

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bazı *Vitis vinifera* Genotiplerinin RAPD-PCR Metodu İle Genetik Analizi  
ve IBA'nın Bu Genotiplerin Köklenme Başarısı Üzerine Etkisi.


Onur DİRİCAN

HAZİRAN 2011

**Biyoloji Anabilim Dalında** Onur DİRİCAN tarafından hazırlanan BAZI *VITIS VINIFERA* GENOTİPLERİNİN RAPD-PCR METODU İLE GENETİK ANALİZİ VE İNDOL-3 BÜTİRİK ASİT'İN BU GENOTİPLERİN KÖKLENME BAŞARISI ÜZERİNE ETKİSİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

  
Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.




  
Prof. Dr. Şükran ÇAKIR ARICA  
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : (Prof. Dr. Solmaz ERDEM)

Üye (Danışman) : (Prof. Dr. Şükran ÇAKIR ARICA)

Üye : (Yard. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN)

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. İhsan ULUER  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### BAZI *Vitis vinifera* GENOTİPLERİNİN RAPD-PCR METODU İLE GENETİK ANALİZİ VE İBA'NIN BU GENOTİPLERİN KÖKLENME BAŞARISI ÜZERİNE ETKİSİ

DİRİCAN, Onur

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Şükran ÇAKIR

Bu tez çalışmasında *Vitis vinifera* (asma)'nın önemli gen merkezlerinden biri olan İç Anadolu bölgesinin kültür formlarından olan Hasandede ve Kalecik karası çeşitlerinin sınırlı bir genetik varyasyona sahip olduğu için Anadolu'nun zengin asma biyoçeşitliliğinden yararlanılabilmesi maksadı ile bu çeşitlerin genetik benzerliklerinin RAPD-PCR tekniği kullanılarak belirlenmesi ve İBA (İndol Butirik Asit)'in, bu çeşitlerin köklenme başarısı üzerine bulguların tespit edilmesi hedeflendi.

RAPD-PCR tekniği, *Vitis* sp. Moleküler belirleyiciler veritabanı kullanılarak belirlenen primerler ile Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinden 25 farklı bireye uygulanmış, bireyler arasında ve çeşitler arasında 300-400bp büyüklüğünde bantlar elde edildi. Hasandede çeşidinden 4, Kalecik Karası çeşidinden 7 olmak üzere toplam 11 adet polimorfik lokus gözlemlendi. Bununla beraber İBA asit uygulanan çeşitlerin, farklı İBA derişimlerinde farklı gelişimler gösterdiği ve çeşitler arasında gelişim açısından farklılığın olduğu görüldü. İBA her iki çeşit açısından da kök gelişimini pozitif yönde etkilerken, Hasandede çeşidinde 6000ppm, Kalecik Karası

eşidinde ise 7500ppm derişimde optimum kök gelişimi gözlendi. Bu fark istatistiksel açıdan da ifade edilerek, çeşitler arasında karşılaştırma yapıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Vitis vinifera*, RAPD-PCR, IBA, Köklenme

## ABSTRACT

### GENETIC ANALYSIS OF SOME *Vitis vinifera* GENOTYPES BY RAPD-PCR METHOD AND THE EFFECT OF IBA ON ROOTING SUCCESS OF THESE GENOTYPES

DIRICAN, Onur

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Sukran ÇAKIR

In this thesis study, as Hasandede and Kalecik Karasi grapes, culture forms of one of the important gene centers of *Vitis vinifera* (grapevine), the Middle Anatolian region, have a limited genetic variation, determination of the genetic similarities of these species by using RAPD-PCR technique and IBA (Indole-3 Butyric Acid) and the determination of the findings concerning rooting success of these species were aimed in order to benefit from the rich grapevine diversity of Anatolia.

RAPD-PCR technique was applied to 25 different individuals of Hasandede and Kalecik Karasi grapes with the primers determined by using *Vitis sp.* molecular determiners database and bands with a size of 300-400 bp was gained among the individuals and species. A total of 11 polymorphic locus, 4 Hasandede type and 7 Kalecik Karasi type grapes were observed. Besides, it was observed that types which are applied different IBA concentrations show development difference among the IBA acid applied species. IBA positively affects the root development of both types. Optimum root development was observed for Hasandede type grape at 6000 ppm

concentration and for Kalecik Karasi type grape at 7500 ppm concentration. This difference was also stated statistically and comparison was made between the types.

**Keywords:** *Vitis vinifera*, RAPD-PCR, IBA, Rooting

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Şükran ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren Ar. Gör. Dr. Azize BUDAK YILDIRAN'a teşekkür ederim.

Çalışmamın moleküler düzeydeki kısmında benden yardımlarını eksik etmeyen, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji departmanından Sayın Yard. Doç. Dr. Murat AKKURT'a ve Mina SHIDFAR'a teşekkür ederim.

Çalışmamın istatistiksel analiz kısmında bana hep yardımcı olan, Ar. Gör. Dr. Emel KIZILOK'a teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılacak olan örneklerin toplanması konusunda bana destek olan; Ankara ili, Kalecik ilçesi, Gökdere köyü ve Kırıkkale ili, Hasandede belediyesi ve yardımsever halkına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her konuda bana destek olan anneme teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. <i>Vitis vinifera</i> L. 'nın Genel Özellikleri .....	4
1.2. DNA Belirleyiciler (DNA Markers) .....	5
1.2.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) .....	6
1.2.2. STS (Sequence Tagged Sites) .....	7
1.2.3. EST (Expressed Sequence Tags) .....	7
1.2.4. SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) .....	7
1.2.5. SSR (Simple Sequence Repeats) .....	8
1.2.6. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) .....	9
1.2.7. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) .....	9
1.2.8. rDNA-ITS (Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers) .....	10
1.2.9. DAF (DNA Amplification Fingerprinting) .....	10
1.2.10. AP-PCR (Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction) .....	11
1.2.11. SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) .....	11
1.2.12. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) .....	11
1.2.13. RAPD-PCR Tekniği (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ile Genetik Analiz .....	11
1.3. Çeliklerin Köklenmeleri Üzerine Hormonların Etkisi .....	20
1.4. Literatür Özeti .....	21
1.4.1. RAPD-PCR Çalışmaları .....	21
1.4.2. IBA ve Köklenme Başarısı Üzerine Çalışmalar .....	24
1.5. Çalışmanın Amaçları .....	28



<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	29
2.1. Örneklerin Toplanması .....	29
2.2. Köklendirme ve IBA Uygulamaları.....	29
2.2.1. Köklendirme Ortamı.....	29
2.2.2. IBA Uygulaması ve Çeliklerin Ortama Yerleştirilmesi.....	30
2.3. Bitkisel Dokudan DNA İzolasyonu.....	34
2.3.1. DNA İzolasyon Kiti Kullanılarak DNA Elde Yöntemi.....	34
2.3.2. Bitkisel Dokudan DNA İzolasyon Yöntemi.....	35
2.3.3 Uygun Ölçülerdeki DNA'ların Seçimi ve Saklanması.....	37
2.4. RAPD-PCR Uygulamaları.....	38
2.4.1. Primerlerin Seçimi.....	38
2.4.2. PCR Koşulları.....	38
2.5. Elektroforez Tekniği.....	40
2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	41
2.5.2. Agaroz Jelin Dökülmesi ve Örneklerin Yüklenmesi.....	41
2.5.3. Örneklerin Jelde Yürütülmesi.....	41
2.6. Verilerin Gözlemlenmesi ve Kaydedilmesi.....	41
2.7. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	42
2.7.1. Köklendirme Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	42
2.7.2. RAPD-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi.....	42
2.7.2.1. Allel Frekansları.....	42
2.7.2.2. Genetik Varyasyonların ölçülmesi.....	42
2.7.2.2.1. Lokusların Yüzdesi.....	43
2.7.2.2.2. Heterozigotluk.....	43
2.7.2.2.3. Allellerin Sayısı.....	44
2.7.2.2.4. Bir lokustaki Allellerin Etkili Sayısı.....	44
2.7.2.2.5. Shannon'un Bilgi Endeksi.....	44
2.7.2.3. Alt Populasyonların Gen Farklılıklarının Analizi.....	45

<b>3. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	47
3.1. IBA ’in Köklenme Başarısı Üzerine Bulgular.....	47
3.2. Çeşitlere Uygulanan RAPD-PCR ve Elektroforez Metodu Sonrası Elde Edilen Bulgular.....	59
3.2.1. Değerlendirilen RAPD Primerleri.....	59
3.2.2. Populasyonun Genetik Yapısı.....	59
3.2.3. Polimorfik Lokusların Yüzdesi.....	59
3.2.4. Heterozigotluk.....	60
3.2.5. Shannon ’un Bilgi Endeksi.....	60
3.2.6. Çeşitler içi ve Çeşitler Arasında Genetik Farklılıklar.....	60
3.2.7. Genetik Kimlik ve Genetik Mesafe.....	61
<b>KAYNAKLAR</b> .....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünyada bağ alanları ve üzüm üretimi bakımından ilk 10 ülkenin 1999 ve 2003 yıllarına ait verileri.....	1
1.2. Ülkemiz bağcılığının alan yönünden (ha) bitkisel üretim içindeki yeri .....	2
1.3. Tarım bölgelerinin bağ alanı ve üzüm üretimi .....	3
1.4. <i>Vitis vinifera</i> 'nın Taksonomik Sınıflandırması.....	5
2.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	38
2.2. Çalışmada kullanılan reaktiflerin miktarları.....	39
3.1. 4. Hafta sonunda yapılan kontrollerde, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin kök gelişim değerleri .....	47
3.2. 8. Hafta sonunda yapılan kontrollerde, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin kök gelişim değerleri.....	48
3.3. 12. Hafta sonunda yapılan kontrollerde, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin kök gelişim değerleri.....	48
3.4. IBA uygulaması sonucu, çeşitlerin kök uzunluğu gelişimi sonuçlarının, istatistiksel değerlendirilmesi (4.Hafta).....	51
3.5. IBA uygulaması sonucu, çeşitlerin kök uzunluğu gelişimi sonuçlarının, istatistiksel değerlendirilmesi (8.Hafta).....	52
3.6. IBA uygulaması sonucu, çeşitlerin kök uzunluğu gelişimi sonuçlarının, istatistiksel değerlendirilmesi (12.Hafta).....	52
3.7. IBA uygulaması sonucu, çeşitlerin kök adedi gelişimi sonuçlarının, istatistiksel değerlendirilmesi (4.Hafta).....	53
3.8. IBA uygulaması sonucu, çeşitlerin kök adedi gelişimi sonuçlarının, istatistiksel değerlendirilmesi (8.Hafta).....	53
3.9. IBA uygulaması sonucu, çeşitlerin kök adedi gelişimi sonuçlarının, istatistiksel değerlendirilmesi (12.Hafta).....	54

3.10.	Değerlendirmeye alınan 2 primerin tüm çeşitler ve bireylerde oluşturdukları RAPD bantlarının büyüklüklerinin yaklaşık değerleri (bp).....	59
3.11.	Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinde tüm lokuslar için genetik çeşitlilik istatistiğinin özeti ( $N_a^1$ ; Gözlenen allel sayısı, $N_e^2$ ; Allellerin etkili sayısı, $h^3$ ; Gen çeşitliliği, $I^4$ ; Shannon'un bilgi içeriği).....	60
3.12.	Hasandede ve Kalecik Karası ırklarında tanımlanmış istatistik Değerleri.....	60
3.13.	Hasandede ve Kalecik Karasında gen çeşitliliği analizi.....	61
3.14.	Hasandede ve Kalecik Karası ırkları arasındaki genetik kimlik ve mesafe değerleri Çaprazın üstünde Genetik kimlik ve çaprazın altında genetik mesafenin tarafsız ölçümü.....	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Güçlü ve zayıf bandın şematik gösterimi ve jel üzerindeki görünümü .....	17
2.1. IBA'in Hasandede ve Kalecik Karası kök gelişimi için oluşturulan cam ortamlar .....	33
3.1. Hasandede çeşidinin tüm haftalar sonucunda ki genel gelişim görüntüsü .....	49
3.2. Kalecik Karası çeşidinin tüm haftalar sonucunda ki genel gelişim görüntüsü .....	50
3.3. Hasandede ırkında OPA-01 primeri ile elde edilen RAPD Bantları.....	57
3.4. Kalecik Karası ırkında OPA-01 primeri ile elde edilen RAPD Bantları.....	57
3.5. Hasandede Çeşidi ırkında 4F primeri ile elde edilen RAPD Bantları.....	58
3.6. Kalecik Karası Çeşidi ırkında 4F primeri ile elde edilen RAPD Bantları.....	58

## KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BA	Butirik Asit
bç	Baz Çifti
cm	Santimetre
DİE	Devlet İstatistik Enstitüsü
DNA	Deoksi Ribonkleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
FAO	Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Konseyi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ha	Hektar
HD	Hasandede
IAA	İndol Asetik Asit
IAEA	Uluslararası Atom Enerjisi Birimi
IBA	İndol-3 Butirik Asit
kb	Kilo baz
KK	Kalecik Karası
L. (Linnaeus)	Linnaeus sınıflandırmasına göre
M	Molar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
$\mu$ L	Mikrolitre
NAA	Naftalin Asetik Asit
OD	Optik Densite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Eşleşmiş Polimorfik DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA çözeltisi
TE	Tris-EDTA tamponu
UV	Ultraviöle

## 1. GİRİŞ

FAO'nun 2003 yılına ait verilerine göre dünyada toplam 7.518.111 ha alanda bağcılık yapılmaktadır. Aynı yıla ait üzüm üretimi ise 60.883.454 tondur. Dünya bağcılığının alan ve üretim değerleri, beş yıllık zaman periyotları incelendiğinde, dünya bağ alanları %1,6 oranında artmaktadır. Alan yönünden ilk beş ülkenin sıralamadaki yerinin değişmediği, Türkiye'nin İspanya, İtalya ve Fransa'nın ardından 4. sırada yer aldığı, Türkiye'yi ABD'nin izlediği görülmektedir. İkinci grubu oluşturan beş ülke arasında Çin'in önemli bir artış ile (%109,8) altıncı sıraya yükselmesi dikkati çekmektedir. Daha sonra sırasıyla, İran, Romanya, Portekiz ve Arjantin birer sıra gerileyerek ilk on ülke içerisindeki varlıklarını sürdürmüşlerdir (Çizelge 1.1.). Diğer taraftan, Türkiye, ABD, Çin ve İran'da bağ alanlarında artış saptanırken; İspanya, İtalya, Fransa, Portekiz ve Arjantin'de ise azalmıştır. Bağ alanı yönüyle en fazla azalma Romanya'da (%14,1) olmuştur.

**Çizelge 1.1.** Dünyada bağ alanları ve üzüm üretimi bakımından ilk 10 ülkenin 1999 ve 2003 yıllarına ait verileri (Çelik ve ark. 2000,2005).

Ülkeler	Alan (ha)		Fark (%)	Ülkeler	Üretim (ton)		Fark (%)
	1999	2003			1999	2003	
1 İspanya	1 150 000	1 116 347	-2.9	İtalya	9 208 141	7 483 780	-18.7
2 İtalya	899 673	868 225	-3.5	İspanya	4 418 100	6 480 400	+46.7
3 Fransa	880 000	851 910	-3.2	Fransa	6 800 000	6 178 469	-9.1
4 Türkiye	560 000	565 000	+0.9	ABD	5 948 000	5 876 620	-1.2
5 ABD	350 000	385 706	+10.2	Çin	2 439 030	3 934 972	+61.3
6 Çin	182 600	383 000	+109.8	Türkiye	3 650 000	3 650 000	-
7 İran	261 169	273 000	+4.5	İran	2 315 258	2 525 000	+9.1
8 Romanya	260 000	223 379	-14.1	Arjantin	2 021 000	2 370 000	+17.3
9 Portekiz	252 000	220 000	-12.7	Avustralya	1 265 536	1 771 000	+40.0
10 Arjantin	205 000	201 000	-2.0	Şili	1 575 000	1 750 000	+11.1
<b>Dünya Toplamı</b>	<b>7 396 479</b>	<b>7 518 111</b>	<b>+1.65</b>	<b>Dünya Toplamı</b>	<b>58 119 555</b>	<b>60 883 454</b>	<b>+4.8</b>

Dünya ülkelerinin üzüm üretim değerleri incelendiğinde, farklı bir sıralama ile karşılaşılmaktadır. Ülkemiz alan sıralamasında farklı konumlarda olmakla birlikte, ilk 10 ülke içerisinde yer almaktadır. Türkiye 2003 yılı verilerine göre dünya üretiminde 6. sıradadır. 2000 yılı ile karşılaştırıldığında, üretim değeri itibariyle bir değişim olmadığı halde, Çin'in yükselişi nedeniyle ülkemizin genel sıralamadaki yeri bir sıra gerilemiştir. Genel olarak 1999 yılı ile karşılaştırıldığında, 2003 yılında dünya üzüm üretimi, %4,8 oranında bir artış göstermiştir (Çizelge 1.1.).

DİE'nün 2003 yılı değerlerine göre bitkisel üretime ayrılan alanlar içerisinde bahçe bitkileri ve bağ alanlarının yeri Çizelge 1.2'de verilmiştir. Bitkisel üretim için kullanılan alan 24.730.294 ha olup, bu alanın %13.74'ü üzerinde bahçe bitkileri tarımı yapılmaktadır. 2000 yılının verileri incelendiğinde, bağ alanlarının yaklaşık %2,0 oranında azaldığı görülmektedir. Buna karşılık, bitkisel üretim ve özel olarak bahçe bitkileri üretimi yapılan alanlar içinde bağların kapladığı alan çok önemli bir değişime uğramamış, bitkisel üretim alanları içerisindeki yeri %0,14 oranında artarken, bahçe bitkileri içerisinde ise %0,7 oranında azalmıştır.

**Çizelge 1.2.** Ülkemiz bağcılığının alan yönünden (ha) bitkisel üretim içindeki yeri (Çelik ve ark. 2000, 2005)

Yıl	Tarla Bitkileri		Bahçe Bitkileri				Toplam		Bah. Bitk. Oranı
	Ekilen	Nadas	Sebze	Bağ	Meyve	Zeytin	Genel	Bahçe Bit.	
1998	18 748 000	4 890 000	783 000	541 000	1 389 000	600 000	26 951 000	3 313 000	12.30
2003	16 328 450	5 004 782	817 852	530 000	1 424 210	625 000	24 730 294	3 397 062	13.74
Fark(%)	-12.9	+2.4	+4.5	-2.0	+2.5	+4.2	-8.2	+2.5	

Tarım bölgeleri düzeyinde bağ alanı ve üzüm üretimi incelendiğinde, uzun yıllardan bu yana olduğu gibi, 2003 yılında da bölge sıralamalarının değişmediği görülmektedir. Ülkemiz bağ alanlarının %33,0'üne sahip olan Ege bölgesi, üretimin % 43,3'ünü karşılayarak birinci sıradaki yerini sürdürmektedir. Bu bölgemizi, alan ve üretimin %19,5'ine sahip olan Akdeniz Bölgesi izlemektedir. Bağ alanlarının %18,2'sine sahip olan ve üretimin %13,8'ini karşılayan Orta güney tarım bölgesi ise üçüncü sıradaki yerini korumaktadır (Çizelge 1.3.).



**Çizelge 1.3.** Tarım bölgelerinin bağ alanı ve üzüm üretimi (Çelik ve ark. 2000,2005).

Tarım Bölgeleri	Alan (ha)					Üretim (ton)				
	1998	%	2003	%	Fark (%)	1998	%	2003	%	Fark (%)
1.Ortakuzey	44 743	8.3	36 187	6.7	-19.1	167 761	4.7	139 101	3.9	-17.1
2. Ege	154 196	28.5	174 698	33.0	+13.3	1 640 446	45.6	1 558 939	43.3	-5.0
3. Marmara	23 720	4.4	27 462	5.8	+15.8	215 195	6.0	213 857	5.9	-0.6
4. Akdeniz	108 823	20.1	103 172	19.5	-5.2	530 632	14.7	706 105	19.6	+33.1
5. Kuzeydoğu	1 899	0.4	1 657	0.3	-12.7	14 446	0.4	11 256	0.3	-22.1
6. Güneydoğu	70 260	12.9	69 882	13.2	-0.5	368 527	10.2	369 082	10.3	+0.2
7. Karadeniz	1 050	0.2	1 222	0.2	+16.4	6 585	0.2	8 727	0.2	+32.5
8. Ortadoğu	37 709	7.0	34 593	6.5	-8.3	132 476	3.7	96 305	2.7	-27.3
9. Ortagyney	98 598	18.2	81 127	15.3	-17.7	523 932	14.5	496 628	13.8	-5.2
<b>Toplam</b>	<b>541 000</b>		<b>530 000</b>		<b>-2.0</b>	<b>3 600 000</b>		<b>3 600 000</b>		<b>-</b>

Vavilov'un bitki gen merkezlerinin dünya üzerindeki dağılımı ile ilgili çalışması sonucunda belirlediği 8 gen merkezinden ikisi (Yakın Doğu ve Akdeniz) ülkemiz toprakları üzerinde kesişmektedir [1]. Diğer yandan, Anadolu yarımadasının kuzeydoğu bölümünü de içine alan Karadeniz ve Hazar denizi arasındaki bölge, asmanın en önemli türü olan *Vitis vinifera* L.' nin gen merkezi ve kültüre alındığı yöre olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, ülkemiz yaklaşık 6000 yıllık bir bağcılık kültürüne ve hem yabani asma (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) ve hem de kültür asmasına (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*) ait olmak üzere çok zengin bir asma gen potansiyeline sahiptir [2,3,4].

Ülkemizin hemen her bölgesinde, yabani asmalara rastlamak mümkündür. Bu populasyonlar içinde ve arasında zamanla meydana gelen doğal melezlemeler sonucunda daha da zenginleşen yabani asma gen potansiyelimizi oluşturan çeşit ve tiplerden pek çoğu, doğal olarak ya da çeşitli stres etmenleri nedeniyle elden çıksa da kendi içinde sürekli yenilenme sonucu yeni çeşit ve tipler ortaya çıkmaktadır. Ülkemizin değişik bölgelerindeki yabani asma populasyonlarını oluşturan genotiplerin belirlenmesi, koruma altına alınması, hem morfolojik olarak, hem de moleküler tekniklerden yararlanarak tanımlanmasına yönelik çalışmalara son yıllarda daha çok önem verilmiştir [5,6].

Bu alandaki en önemli çalışma, 1965 yılında Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nce başlatılan ve aynı kuruluştaki bir "Milli Koleksiyon Bağı" oluşturulmasına yönelik projedir. Ülkemizde yetiştirilen üzüm çeşitlerinin belirlenerek, anılan kuruluştaki bir araya getirilmesine yönelik çalışmaların sonucunda belirlenen 1606 üzüm çeşidinden 1100 adedi "Milli Koleksiyon Bağı"na aktararak koruma altına alınmış ve morfolojik tanımlamaları tamamlanmıştır. Bu değerli gen potansiyelinin ileri moleküler teknikler (AFLP, SSR, RAPD, vb.) kullanılarak tanımlanmasına yönelik çalışmalara da başlanılmıştır. Diğer yandan, ülkemizde ve dünyada yetiştirilen önemli üzüm çeşitleri ile Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesinin 5 Kalecik Bağcılık Araştırma İstasyonu'nda bir koleksiyon bağı oluşturmak üzere 1994 yılında başlatılan çalışma kapsamında koleksiyona alınan çeşit sayısı 130'a ulaşmıştır. Bu çeşitler üzerinde değişik amaçlara yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Benzer şekilde, hem Ziraat Fakültelerinin Bahçe Bitkileri Bölümleri'nce, hem de Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı araştırma enstitülerince, daha küçük çapta koleksiyonlar oluşturma yönündeki çalışmalar devam etmektedir.

Ülkemizde ticari olarak yetiştirilen ve standart olarak kabul edilebilecek niteliklere sahip üzüm çeşidi sayısı 70 – 80 dolayındadır (Çelik ve ark. 1998, Çelik 2002, Çelik ve ark. 2005). Buna karşın, ülkemizin değişik bölgelerinde yaygın olarak kullanılan asma anaçlarının sayısı 6'dır (41 B, 5 BB, 1103 P, 110 R, 99 R, Rup. du Lot). Ancak çeşit ve anaç standardizasyonu dinamik bir yapı göstermektedir. Çeşit sayısı tüketici tercihlerine, anaç sayısı ise bağ bölgelerinin iklim ve toprak özelliklerine göre değişebilmektedir [7].

