. 1988. Understanding Genetics. Fourth Edition, Oxford University Press, 703 p. UK.
- Sokal, R.R. and Sneath, P.N.A. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman, San Fransisco.
- Staub, J.E., Serquen, F.C. and Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *Hort. Science*, 31(5); 729-741.
- Striem, M.J., Spiegel-Roy, P., Ben-Hayyim, G., Beckmann, J. and Gidoni, D. 1990. Genomic DNA fingerprinting of *Vitis vinifera* L. by use of multi-loci probes. *Vitis*, 29; 223-227.
- Sugiura, A., Tao, R. and Tamana, T. 1988. Distinguishing between Japanese persimmon cultivars by means of polen isozymes. *Scientia Hort.* 36; 67-77.
- Şeker, M. ve Toplu, C. 2003. Trabzon hurması yetiştiriciliği. *Türk Tarım*.149; 35-37.
- Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, J.G.K. 1992. Gene analysis with RAPD markers. Application to breeding in Forestry and Horticulture. In: Joint Plant Breeding Symposia Series: Applications of RAPD technology plant breeding. P3-8, Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wisconsin, USA.

- Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P. and Scott, N.S. 1993. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 86; 173-180.
- Tuzcu, Ö. ve Yıldırım, B. 2000. Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) ve yetiştiriciliği. TÜBİTAK TARP yayınları, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana.
- Tuzcu, Ö. 1998. Subtropik Meyveler I Ders Notları. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi, Adana (Yayınlanmamış).
- Vidal, J.R., Moreno, S., Gogorcena, Y., Masa, A. and Oritz, J.M. 1999. On the genetic relationships and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD Markers. *Am. J. Enol. Vitic.* 50(1);69-74.
- Wagh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Focus*, 10, p. 186-191.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Keen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: Joint Plant Breeding Symposia Series: Applications of RAPD technology to plant breeding, p.12-17 Crop Sci.Soc. Amer. Madison, Wisconsin, USA.
- Weising, K. Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Pres, Boca Raton.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18(24); 7213-7218.
- Williams, J.K.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful markers. *Nucl. Acids Res.* 18(22); 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified by arbitrary primers are useful markers. In: Wu, R. (eds): *Methods in Enzymology, Recombinant DNA, Part I*, Vol. 218, p.704-740. Academic Press, San Diego.
- Williams, C.E and Clair, D.A. 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum* Genome, 36; 619-630.
- Wolfe, A.D. and Liston, D. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Plant Molecular Systematics II* Solits, D.E., Solits, Pres.
- Yamamoto, K. and Sasaki, T. 1997. Large-Scale EST sequencing in rice. *Plant. Mol. Biol.* 35; 135-144.

- Ye, G.-N., Hemmat, M.A. Lodhi, M.A., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1996. Lpng primers for RAPD mapping fingerprinting of grape and pear. *Bio Techniques* 20 (3); 368-371.
- Ye, G.-N., Söylemezoğlu, G., Weeden, N.F., Lamboy, W.F., Pool, R.M. and Reisch, B.I. 1998. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis* 37(1); 33-38.
- Yu, K.F., Deynze, A.V. and Pauls, K.P. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. In: Glick, B.R. and Thompson, J.E. (eds): *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. P. 287-301. CRC press.

ÖZGEÇMİŞ

1979 Mersin doğumlu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladı. 1997 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2001 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2001 yılında Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.