### **1.1. *Vitis vinifera* L. 'nın Genel Özellikleri**

15-20m boylanabilen, tırmanıcı ve sarılıcı, yaprağını döken odunsu bir bitkidir. Kabuk uzunlamasına lifler halinde kavlar ve soyulur. Yapraklar almaçlı, 7-15cm, loblu, loblarında kenarları dişli, palmat damarlıdır. Üst yüzü koyu yeşil, alt yüzü açık yeşil, beyazımsı ve tüylüdür. Çiçekleri sarkan panikül (bileşik salkım) kurullar halinde, beyaz yeşilimsi renktedir. Meyve üzüksü, yumurtamsı ya da yuvarlak parlak beyaz, sarı, kırmızı ya da siyah renklidir. Üzüm çok uzun yıllardan beri

bilinen ve kullanılan bir meyve bitkisidir. Meyveleri taze halde ya da kurutulmuş olarak tüketilir. Ayrıca pekmezi ve kompostosu yapılır. Yapraklarından taze halde ya da salamura yapılarak sarma yapılır. Aynı zamanda park ve bahçelerde duvar, çit, çardak, kameriyeler ve pergolalara sardırılır. Genel olarak Türkiye, Avrupa, Batı Asya'da yayılış gösterirler [4].

**Çizelge 1.4.** *Vitis vinifera* 'nın Taksonomik Sınıflandırması

TÜBİTAK- TÜRKİYE TAKSONOMİK TÜR VERİTABANI	
Kingdom	<i>Plantae</i>
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i> Cronquist, Takht. & Zimmerm. ex Reveal
Class	<i>Magnoliopsida</i> Brongn.
Subclass	<i>Rosidae</i> Takht.
Order	<i>Rhamnales</i> Dumort.
Family	<i>Vitaceae</i> Juss.
Genus	<i>Vitis</i> Linnaeus
Species	<i>Vitis vinifera</i> Linnaeus

## 1.2. DNA Belirleyiciler

Farklı genotiplere ait DNA'ların dizi farklılıklarını çeşitli şekillerde ortaya koyan belirleyicilerdir. DNA belirleyiciler, DNA'nın aktif bölgelerinden veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilir. Çevreden, diğer lokuslardan veya bitkinin gelişme sürecinden etkilenmemeleri, sayılarının çok olması ve güvenilirliklerinin yüksek olması nedeniyle çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. DNA belirleyiciler, hibridizasyon ve PCR tekniğine dayanan olmak üzere sınıflandırılır. İlk moleküler belirleyici kuşağı olan RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri), DNA-DNA hibridizasyonu temeline dayanan, yavaş ve yüksek maliyetli olan bir tekniktir. DNA parçalarını çoğaltmaya yarayan polimeraz zincir reaksiyonunun keşfi ile daha hızlı ve daha düşük maliyetli olan, PCR yöntemine dayalı ikinci kuşak moleküler belirleyicilerin oluşturulması sağlanmıştır. PCR yöntemine dayanan tekniklerde, rastgele oligonükleotid

primerlerin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, daha önceden karakterize edilmemiş olan genomlarla çalışabilmek kolaylaşmıştır. Aşağıda bazı belirleyici sistemlerinden ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

### **1.2.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

RFLP, genomik DNA'nın özgül restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesiyle oluşturulmuş DNA parçalarının uzunluklarındaki farklılıklardır. Bu enzimlerin keşfi, yeni genetik belirleyicilerin temelini oluşturmuştur. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizminden, ilk olarak 1980'lerde insan genom çalışmaları için yararlanılmış olup, daha sonra bitkilere uygulanmaya başlanmıştır. Linkaj ve genetik akrabalığın belirlenmesi çalışmalarında özellikle bu yöntem kullanılmıştır. RFLP analizinde, izole edilmiş genomik DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir. Oluşan DNA fragmentleri elektroforeze tabi tutularak, büyüklüklerine göre jelde ayrılması sağlanır. DNA fragmentleri, "Southern" transfer metoduyla jel ortamından naylon filtreler tek iplikli olarak transfer edilir. Filtre üzerindeki fragmentlerle, çeşitli biçimlerde işaretlenmiş ve tek iplik haline getirilmiş prob DNA hibridize edilir. RFLP tekniği ile prob DNA'nın temsil ettiği lokusun analizi yapılır. RFLP probu olarak, genellikle 200–2000 bp uzunluğunda DNA parçaları kullanılır. Prob DNA'nın en önemli özelliği genomda az sayıda kopyasının bulunmasıdır. Genomdaki tekrar dizilerini içeren DNA problemleri kullanılması durumunda, membran üzerinde prob pek çok yere yapışacak ve analiz yapmak imkansız olacaktır. Pratikte RFLP probu olarak cDNA'lar kullanılır. Polimorfizm yaygın olarak enzimin tanıdığı iki kesim bölgesi arasındaki insersiyon ya da delesyonlardan kaynaklanır. RFLP markırlarının en önemli avantajlarından biri, bu yöntemle elde edilen verilerin farklı türler, cinsler ve hatta familyalar arasında kullanılabilir olmasıdır. Böylece, bir bitki türünde bir RFLP markırı bir kez haritalandığında, diğer akraba türlerde de bu haritalama bölgesinde bir belirleyici bulunma potansiyeli olacaktır. Güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar veren bir teknik olmasına karşın, pek çok dezavantajı bulunmaktadır. RFLP belirleyicileri kodominant belirleyicilerdir, orta düzeyde polimorfizm gösterirler ve analizleri için radyoaktivite gerekmektedir. Oldukça pahalı bir yöntem olmasının yanında, fazla zaman ve iş gücü gerektirir. En önemli dezavantajı ise çok miktarda ve yüksek kalitede DNA gerektirmesidir (IAEA, 2002).

### **1.2.2. STS (Sequence Tagged Sites)**

STS tekniği RFLP güvenilirliğini ve PCR kolaylığını bir araya getiren bir tekniktir. Nükleotid dizisi bilinen, az kopyalı RFLP problemlerinden 18–24 bç'lik primerler geliştirilerek probun temsil ettiği bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır. Polimorfizm genellikle amplifikasyon ürünleri arasındaki büyüklük farkına göre belirlenmektedir. Ancak seçilen primerlerin kopya sayılarının az olması ve genomlar arasında yüksek oranda korunmuş olmalarından ötürü, genellikle orta düzeyde polimorfizm gözlenebilmektedir. Ürünler arasında büyüklük farkının gözlenmediği durumlarda restriksiyon enzimleri kullanılarak polimorfizm saptanabilmektedir (Talbert ve arkadaşları, 1994). Kullanımı RFLP'ye göre daha kolay, ucuz ve hızlıdır. Az miktarda başlangıç materyali gerektirir, otomasyona uygundur ve primer seçimine bağlı olmakla birlikte haritalar arası transferi mümkündür. İlgili bölgeye ait dizi bilgisine ihtiyaç duyulması ve polimorfizm oranının orta seviyede olması tekniğin en önemli dezavantajlarından [8].

### **1.2.3. EST (Expressed Sequence Tags)**

İlk kez Adams ve arkadaşları (1991) tarafından tanımlanan yöntemde rastgele cDNA kopyalarının bölgesel dizi analizi yapılmaktadır. Haritalama ve genom dizileme çalışmaları için de uygun bir yöntemdir. cDNA'lar mRNA'lardan elde edildikleri için belirli şartlarda ya da gelişimin farklı aşamalarında ifade edilen genlerin incelenmesine olanak sağlar [9].

### **1.2.4. SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)**

SNP'ler en yaygın olarak görülen DNA polimorfizmleridir. İnsanlarda yaklaşık üç milyon SNP olduğu bilinmektedir [10], buğday genomunda bu sayı her 1/370 bç ile 1/540 bç arasındadır [11,12]. Bazı popülasyon ya da popülasyonlardaki normal bireylerde bulunan ve genomik DNA üzerinde farklı dizi alternatifleri (allel) olarak tanımlanan tek nükleotid değişiklikleridir. Bu allel frekansının dağılımı en az %1 ve daha büyüktür (Brookes, 1999). Bazı araştırmacılar tek nükleotid substitüsyonlarını yaygın olarak SNP adı altında sınıflandırsa da, SNP'ler tek nükleotid insersiyon ya

da delesyonları değildir. Teorik olarak her bir nükleotid pozisyonunda dört allel (dört farklı nükleotid olduğu için) bulunabilir; ancak pratikte kural olarak sadece iki allel bulunabilir. Başka bir deyişle SNP belirleyiciler, eşit olmayan (unequal) nükleotid transisyon (A-G, T-C) ve transversiyonları (A-C, A-T, G-C, G-T) olarak tanımlanan biallelik belirleyicilerdir [13]. Multiallelik markırların aksine biallelik olan SNP markırları tamamen otomatize edilebilir ve DNA'nın mikroarraylere uygulanması ile aynı anda birkaç bin SNP analizi yapılabilir. Modern tekniklerin kullanılmasıyla, SNP analizlerinin etkinliği diğer DNA analiz yöntemlerine göre birkaç misli artırılmış olur [14].

### **1.2.5. SSR (Simple Sequence Repeats)**

Mantar, bitki, hayvan ve insan genomu gibi ökaryotik genomlar boyunca ardışık olarak tekrarlanan, 2–6 nükleotidlik, yüksek varyasyona sahip DNA dizileridir. Basit tekrarların çoğunluğu kodlayıcı olmayan DNA bölgelerinde, ayrıca genler arası bölgelerde ve intronlarda da bulunur. Genetik belirleyici olarak kullanılan mikrosatellitler genellikle bu gruptadır ve nötral evrim geçirdikleri düşünülmektedir. Mikrosatellit dizileri ve genomda bulunma sıklıkları organizmadan organizmaya göre farklılık göstermektedir [15,16]. Örneğin insan genomu, bitki genomunun 10 katı kadar fazla mikrosatellit içermektedir [17]. (AC)<sub>n</sub> ve (GA)<sub>n</sub> dizileri, çeşitli tahıl türleri arasında sık olarak bulunan ikili nükleotid tekrarlarıdır. Wang ve arkadaşları (1994)'nın 54 bitki üzerinde yapmış olduğu çalışmaya göre, en sık olarak (AT)<sub>n</sub> dizisine rastlanmış olup, bunu (A)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub>, (AAT)<sub>n</sub>, (AAC)<sub>n</sub>, (AGC)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub>, (AATT)<sub>n</sub>, (AAAT)<sub>n</sub> ve (AC)<sub>n</sub> tekrarlarının izlediği tespit edilmiştir. Buğday genomunda ise (GA)<sub>n</sub> ve (AC)<sub>n</sub> ikili tekrarları sırasıyla en sık bulunan tekrarlardır. Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olmakla birlikte, ardışık SSR tekrar sayısındaki farklılık nedeniyle PCR sonucunda farklı uzunlukta DNA parçaları ortaya çıkar. Bu tekrarlar, çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir [18]. SSR'leri çevreleyen DNA dizileri primer olarak kullanılarak, PCR yöntemi ile bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir. Amplifikasyon sonucunda elde edilen farklı uzunluklardaki SSR allelleri, jel elektroforezi ile ayrılabilir, gümüş boyama ve otoradyografi gibi yöntemlerle

görüntülenebilir. SSR'ler yüksek oranda polimorfizm gösterdikleri için bitkilerde oldukça fazla bilgi verici özellik gösterirler. SSR'ler haritalama ve genotipleme araştırmalarında oldukça iyi çalışılmıştır. Kodominant olarak kalıtılmaları ve PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, kullanım oranlarını artırmaktadır. En önemli dezavantajları poliakrilamid jel elektroforezi gerektirmesi, markır geliştirmenin oldukça fazla iş gücü ve zaman isteyen zor ve pahalı bir işlem olmasıdır [19].

#### **1.2.6. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)**

Hedef dizilerinin arasındaki bölgeleri çoğaltmak için SSR primerlerini kullanan, PCR tekniğine dayanan bir yöntemdir. Birbirine yakın bulunan SSR'ler arasındaki DNA dizileri çoğaltılır ve ortaya çıkan fragmentlerin uzunlukları karşılaştırılır. İlk kez Zietkiewicz ve arkadaşları (1994) tarafından tanımlanan teknikte, genomik DNA, 3' ucunda birkaç farklı baz içeren mikrosatellit markırları ile çoğaltılmaktadır. 3' ucunda iki, üç, dört veya beş bazın çeşitli birleşimlerine bağlı olarak çok sayıda (ör; 33=27, 44=256 ) ISSR markırı elde etmek mümkündür. Çoğunlukla dominant markırlardır. Yüksek polimorfizm göstermeleri, güvenilir olmaları ve otomasyona uygunlukları nedeniyle oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır [20].

#### **1.2.7. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)**

AFLP tekniği, PCR ve RFLP tekniklerinin temel prensiplerine dayanır [21]. Özellikle birbiriyle yakından ilişkili genotipler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde etkili olarak kullanılmaktadır [22,23]. Total genomik DNA, birisi sık diğeri nadir kesen bir çift restriksiyon enzimi ile kesilir. Ortaya çıkan farklı uzunlukta ve dizisi bilinmeyen DNA fragmentlerinin uçlarına, dizisi bilinen adaptörler takılır. Ortama koyulan adaptörlere komplementer olan işaretlenmiş primerler, restriksiyon fragmentlerini çoğaltmak için kullanılır. PCR ile çoğaltılmış olan parçalar daha sonra elektroforez ile birbirlerinden ayrılarak, bant şemaları değerlendirilir. Pek çok enzim ve primer AFLP parmak izi kompleksi ile çalışmalara uygun hale getirebilir. Bu yüzden ayırt edici özellikte primer seçimine dikkat edilmelidir. Tekniğin polimorfizm oranı çok yüksektir. RAPD kadar olmasa da RFLP'den daha hızlıdır. Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği bakımından

RAPD ile RFLP arasında yer almaktadır. Çok sayıda lokusu aynı anda ve etkili bir şekilde taraması, genom kaynağına ait dizi bilgisine ihtiyaç duymaması nedeniyle parmak izi analizine çok uygundur. Önemli dezavantajları; fazla miktarda DNA gereksinmesi, dominant bir markır olması, uygulamadaki zorluğu ve farklı genetik haritalar arasındaki transfer güçlüğüdür.

### **1.2.8. rDNA–ITS (Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers)**

rDNA, ökaryotlarda çekirdekçik düzenleme bölgesi (Nucleolar Organizer Regions=NORs) olarak bilinen kromozomal bölgelerde ardışık sıralı tekrarlar halinde bulunan çoklu gen ailesidir. Her bir tekrar ünitesi küçük (18S) ve büyük (28S) rRNA alt ünitelerini kodlayan genlerden oluşur. 5.8 S rRNA genleri bu genler arasında yer alır ve sırasıyla ITS 1 (internal transcribed spacer) ve ITS 2 dizileri ile genlerden ayrılır. rDNA multigen ailesinden taksonomi ve moleküler filogeni çalışmalarında yararlanılmaktadır. 18S ve 28S alt ünitelerinde bulunan korunmuş diziler evrimsel açıdan oldukça bilgi verici özelliktedir. En küçük alt birim olan 5.8S alt birimi ise filogenetik olarak güvenilir bilgi sağlayamayacak kadar kısadır. Daha hızlı evrimleşen ITS dizileri korunmuş dizilere kıyasla tür-içi ve türlerarası çalışmalarda daha bilgi vericidir. ITS'ler biparantel kalıtım gösterirler, kodominantırlar ve yüksek derecede varyasyon göstermektedirler. Etrafındaki korunmuş bölgeler esas alınarak tasarlanmış evrensel primerler kullanılarak ya da diğer moleküler teknikler yardımıyla ITS bölgelerindeki varyasyonlar belirlenebilir [24].

### **1.2.9. DAF (DNA Amplification Fingerprinting)**

DAF ve AP–PCR teknikleri prensip olarak RAPD–PCR tekniğine benzemekle birlikte, deneysel bakımdan çeşitli farklılıklar göstermektedir. DAF tekniği ilk kez Caetano–Anolle's ve arkadaşları (1991) tarafından tanımlanmıştır. Bu teknikte 5–8 baz uzunluğunda, tek bir rastgele primer kullanılır. Sistem, PCR koşullarının çok iyi optimize edilmesini gerektirir. Oluşan PCR ürünleri poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılır ve gümüş boyama yöntemi kullanılarak analiz edilebilir [25].



### **1.2.10. AP-PCR (Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction)**

Primerler 10–50 baz çifti uzunluğundadır. Reaksiyonlar çok sıkı olmayan bağlanma sıcaklığı koşullarında gerçekleştirilir. Reaksiyon ürünleri poliakrilamid jel elektroforezi ile otoradyografisi alınarak analiz edilir [26,27].

### **1.2.11. SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)**

RAPD markırları özgül ve daha uzun primerler tasarlanmasıyla SCAR markırlarına dönüştürülmektedir [28]. İlgilenilen bir özelliğe ait olan RAPD fragmenti klonlanıp dizisi belirlendikten sonra, yaklaşık 24 nükleotidlik primerler kullanılarak, RAPD markırları SCAR markırlarına dönüştürülür. RAPD primerlerinden daha uzun primer kullanılması, sistemin etkinliğini ve güvenilirliğini artırmaktadır. SCAR markırları dominant markırlardır. Amplifikasyon öncesinde ya da sonrasında dört nükleotidlik tanıma bölgesi olan restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak kodominant markırlara dönüştürülebilirler.

### **1.2.12. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)**

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan DNA fragmentlerindeki uzunluk polimorfizmleridir. Kodominant bir markır sistemidir. Primer dizaynı için gerekli olan dizi bilgisi bir gen bankasından, klonlanmış PCR ürünlerinden, genomik ya da cDNA klonlarından elde edilebilir [29,30].

### **1.2.13. RAPD-PCR Tekniği (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ile Genetik Analiz**

RAPD, rastgele nükleotid dizisine sahip kısa oligonükleotid primerleri kullanılarak, herhangi bir DNA parçasını, nükleotid dizi bilgisine ihtiyaç duymadan amplifiye edebilen, PCR temeline dayalı bir sistemdir. İlk kez Welsh ve McClelland (1990) tarafından tanımlanmıştır [27].

RAPD belirleyiciler, genetik haritaların oluşturulması, tohumların test edilmesi, varyasyon/hat tanımlanması, seçilim ve bitki ıslahı çalışmalarında da kullanılmaktadır. Ancak tekniğin bazı dezavantajları vardır. Farklı laboratuvarlarda, farklı araştırmacılar tarafından ve hatta farklı PCR cihazlarında elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. Ancak bu dezavantajlar koşulların çok iyi optimize edilmesi ile aşılabilmektedir. Sistemin diğer bir dezavantajı da dominant bir marker sistemi olmasıdır. RAPD'in ortaya koyduğu genetik bilgi ayrıca filogenilerin yeniden kurulması için de kullanılabilir [31]. RAPD belirleyicileri, küçük (10 baz), %50'den çok Guanin ve Sitozin'den meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PCR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Primerler, amplifikasyonun başlaması için karşılıklı yerlerdeki başlama bölgelerine bağlanmalıdır.

Standart PCR'da ilk olarak, analiz edilecek olan DNA bölgesinin dizisi belirlenir. Daha sonra hedef DNA dizisi içerisinde yer alan, ona komplementer olarak sentezlenmiş iki adet spesifik primer (18–25 baz uzunluğunda), amplifikasyon reaksiyonunu başlatmak üzere kullanılır. Buna karşılık RAPD-PCR metodunda rastgele dizilimde, ortalama PCR reaksiyonlarından daha düşük bağlanma sıcaklığına sahip, tek ve kısa bir primer (6–10 baz uzunluğunda) kullanılır. Primer, DNA'nın karşılıklı zincirleri üzerinde komplementer olduğu bölgelere bağlanır ve amplifikasyon için birbirine uygun mesafede bulunanlar arasındaki (birkaç bin baz çifti aralığında) genom bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleşir. RAPD primerleri rastgele diziyeye sahip olmasına karşılık, GC içeriği %60–70 olacak şekilde tasarlanmış primerlerin kullanılması tercih edilmektedir. RAPD primerlerinin yüksek G–C içeriği, düşük bağlanma sıcaklığından kaynaklanabilecek özgül olmayan bağlanmaları önlemektedir. Meydana gelecek bant görüntüleri bitki genomundaki mevcut G–C içeriği ile doğru orantılı olacaktır. RAPD-PCR primerleri, belli bir hedef sekansı çoğaltmak için düzenlenmez. Çoğaltılmış lokus anonimdir ve genom arasına dağılmıştır. Filogenetik akrabalıkların ortaya çıkartılmasında genellikle yetersiz kalmaktadır. Ancak RAPD-PCR birçok taksonda, çoğu mendelian alleller gibi davranan bağımsız markerlerin polimorfizmini kolaylıkla ortaya çıkartabilmektedir. Evrimsel sınıflandırmalarda markerlerin birçoğu mevcut varyasyonları gösterir. Williams ve arkadaşları (1990) tarafından geliştirilen RAPD-

DNA belirleyicilerle, bireyin DNA'sı artık nispeten daha ucuza ve öncelikli sekans bilgisine ihtiyaç duyulmadan çoğaltılabilmektedir. Radyoizotoplar gereksizdir. PCR, RAPD belirleyicileri çoğaltmak için kullanıldığından, az miktarda, parçalanmamış DNA gereklidir. RAPD lokusunun, çeşitli avantajlarından biri, çalışılan takson için, nükleotid dizisinin önceden bilinmesine ihtiyaç duyulmaması iken, diğeri ise lokusların çoğunun nötral (tarafsız) belirleyici olarak iş görmesidir. Buna dayanarak birçok araştırmacı, RAPD lokuslarının ancak kullanılan oligonükleotidin primer bağlanma yerine tam olarak uyması sonucunda çoğaltılabileceğini ileri sürer. Williams ve arkadaşları (1990), insan, soya, mısır ve maya DNA'sı ile yaptıkları testlerde primer bağlanma yerinde tek bir nükleotid değişiminin amplifikasyonu engelleyebileceğini göstermişlerdir [32].

Belirli bir lokusta ki allel çeşitliliğini ölçmek için bireylerin genotiplerini belirlemek gerekmektedir. Jel elektroforezi, populasyonlarda ki genetik varyasyon miktarını hesaplamak için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Özetle elektroforez, molekülleri birbirinden ayırmada kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte jel üzerinde yer alan oyuklara molekül karışımını içeren solüsyon, pipet aracılığıyla doldurulur. Jel daha sonra elektrik akımını iletmesi için bir tampon çözelti içerisine yerleştirilir. Elektrotlara bağlanmış olan bir güç kaynağı jel ortamında bir elektriksel alanın oluşmasını sağlar. DNA molekülü öncelikle her bir nükleotidde bulunan fosfat grubu nedeniyle solüsyon içinde negatif yüklüdür. Uzunlukları ne olursa olsun tüm DNA molekülleri aynı yük/kütle oranına sahiptirler. Ancak, küçük DNA molekülleri elektroforez jelinde daha hızlı hareket ederler [33].

Jel üzerindeki farklı boyutlardaki bantların genellikle bağımsız lokusu temsil ettiği düşünülür ve bağımsız özellikler olarak değerlendirilir. Ancak her örnekte böyle bir durum yoktur. Martin ve arkadaşları (1991), Smith ve arkadaşları (1994), farklı bantların homolog diziler içeren tek bir primerle çoğaltılabileceğini göstermişlerdir. Bu da farklı bantların bağımsız özellikleri gerektirmediğini gösterir. Bu tür bantlar, aynı lokustaki homolog allelleri veya gen dublikasyonlarını gösterebilir. Kullanılan rastgele dizilimli primerler, tüm genom boyunca komplementer oldukları bölgelere bağlanabildiklerinden, belirli bir DNA bölgesi değil, genom boyunca birçok lokusun amplifikasyonu gerçekleşmiş olur. Reaksiyon ürünleri, agaroz jel elektroforeziyle,

radioaktif izotoplar kullanılmasına gerek kalmadan, etidyum bromür ile boyanarak analiz edilebilir. Polimorfizm genel olarak, ilgili bantların bireylerde “var” ya da “yok” olma durumlarına göre belirlenir. Tekniğin en büyük avantajı, analiz edilecek olan genomik DNA’nın dizi bilgisine ihtiyaç duymamasıdır. Kısa oligonükleotidlerin spesifik koşullar altında farklı birçok genomdan tekrarlanabilir amplifikasyonlar gerçekleştirebilmesi mümkün olduğundan, hemen hemen tüm organizmalardan nanogram düzeyinde genomik DNA kullanarak polimorfizmleri doğrudan belirleyecek evrensel primer panelleri oluşturmak mümkündür [36,37].

Bazı durumlarda, bir bantın varlığına ya da yokluğuna karar vermek zor olabilmektedir çünkü, bant yoğunlukları kantitatif olarak değişebilir. Bant yoğunluğunun kendisi, kalıtılabilir olmasına rağmen kalıtsal olmayan faktörler, örneğin PCR şartları, DNA konsantrasyonları ve diğer lokuslarla ilişkiler önemli derecede bant yoğunluğunun varyasyonuna sebep olabilir. Çoğunlukla farz edilen şudur; belirli bir primer, aynı moleküler ağırlıklı bantları amplifiye ettiği zaman, aynı allelik durumu ifade edebilmektedir, bu da dominant (baskın) alleldir. Tersine bir bantın yokluğu da tek bir alternatif allelik durumu göstermektedir, buna null (resesif) allel denir. RAPD bantları genellikle diploitlerdeki fenotipik dominant markerler olarak ifade edildiğinden, baskın allel için homozigot ve heterozigot bireylerin genotipleri arasında ayırım yapmak çoğunlukla imkânsız olabilmektedir [38].

RAPD lokusundaki polimorfizm, birçok nedenden kaynaklanabilmektedir, örneğin çoğaltılmış bir bant, en azından şu üç yolun birisinde null allel sayılmaktadır:

- 1- Hem bir hem de her iki bağlanma bölgesi, mutasyonlara bağlı olarak kaybolabilir.
- 2- Bağlanma bölgeleri arasında insersiyon meydana gelebilir.
- 3-Bağlanma bölgelerinde yeniden düzenlenmeler (re-arrangements) meydana gelebilir.

Karşılıklı bağlanma bölgelerinin bir veya her ikisinde meydana gelen mutasyon, bu bölgeyi komplementer bir primer tarafından tanınabilir hale getirir, kısa bir parçanın araya girmesiyle, sekansın yeniden düzenlenmesiyle veya meydana gelen bir

delesyon, PCR ile amplifiye edilebilir. Populasyonun genetik parametrelerini ve filogenilerini analiz etmek için RAPD belirleyicileri kullanıldığı zaman varyasyonun varlığı ya da yokluğu, amplifikasyon artefaktlarına veya araştırma metodlarının yanlışlığına bağlı olabilir. Bununla birlikte, RAPD belirleyicilerinin filogenetik bilginin belirli bir miktarını içerdiğini fakat filogenilerin bu belirleyicilerle çıkartılmasının kolay değildir ve elde edilen sonuçların yorumlanması da genellikle zor olmaktadır. Ayrıca, RAPD belirleyicilerindeki gözlenen aşık varyasyonların sebebinin, tanıma bölgesindeki nokta mutasyonlarında olmayabileceğine bunun yerine PCR ürünleri ve primerler arasındaki rekabetten kaynaklandığına dikkat çekerler. Bu tip varyasyonlar, akrabalık ilişkilerinin ölçümlerini karışıklığa sürüklemektedir [31,39].

Yüksek çözünürlüklü bir genetik belirleyici, belli bir bireyden güvenli ve tekrarlanabilir olarak çoğaltılabildiği zaman kullanışlıdır ve her element kalıtılabilir olmalıdır. Diğer yüksek çözünürlüklü belirleyicilerde olduğu gibi, PCR bağımlı teknikte, farklı amplifikasyon şartları, farklı amplifikasyon ürünlerini ortaya çıkartabilir. Bu tarz amplifikasyon artefaktları, çoğaltılan lokus anonim olduğundan, RAPD-PCR için birçok ciddi probleme neden olur ve primer-kalıp bağlanma şartlarına nispeten izin verir. Dolayısıyla farklı amplifikasyon parametreleri bağlanma biçimlerini etkileyebilir [38]. Sheweder ve arkadaşları (1995), güvenilir ve tutarsız amplifikasyonların genel nedenlerini şöyle açıklamışlardır:

- 1- PCR cihazının modeli
- 2- Bağlanma sıcaklıkları
- 3- Denatürasyon, primer bağlanması ve uzama zamanları
- 4- dNTP konsantrasyonu
- 5- *Taq* Polimeraz konsantrasyonu ve kaynağı

Bu nedenlerin yanında, kalıp DNA'ya spesifik olmayan bağlanmalar da tutarsız amplifikasyonlara neden olabilir. Örnek işlenmesindeki ve saklanmasıdaki farklılıklar (örneğin, donma-çözme sayısı) da varyasyonları ortaya çıkartabilmektedir.

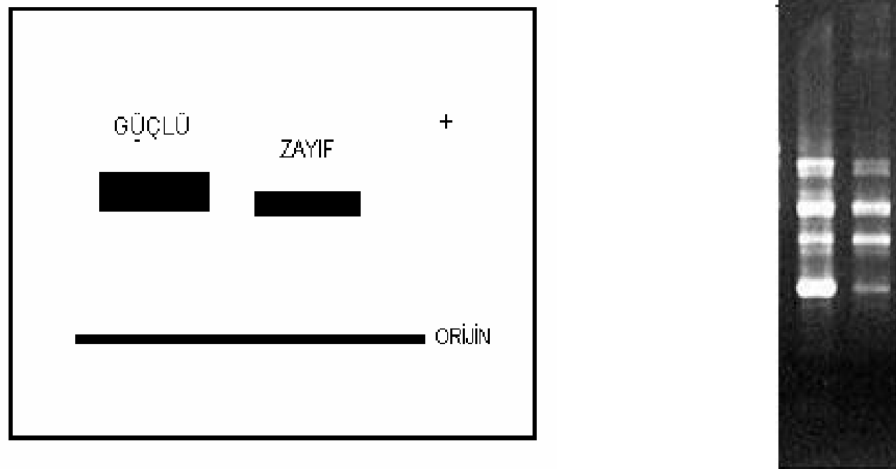
Sonuç olarak RAPD prosedürünün sırasıyla dikkatli bir şekilde izlenmesi, farklı amplifikasyon ürünlerinin ortaya çıkmasını büyük oranda engelleyebilir. RAPD bantları, agaroz jelde birbirine yakın koşabilmektedirler ve bu durumda ayırım yapmak zor olur. RAPD lokuslarının mesafeleri yakın olduğu zaman, amplifikasyon ürünlerinin veya aynı lokustaki farklı allellerin molekül ağırlığı ayırt edilemeyebilir. Aynı bireydeki (jelde aynı şeritte) homolog (fakat farklı) allellerin veya homolog olmayan allellerin birlikte göçü, iki veya daha fazla amplifikasyon ürünlerini içeren karışık (birleşik) bir bandı üretebilir. Bu şekildeki karışık bantlar, lokus başına allel sayısının, heterozigotluğun ve polimorfik lokusun frekansının eksik değerlendirilmesine neden olur ve birey genotipleri ve populasyonlar arasındaki ayırım gücünü azaltır. Dolayısıyla, homolog ve homolog olmayan ürünlerin birlikte göçü kladistik analizleri değiştirebilecektir [38].

Bütün bu sorunların karşısında üzerinde durulması gereken iki nokta bulunmaktadır. Bunlardan biri RAPD-PCR'in çözüm gücünü arttırmak diğeri ise bağımsız lokuslardaki polimorfizmi ortaya çıkartmaktır. RAPD-PCR'in çözüm gücünü arttırmak için öncelikli izlenecek yol, probleme jel seviyesinde yaklaşmak olacaktır. Agaroz jel elektroforezi, özellikle bantlar net olmadığı zaman çoğaltılmış DNA'nın moleküler ağırlığındaki küçük farklılıkları ortaya çıkarmakta bazen yetersiz olabilmektedir. Bu nedenle, pahalı ve toksik bir madde olmasına rağmen akrilamid, yüksek çözüm gücü nedeniyle kullanılmaktadır. Daha ucuz bir yöntem de örnekleri uzun jellerde koşturmaktır. Hunt ve Page (1992), çapraz bağların eklenmesiyle (%1'lik synergel, çapraz bağları içermektedir) düşük konsantrasyonlu agaroz jelin (%0.6) de diğeri bir yöntem olarak kullanılabilceğini ileri sürmüştür. Böylece bulanıklık müthiş bir şekilde azaltılmış ve 10 baz çifti kadar az olan bölgeleri ayıran bantların izlenmesine izin vermiştir. RAPD bantları genellikle varlık ya da yokluk karakterlerinin ayırımına göre değerlendirilmesine rağmen, yine de, bazı bantlar, diğeriğine göre sürekli olarak daha fazla amplifiye olur ve farklı bireylerdeki belirli bir bandın durumu ya da görüntüsü, nicel olarak eser halde görülebilirlikten hatasız parlaklığa kadar değişebilir.

Ayrıca, parlak bantlar, zayıf olanlardan daha hatasız çoğaltılma eğilimindedirler. Çünkü zayıf bir şekilde çoğaltılmış ürünü ethidium bromür ile boyanmış jelde teşhis etmek zor olur. Gerçekte zayıf bir şekilde amplifiye olan bir allel bulunmasına rağmen, bu lokus null/null homozigotu olarak değerlendirilebilir [38]. Bant yoğunluğundaki bazı varyasyonların, hem tekrarlanabilir hem de kalıtsal olduğu görülmüştür. Bant yoğunluğundaki kalıtsal varyasyon şunlara bağlı olabilir:

- 1- Belirli bir primer-kalıp kombinasyonu ile çoğaltılabilir lokusların kopya sayılarındaki varyasyonlara
- 2- Lokus içindeki ardışık tekrarlı çoğaltılabilir sekansların kopya sayısındaki varyasyonlara
- 3- Lokus arasındaki ilave interaksiyonlardaki varyasyonlara

Sonuç olarak spesifik RAPD bandının yoğunluğu hem tekrarlanabilir hem de kalıtsal olduğu zaman bile, aynı bandın bir tanesinde güçlü ifade edilmiş diğerinde ise zayıf ifade edilmiş olduğu durumda iki bireyin nasıl kıyaslanabileceği sorusunu akla getirmektedir (Şekil 1.1.). Böyle yoğunluk farklılıklarını değerlendirmeye ilgili bir problem, beklendiği gibi özellikle ethidium bromür ile boyanmış jellerde bandın yoğunluğunun miktarını hesaplamak zordur. İkinci problem, yoğunluktaki farklılıkların, bunun altında yatan genotip farklılıklar ile nasıl ilişkilendirileceğinin bilinmemesidir.



**Şekil 1.1.** Güçlü ve zayıf bandın şematik gösterimi ve jel üzerindeki görünümü

Bantlar parlaklıklarına göre sınıflandırılabilir, belirli bir bandın parlaklık sınıflarının kalıtımı analiz edilebilir ve farklı parlaklık kategorileri, aynı lokustaki farklı alleller olarak değerlendirilebilir. Diğer iki çözüm daha gerçekçidir. İlkinde her polimorfik bant kullanılır: bant, var olarak değerlendirilir, eğer belirlenemeyecek gibi ise yoğunluğu göz ardı edilir ve yok sayılır. Bu prosedür bant yoğunluğundaki varyasyonun sebebinin genetik veya genetik olmadığını ayırt edemez. Diğer çözüm ise bu bantlar sadece parlak bir şekilde mevcut olduğu zaman değerlendirilir. Bu durumda, bant çok zayıf veya hiç olmadığına (örneğin, değerlendirilememesi durumunda) yok sayılır. Bu değerlendirme prosedürün de, bantların varlığı veya yokluğu gibi şiddetine aldırılmayarak bütün bantların sınıflandırılmasında sübjektif bir eğilimin olmadığı açıktır. RAPD allelleri, dominant markerler gibi ifade edilir. Böylece RAPD lokusundaki allelik ve genotipik frekansları şu nedenlerden dolayı doğru bir şekilde hesaplamak olasıdır:

- 1- Örnek sayısının çok olması gerekir (bu nedenle gerçek allelik frekansların hesaplanmasında hata en aza indirilmiş olur)
- 2- Null allellerin sıklığı 0,1'i aşmalıdır
- 3- Burada incelenen lokus biallelik olmalıdır.

Eğer bütün bu şartların tümü karşılanırsa, F istatistikleri hesaplamak için bu frekanslar kullanılabilir ve ebeveyn olasılıkları da karakterize edilebilir. Bu şartlar yoksa allelik ve genotipik frekansları hesaplamak imkânsız olacaktır [38]. RAPD lokusunun nötral olduğu varsayılarak, her lokusun iki allelden oluştuğu, birinin ifade edildiği, diğerinin ise null olduğu düşünülmektedir. Bazı lokuslarda, allellerden birinin, diğerinden daha yaygın olacağı, oysa diğer lokuslar için tersinin doğru olacağı düşünülmektedir. Çünkü bir allelin diğerinden sistematik olarak daha yaygın olduğuna inanmak için bir sebep yoktur (örneğin, allellerin varlık-yokluk oranı yaklaşık olarak 50:50 olmalıdır). Null alleller birçok defa mevcut allellerden sayıca üstündür ve fenotip yokluğu, RAPD-PCR tarafından çoğaltılmayan karakterleri içine alan bir allel havuzunu kapsar. Eğer bu doğruysa ve mevcut fenotipler pek çok alleli kapsarsa, varlık yokluk verisinden RAPD allelik frekansı hesaplamak için bir yol bulunamayabilir [38]. RAPD markırlarının Mendelian olmayan kalıtımı, RAPD lokuslarındaki allelik varyasyon miktarının ve heterozigotluğun hesaplanmasında



normalden yüksek değerlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çünkü RAPD lokusu anonimdir ve RAPD bantlarının biçimi, sadece çoklu lokusların ve dominant allellerin kalıtımını yansıtır. RAPD markırlarının Mendelian olmayan kalıtımını ayırt etmek çok zor olabilir. Őans eseri RAPD markırlarının geçiş genetiğinin birçok analizi göstermiştir ki, bantların çoğu, Mendelian alleller gibi davranır. Yavru bireylerde atasal olmayan bantların bulunmasının  tane nedeni vardır:

- 1- Olası ebeveynler aslında gerçek genetik atalar değildir.
- 2- Kontaminasyon, kalıp DNA'nın parçalanması ve uygun olmayan bir teknik gibi laboratuvar ve saha artefaktları, tutarlı ve tekrarlanabilir bantların bazılarının sahte görünümüne ya da bantların gözden kaybolmasına yol açar.
- 3- RAPD-PCR'da oldukça msamahakr bağlanma şartları kullanıldığından, heterodubleks yapılar ortaya çıkabilir. Bu yapılar homolog alleller, homolog olmayan bölgeyi içerdiği zaman ortaya çıkar. Bu, jeldeki g oranı lokustaki her allellin gerçek uzunluğundan farklı olan hibrit bir fragment meydana getirir.

Bu soruna tek ve kesin yaklaşım, bütün bantlar üzerinde ayırım (segregation) analizleri uygulamak olmalıdır. Böylece Mendelian alleller gibi davranan markerleriyle davranmayanlardan ayırır ve bütün ayrılmayan bantlar sonraki analizlerde elimine edilir. Teorik olarak, eğer gözlenen tüm bantlar, Mendelian markerler gibi davransaydı, her türlü dahil etme (inclusion), hariç tutma (exclusion) birleşimlerini kullanarak veya olasılık (likelihood) algoritmaları kullanılarak atayı (ebeveynleri) analiz etmek mümkün olabilirdi. Benzer olarak, bu tip bütün markerler, daha yüksek taksonlardaki soy ilişkilerinin hesaplanması için kullanışlı bilgiler sağlayabilir [38].

RAPD tekniği, ciddi zayıflıklar gösterebilmektedir; kurulan filogeniler, farklı memeli ordoları arasında her zaman ayırt edici olmayabilir. RAPD karşılaştırmaları, aynı primerle oğaltılmış aynı moleküler ağırlıktaki bantların homolog DNA sekanslarını temsil ettiği varsayımına dayanır. Fakat birbirinden daha uzak ikirneğin, bu varsayımı karşılaması daha az muhtemeldir. Yine de, RAPD markerleri sayısız çalışmada da gösterildiği gibi yakın akraba organizmalardaki genetik polimorfizmi belirlemede çok güçlü bir araçtır. Bu gözlemler ailya seviyesine kadar karşılaştırmaların muhtemelen daha düzenli olduğunu göstermiştir. Belirli bir

çalışma için gerekli primer sayısı da önemlidir. Çalışmaya daha fazla primer katıldığı zaman tutarlılık artacaktır. Bununla birlikte, RAPD markerleri ile ortaya çıkarılan sonuçlar, filogenetik yaklaşımlara ve/veya seçilen mesafe katsayılarına bağlıdır. Bu seçimler dikkatle düşünülmelidir, çünkü karşılaştırılan organizmaların akrabalıkları etkileyici bir faktördür [31].

### **1.3. Çeliklerin Köklenme Başarısı Üzerine Hormonların Etkisi**

Oksinler çeliklerde kök oluşumunu teşvik ederler [42]. Çelik köklendirme hormonu olarak oksin grubundan IAA, IBA veya NAA kullanılmaktadır. İndol bileşikleri genellikle naftalen bileşiklerinden daha çok saçak kök yaparlar. Bugün pratikte en fazla kullanılan düşük toksite ve yüksek kök oluşturma kabiliyeti olan IBA'dır [43, 44, 45, 46]. Pratikte en çok kullanılan IBA dozu ise tür ve çeşitlere göre 1000–4000 ppm arasında olmakla birlikte farklı uygulamalar da vardır. Mesela muhtelif türlerde IBA, 20-200 ppm'lik çözeltiye yavaş daldırma veya 500- 5000 ppm'lik çözeltiye hızlı daldırma şeklinde yaralar onarılmadan önce uygulanabilmektedir [47]. Elmada, su yerine etanol içindeki 600–2500 ppm' lik IBA çözeltilerinin daha uygun olacağı, otsu bitkilerin de yukarıdaki uygulamalara benzer uygulamalarla köklendirilebilecekleri kaydedilmektedir [48]. Büyüme düzenleyici maddeler her bitkiye çelikle üretim imkânı veren etkili maddeler değildirler. Bunlar yardımcı maddelerdir. Ancak çeliklerin köklenme sürelerini kısaltmada ve köklenme oranlarının yükseltilmesinde yardımcı rol oynamaktadırlar [49]. Bununla birlikte bazı bitkiler büyüme düzenleyicilerle bile köklendirilememektedir [50]. Chong (1983) yüksek IBA konsantrasyonlarının köklenme üzerine etkilerini incelediği bir çalışmada değişik türlere ve bazı elma çeşitlerine (Mor spur McIntosh, Hopa) ait çeliklere 0, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 ve 40000 ppm dozlarında IBA uygulayarak aralıklı sisleme altında köklenmeye bırakmış, sonuçları köklenme yüzdesi, ortalama kök uzunluğu ve kök sayısı açısından değerlendirmiştir. Hopa çelikleri 10000 ile 40000 ppm IBA konsantrasyonları arasında optimum tepkiler vererek, köklenme oranında, kök uzunluğunda ve sayısında kayda değer artışlar göstermiş, Mor Spur McIntosh ise IBA uygulamalarına rağmen kök vermede başarısız olmuştur [51]. Hormonlarla ilgili çalışmalara bakıldığında, eksojen ve endojen hormon düzeylerinin köklenme üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Ancak

hormonların köklenme üzerindeki etkilerinin birbirine ve hormonlar arası dengeye bağlı olduğu gösterilmiştir. Oksin birçok bitkinin gövde dokularına uygulanınca adventif kök oluşumu arttığından, doğal olarak var olan veya dışarıdan verilen oksinin belirli miktarı kök taslaklarının oluşumunda rol oynamaktadır [52, 53, 54].

Kaşka ve Yılmaz (1974)'e göre, kullanılabilen hormon çeşitleri çok olmasına rağmen, çeliklerde adventif köklerin meydana gelmelerini teşvik etmekte en güvenilir bulunan kök uyartıcı sentetik kimyasal maddeler, indol bütrik, naftalen asetik, indol asetik asitlerdir. Genel kullanışlar için IBA muhtemelen en iyisidir. Çünkü bu asit geniş konsantrasyon sınırları içinde toksik olmamakta ve ayrıca birçok bitki türlerinin köklenmelerini teşvik bakımından yeterli etkide bulunabilmektedir [55].

#### **1.4. Literatür Özeti**

##### **1.4.1. RAPD-PCR Çalışmaları**

S.Öz Aydın tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada RAPD-PCR tekniğinin prensipleri uygulama alanlarını, bu uygulama alanlarının bitki sistematiğine etkisini, avantaj ve sınırlılıklarını belirtilmiştir. Ayrıca RAPD-PCR tekniği de moleküler sistematik tekniklerin DNA temelli tekniklerinden biri olduğu vurgulanarak , birçok alanda olduğu gibi bitki sistematiği alanında geniş kullanım alanı bulduğu belirtilmiştir. Bu teknik uygulanırken öncelikle her bitki taksonu için optimizasyonunun yapılması şart olduğu bununla birlikte son yıllardaki çalışmalarda olduğu gibi, sistematik veya farklı amaçlarla yapılan çalışmalarda birden fazla moleküler teknik kullanılması, bitkinin tüm dizi analizinin mümkün olmadığı durumlara göre daha uygun olduğu öngörülmüştür. Ayrıca çalışma, türlerin belirlenmesi amaçlı olduğunda bu karakterlerle morfolojik karakterlerin karşılaştırmalı analizlerine gidilmesi daha değerli sonuçlar vermektedir [56].

C. S. Kim ve arkadaşları 1997 yılında yapılan çalışma ile bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin, DNA saflığını dolayısıyla genetik materyalin kalitesini etkilediğini ve bu metabolitlerden arındırılmasının , uygulanacak olan RAPD-PCR metodunun sonucuna etki etmemesi veya sonucun belirgin olması açısından genetik bir izolasyon mekanizması öngörmüşlerdir. Çalışma, bazı meyve ağaçları (*Vitis* spp., *Malus* spp., *Pyrus* spp. ve *Diospyros* spp.) ile bazı koniferler de (*Pinus densiflora*, *Pinus koraiensis*, *Taxus cuspidata* ve *Juniperus chinensis* ) uygulanarak sonuç elde etme yoluna gidilmiştir [57].

Muhammad A. Lodhi ve arkadaşları 1994 yılında; Asma türleri ve melezlerinde basit, hızlı ve güvenilir bir yöntem geliştirmiştir. Genel prosedür olarakta, Doyle ve Doyle (1990)'un metodu baz alınmıştır. NaCl kullanılması, polifenol ve polisakkaritlerin yapıdan uzaklaştırılmasıyla , saf yakın oranlarda DNA eldesine sağlanmıştır. Metod diğer meyve türlerinde de [elma (*Malus domestica*), kayısı (*Prunus armeniaca*), kiraz (*Prunus avium*), şeftali (*Prunus persica*), erik (*Pmmus domestica*), ve ahududu (*Rubus idaeus*)] yüksek oranda saf DNA eldesine yönelik sonuçlar vermiştir [58].

Y.Sabit AĞAOĞLU ve arkadaşları 2001 yılında; Asmaların vejetatif otsu dokuları (sürgün ucu-geç yapraklar, sülükler) ve bir yaşlı dallarından DNA izolasyonu için kullanılan, sırasıyla Lodhi ve ark. (1994), Lin ve Walker (1997) tarafından geliştirilen yöntemlerin, dokuların farklı yetiştirme koşullarından (bağ, sera, doku kültürü bitkileri) alınması durumunda DNA verimlilikleri ve RAPD tekniğinde kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Lodhi ve ark. (1994)' na ait yöntemde, bağdan alınan ancak bekletildikten sonra kullanılan sürgün ucu-geç yapraklar örnekleri ile, sülüklerin kullanıldığı durumlarda 10/4 DNA/g doku düzeyinden daha az (yetersiz) DNA elde edilirken; yetersiz düzeyde olmamakla beraber, doku kültürü ve sera bitkilerinden de 20-53 ,ug DNA/g doku düzeyinde düşük DNA miktarı elde edilmiştir. Yöntemde, soğuk ethanol ilavesi ve 4°C'de DNA iplikçiklerinin oluşmadığı aşamadan sonra gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda, her dört koşulda da tatmin edici DNA miktarlarına ulaşılmıştır. Bir yaşlı dallardan Lin ve Walker (1997) 'a göre izole edilen DNA miktarları (28-40 ,ug DNA/g doku) araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur [60].

R. Herrera ve arkadaşları 2002 yılında; Şili’de en çok yetiştirilen 4 *Vitis vinifera* çeşidi üzerinde (viz. Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot and Carmenere). Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) ve Birbiri Ardına Tekrarlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ISSR-PCR) analizleri kullanılarak karşılaştırma yapıldı. Her iki teknikten ISSR’ın profilleri çözme gücüne rağmen, çeşitlerin ayırımın da daha geniş bir kullanım için uygun olacağını düşündürmektedir. Ayrıca çalışılan çeşitler arasında ki ayırımın RAPD metodu ile daha yüksek başarıldığını değişkenliğin; Merlot, orijinal Şili klon ve Fransa temsilcisi klonları arasında gözlemlendiğini , benzerliğin %64 olduğu ancak Fransız Merlot ile Şili stokunun yakın akraba olmadığı bildirilmiştir [61].

C. Tessier ve arkadaşları 1999 yılında; Çeşitli coğrafik bölgelerde bulunan 224 adet *Vitis vinifera* çeşidine ait örnekler üzerinde 21 adet RAPD primeri ve 2 adet Mikrosatelit primeri ile eşleşmeler yapma yoluna gidilerek , bu primerlere ait lokusların belirlenmesi ve arasında ki tür içi genetik uzaklığın belirlenmesine çalışılmıştır. Ayrıca Varyetelere ait kalıpların bağımsızlık hipotezi altında Karşılaştırılarak, teorik ve gerçek verim ile birlikte bir primer kombinasyonu ortaya konulmuştur [62].

G. Fanizza ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları bir çalışma da ; 10 farklı *Vitis vinifera* genotipinde 320 farklı primer ile denemeler yaparak RAPD fragment numaralarını ve bu genotipler arasında ki genetik uzaklığı primer ve band polimorfizmine dayalı bir şekilde tayini ile düşük ve yüksek polimorfik primerler arasında bir korelasyon kurmaya çalışmıştır [63].

J. R. Vidal ve arkadaşları 1999 yılında ; Fransa ve İspanya da bulunan 32 beyaz üzüm (*Vitis vinifera*) çeşidi RAPD tekniği kullanılarak belirlendi. 33 primer kullanılan bu çalışmada , RAPD düşük ve yüksek frekansları ile gruplar arasında kümeleme analizi de ortaya konulmaya çalışılmıştır [64].

S. G. Tangolar ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada, Türkiye'nin Doğu Akdeniz bölgesinin asma gen kaynaklarının tanımlanması amacı ile 14 SSR primeri kullanılarak 59 üzüm çeşidinin genetik analizleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda çeşitler arasındaki genetik ilişkilerin bölge içindeki ekocoğrafik dağılımları ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada analiz edilen çeşitler arasında farklı isimlerle anıldığı halde aynı genotip (sinonim) veya aynı isimli ancak farklı genotip özelliği (homonim) gösterenler saptanmıştır. Bölgenin asma genotipleri ile ilgili ilk genetik analiz sonuçlarının sunulmuştur [65].

#### 1.4.2. IBA ve Köklenme Başarısı Üzerine Çalışmalar

V. Erdoğan ve arkadaşları, 2004 yılında yapılan çalışmada, kara dut yeşil çeliklerin köklenmesi üzerine IBA'nın etkisi incelenmiştir. Çelikler Temmuz ayı ortasında alınmış ve IBA'nın farklı dozları uygulanmıştır. Serada sisleme ünitesinde perlite dikilen çelikler 60 gün süre ile köklenmeye bırakılmıştır. IBA uygulamaları köklenmeyi ortalama %14.2 arttırdığı görülürken, kontrol çeliklerinde köklenme %42.5 olmuş ve 4000ppm, 6000ppm, 8000ppm dozlarında sırasıyla %57.5, %60 ve %52.5 köklenme elde edilmiştir. Ortalama kök sayısı, uzunluğu, kuru ağırlığı ve köklenme derecesi gibi kalite kriterleri en yüksek 8000ppm uygulamasında olduğu belirtilmiştir [66].

D. Söyler ve N. Arslan 2000 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi seralarında tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme metoduna göre dört tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Araştırmanın amacı *Capparis spinosa*'nın kültüre alınıp, alınamayacağı araştırılmasıdır. Vejetatif yolla üretimde otsu ve yarı odunsu çelikler kullanılmıştır. Çeliklere büyümeyi düzenleyici maddelerden IBA, IAA ve NAA değişik doz ve sürelerde uygulanmıştır. *C. spinosa* çeliklerinde en yüksek köklenme oranı Nisan aylarında yürütülen çalışmada IAA'nın 500 ppm'lik düzeyinde uygulanan dozunda % 28, Mayıs ayında ise IBA in 250 ppm lik dozunda %29 oranında elde edilmiştir [67].

İ. H. Kalyoncu ve arkadaşları 2008 yılındaki çalışmada, selekte edilmiş bir iğde (*Eleagnus angustifolia* L.) tipinden erken Haziranda, alınan yeşil uç çeliklerinin, “Sisleme Sisteminde” iki farklı hava nispi nem ortamı (% 85-90 ve % 95-100), IBA’nın uygulanan 5 farklı konsantrasyonu (0, 500, 1500, 2500 ppm ve 3500 ppm) ve perlit köklendirme ortamının köklenmeleri üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmada, dikilen çeliklerin tümünün canlı kaldığı ve yüzde yüze varan oranda köklendiği belirlenmiştir. Çeliklerde kalluslanma, en yüksek % 95-100 nem seviyesindeki 500 ppm doz uygulamasından (%12.50) elde edilmiştir. Köklenme oranı kontrol grubu dahil tüm uygulamalarda % 75.00’in üzerinde gerçekleşmiş olup, en yüksek köklenme % 85-90 nem seviyesindeki ortamda kontrol, 500 ppm ve 1500 ppm doz uygulamalarından (% 100) elde edilmiştir. IBA dozu ve nem artışlarının köklenmeyi artırmadığı gözlenmiştir. Çeliklerde köklenme yüzey uzunluğu, en fazla % 85-90 nem seviyesinde 500 ppm doz uygulamasında (2.563cm) belirlenmiştir. Kök sayısı bakımından, en yüksek değer % 85-90 nem seviyesinde, 500 ppm doz uygulamasından (18.75 adet/çelik) elde edilmiştir. Çeliklerde en uzun kök % 85-90 nem seviyesindeki kontrol grubundan (6.083cm), en kısa kök ise, % 95-100 nem seviyesindeki kontrol grubundan (0.323) elde edilmiştir. Kök dallanması en yüksek % 85-90 nem seviyesindeki 500 ppm doz uygulamasında (8.083 adet/çelik) bulunmuştur. İncelenen köklenme özellikleri dikkate alındığında, iğde yeşil uç çeliklerinin kolay köklendiği belirlenmiş olup, % 85-90 nispi nem seviyesindeki, kontrol grubu (% 100), 500 ppm (% 100) ve 1500 ppm IBA doz uygulamalarından en iyi köklenme özellikleri elde edilmiştir [68].

H. Zenginbal ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada Hayward odun çelikleri, 10-12 yaşındaki ağaçlardan 1 Ocak tarihinde 2 - 3 gözlü olacak şekilde alınmıştır. Deneme iki aşamada yürütülmüştür. Denemenin birinci bölümünde direk dikimi yapılan ve değişik ortamlarda 3 ay muhafaza edilen (toprak, perlit ve soğuk hava deposu) çeliklere dikimden önce kontrol ve 4000 ppm IBA uygulaması yapıldıktan sonra sera ortamına dikilmiştir. Denemenin ikinci bölümünde ise 3 ay süreyle toprak, perlit ve soğuk hava deposunda (+4 OC) muhafaza edilen çeliklere kontrol, muhafazadan önce 4000 ppm IBA ve dikimden sonra ( muhafazadan sonra ) 4000 ppm IBA uygulamaları yapıldıktan sonra sera ortamına dikilmiştir. Çelikler, alttan ısıtma ve mistleme ünitesine sahip ısıtmasız cam serada perlit ortamında 90

gün köklenmeye alınmıştır. Çalışmada köklenme oranı, canlılık oranı, kök sayısı ile kök kalitesi belirlenmiştir. Denemenin birinci bölümünde en iyi köklenme (%73.0), canlılık (%88.0), kök sayısı (9.8 adet) ve kök kalitesi (3.8) direk dikimi yapılan çeliklere dikimden önce 4000 ppm IBA uygulamasından elde edilmiştir. Denemenin ikinci bölümünde ise muhafaza ortamları bakımından en iyi köklenme (%66.0), canlılık (%91.0), kök sayısı (7.3 adet) ve kök kalitesi (3.5) soğuk hava deposunda muhafaza edilen çeliklere dikimden önce 4000 ppm IBA uygulamasından elde edilmiştir [69].

O. Ünal ve arkadaşları 2004 yılında yapılan araştırmada, Antalya için endemik olan *Origanum solymicum* P.H. Davis, *O.husnucan-baseri* H. Duman, Z. Aytaç & A. Duran, O. bilgeri P.H. Davis, O. minutiflorum O.Schwarz & P.H. Davis ve O. saccatum P.H. Davis türlerinin tohum çimlenmesi ve çelikle çoğaltılması çalışmaları yapılmıştır. *Origanum* türlerinin tohumlarının çimlenmesi üzerinde farklı saklama koşullarının (+4 °C ve oda sıcaklığı), aydınlık-karanlık (18 saat karanlık-6 saat aydınlık) ışık koşulunun ve karanlık (24 saat) ortamın, GA<sub>3</sub>'ün çeşitli konsantrasyonlarının (0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm) ve farklı sıcaklık derecelerinin (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C) etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, çimlenme öncesi düşük sıcaklıkta bekletilen tohumlarda, aydınlık-karanlık ışık koşulu, 1 ppm GA<sub>3</sub> ve 10 ppm GA<sub>3</sub> ile 15, 20 ve 25 °C sıcaklık uygulamalarında çimlenme yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. Türler içinde en yüksek çimlenme yüzdesi alçak rakımlarda yayılış gösteren *O. solymicum* türünün tohumlarında görülürken, en düşük çimlenme yüzdesi ise *O. husnucan-baseri* türünün tohumlarında saptanmıştır. Çelikle çoğaltma çalışmalarında ise *O. husnucan-baseri* ve *o. minutiflorum* türleri hariç diğer *Origanum* türlerinde köklenmenin gerçekleştiği ancak, köklenme oranı bakımından gerek kontrol ve IBA uygulaması arasında gerekse her iki uygulama için de türler arasında önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür [70].

K. Yıldız ve arkadaşları 2009 yılında yapılan çalışmada kara duttan (*Morus nigra* L) alınan odun, yarı odun ve yeşil çeliklerin köklenme durumu incelenmiştir. Kontrol grubu yanında, odun ve yarı odun çeliklerinde 6000 ve 7500 ppm, yeşil çeliklerde ise 4000 ve 6000 ppm indol bütirik asit (IBA) uygulamaları yapılmıştır. Odun



çeliklerinde, kontrol grubunda %9.5 oranında köklenme olurken, 6000 ppm IBA uygulamasından %24 oranında köklenme elde edilmiştir. 7500 ppm IBA uygulanan odun çeliklerinin hiç biri köklenmemiştir. Yarı odun çeliklerinde, kontrol uygulamasından %13.33 oranında bir köklenme elde edilirken bu oran 6000 ve 7500 ppm IBA uygulanan çeliklerde sırasıyla %60.00 ve %76.67 olarak gerçekleşmiştir. Yeşil çeliklerde ise hormon uygulaması yapılmayan kontrol çeliklerin %25'i köklenirken, 6000 ve 7500 ppm IBA uygulanan çeliklerin sırasıyla %55.9 ve %68.5'i köklenmiştir. Çelik başına kök sayısı, odun çeliklerinde hem kontrol hem de hormon uygulamasında düşük bulunmuştur. Yarı odun çeliklerinde kök sayısı kontrolde 1.0 iken, 7500 ppm IBA uygulanan çeliklerde 5.07'ye ulaşmıştır. Yeşil çeliklerde ise kontrol grubunda kök sayısı 4.38 olarak belirlenirken, bu değer 6000 ppm IBA uygulananlarda 10.33, 7500 IBA uygulananlarda ise 11.34 olarak tespit edilmiştir [71].

U. Şirin ve F. E. Tekintaş 2004 yılında çelikleri üzerinde yürütülen araştırmada çeliklerde adventif kök oluşumunun izlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada, köklenmenin seyrini incelemek amacı ile perlit ortamına dikilen çeliklerden 4., 8., 12. ve 16. haftalarda alınan örnekler üzerinde incelemeler yapılmıştır. Sonbahar döneminde dikilen çeliklerde adventif kök oluşumuna ilişkin herhangi bir hücre farklılaşması ve kök primordiası oluşumu görülmezken çelik tabanında yoğun bir kallus dokusu gelişimi olduğu saptanmıştır. ilkbahar döneminde ise bilezik alma uygulaması yapılan çeliklerde dikimden itibaren 4. haftada ve 16. haftada alınan örneklerde, kök primordiyumu gelişimi olduğu görülmüştür. Adventif kök hücrelerinin ilk çıkışının kambiyumun hemen dış tarafından ve floem dokusu içinden yoğun bir hücre farklılaşması şeklinde geliştiği belirlenmiştir. Ayrıca sklerankimatik halkaların bu türe özgü olarak oldukça fazla sayıda olduğu belirlenmiştir [72].

M. C. Heloir ve arkadaşları 1997 yılında yapılan çalışmada, *Vitis vinifera* çeşitlerin hızlı çoğaltılmasını in vitro koşullarda geliştirmek amaçlanmıştır. Öncelikle mikroçoğaltım için alınan örnekler kültüre alınarak büyüme düzenleyicilerine olan gereksinimleri, farklı aşamalarda incelenmiştir. 8.9 mM 'dan başlayan BA ( Bütirik asit) denemeleri 4.4 mM' a kadar düşürülmüştür ve en uygun değer bu olduğu , gelişim süreçleri kontrollerine bakılarak anlaşılmıştır. Daha sonra 2.5 mM IBA ile

yapılan deneme ile % 100 sonuç alındığı ve kök gelişim sistemini uyardığı belirtilmiştir [73].

### **1.5. Çalışmanın Amaçları**

1. Türkiye'nin iki önemli *Vitis vinifera* çeşidi olan Hasandede üzümü ve Kalecik Karası üzümünden alınan 25 farklı bireyin DNA örneklerinin RAPD-PCR tekniği kullanılarak karşılaştırılması, benzerlik ve farklılıklarının ortaya konulması,
2. Hasandede Üzümü ve Kalecik Karası Üzümü çeşitlerinden alınan çeliklere farklı derişimler de uygulanan IBA' in bu çeşitlerin köklenme başarısı üzerine etkisinin gözlemlenmesi ve karşılaştırılması esas alındı.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada kullanılan *Vitis vinifera* çelikleri, 2010 yılının ilkbahar dönemi başlangıcı olan Mart ayı itibariyle, tomurcuklanma mevsimi adı verilen dönemde, yaprakları ise Haziran ayı itibariyle toplandı. Örnekler Kırıkkale ili Hasandede ilçesi ve Ankara ili Kalecik ilçesi Gökdere köyü bölgesinden, Hasandede ve Kalecik Karası üzüm çeşitlerinin her ikisinden olmak üzere, 28 ayrı bireyden alındı. Toplanan bitki örneklerinin Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde teşhisi yapıldı.

### 2.2. Köklendirme ve IBA Uygulamaları

#### 2.2.1. Köklendirme Ortamı

Çalışmada kullanılan ortam volkanik bir tür kayaçtan elde edilen perlittir. Perlit daha önce ki yürütülen benzer çalışmalarda kullanılan ortam olarak en uygun materyal olduğu belirlendi. Su tutma kapasitesi, ısı koruyucu ve genleşme özelliği olan, asit ve bazlara karşı dayanıklılığı ile anorganik yapısının bitkisel gelişime müsait olduğu da bilinmektedir [68, 69, 71, 74].

Bitkinin köklenme aşamasında ortamda ki ısı, ışık, nem gibi faktörler dikkate alındı. Aynı ısıtmalı ortamda bulunan çelikler 12 hafta boyunca, ortam sıcaklığı 25 °C de sabit tutularak, mevsimsel periyodizmin dışında günlük fotoperiyodizm de dikkate alınmış ve 12 saatlik bölümlerle özel olarak ayarlanan elektrik düzeneği ile gece - gündüz fotoperiyodizmi sağlandı. Bu düzenek gün içerisinde ki 12 saatlik bölüm olan sabah 06.00 - 18.00 saatlerinde ışık kaynağını aktif hale getirildi, diğer 12 saatlik bölüm olan 18.00 - 06.00 saatleri arasında devre dışı kalarak karanlık bir ortam sağlandı. Aynı kapalı ve ısıtmalı ortamda bulunan tüm örnekler için nem sabit kabul edildi.

### 2.2.2. IBA Uygulaması ve Çeliklerin Ortama Yerleştirilmesi

Mart ayı sonunda tomurcuklanma döneminde olan, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinden alınan çelikler, ortalama olarak 10 – 12 cm boyuna kısaltılmış ve her çelikte en az 2, en çok 3 tomurcuk olması sağlandı. Tomurcuk uçları üst konumlu ve köklenecek kısımlar ise aşağı yönlü olacak şekilde, alt kısımlarından 45° lik açı ile kesilerek, IBA uygulamasına hazır hale getirildi. Her iki çeşitten alınan her birey hem 3 farklı derişim için hem de 4,8 ve 12 haftalar sonunda ki kök gelişimine ait değerlerin alınabilmesi için hazırlandı. Bu durumda her iki çeşitten 5 er adet birey ve 3 farklı derişimin haftalara göre 3 tekerrürlü olduğu düşünülerek, 90 adet yaklaşık aynı ölçülerde çelik kullanıldı. 600 ml'lik dereceli cam ortam içerisine, 500 ml lik seviyeye kadar yerleştirilmiş olan perlitli ortamdan, her birinin içerisine aynı çeşitten 5 farklı birey gelecek ve 3 tekerrürlü olacak şekilde toplamda 18 cam ortam hazırlandı. Daha önce yapılmış olan köklendirme çalışmalarında kök uyarıcı ve kallus oluşumunu teşvik edici olduğu belirlenen IBA (indole-3-butyric acid), kök gelişimi çalışmalarında otsu, yarı odunsu veya odunsu gövdelere sahip bitkilere göre farklı derişimler de kullanıldığında optimum sonuç alındığı belirlenmiştir. Bitki otsu gövdeden, yarı odunsu ve odunsu gövdeye geliştikçe köklenmede kullanılan kök uyarıcı maddelerin derişimlerinin artırılması gerektiği de yer almaktadır. Bu çalışma açısından derişimler *Vitis vinifera* bitkisi açısından değerlendirilerek ve derişim artırılma yoluyla, IBA yoğunlukları tespit edildi. Bu derişimler sırası ile, su (kontrol), 6000ppm ve 7500ppm olarak belirlendi.

IBA uygulamaları genel olarak köklendirme çalışmalarında “hızlı daldırma metodu” ile uygulanmaktadır. Bu metoda göre; çalışmada belirli ölçülere göre hazırlanan 90 adet çelik, hazırlanan cam malzemede bulunan perlit ortamına alınmadan önce, 45°'lik açıyla boyutlandırılan bölümleri, öncelikle %95'lik etil alkolden geçirilerek, kallus yapısı ile başlayacak olan kök gelişim bölgesinin, IBA ile tepkimeye girebilecek veya gelişimi olumsuz etkileyecek maddelerden uzaklaştırılması veya etkisiz hale getirilmesi sağlandı. Etil alkolden geçirilen çelikler, 5 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilerek, alkolün dokudan uzaklaşması sağlandı [68].

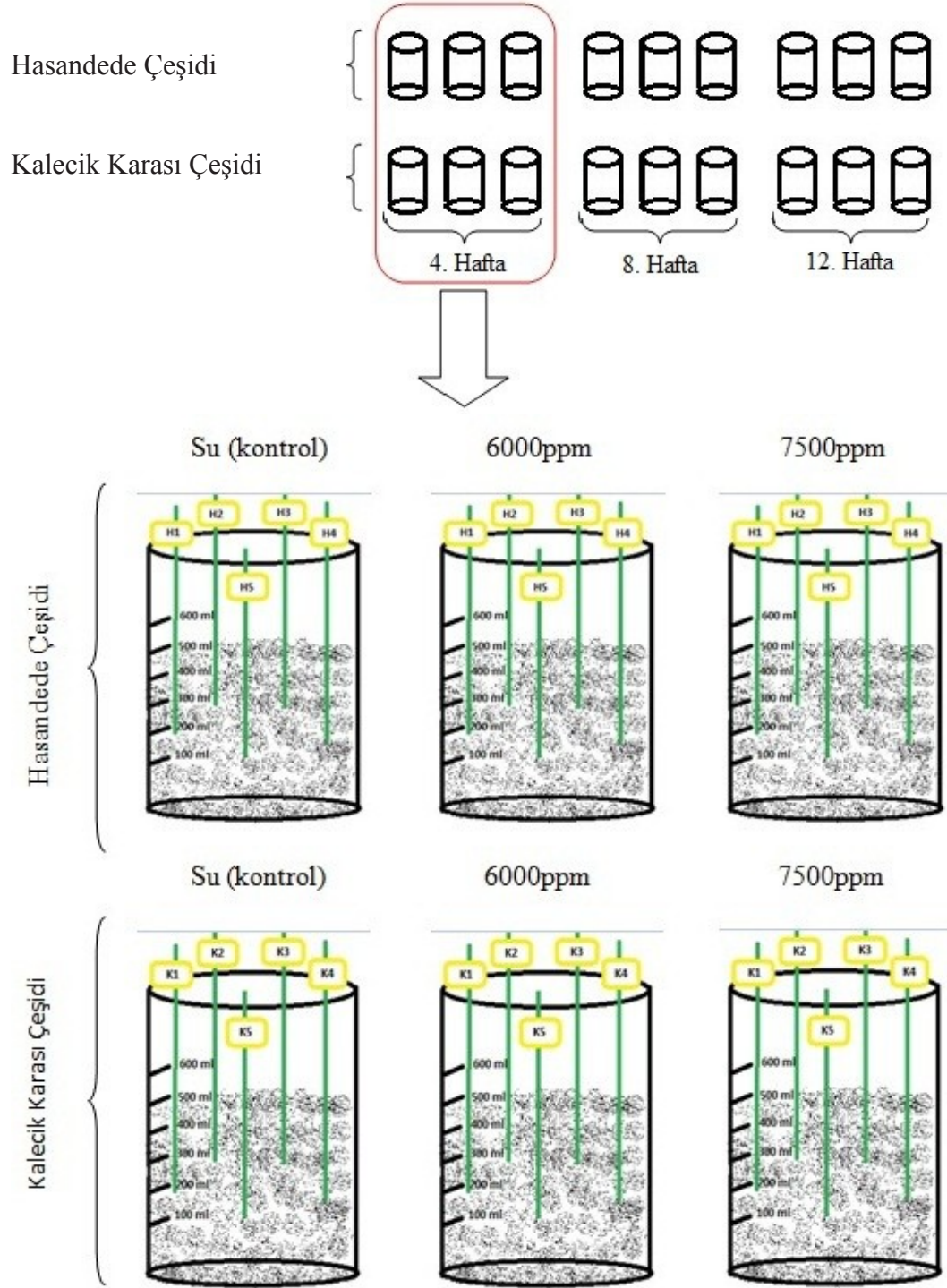
Su (kontrol) ile birlikte 6000 ppm ve 7500 ppm derişimler de bulunan IBA çözeltileri, hızlı daldırma metodunda kullanılmak üzere, 90 adet çelikten her birinin 45°'lik açıyla kesilmiş alt kısmında bulunan ilk 3 cm lik bölümüne, 5 saniye süre ile hızlı daldırma metodu uygulandı. Bu uygulamanın ardından zaman kaybı olmadan çeliğin IBA'ye maruz kalan bölümünde ki, 5 cm lik kısmı perlit içerisinde kalacak şekilde yerleştirildi. En son çelik yerleştirildikten sonra cam ortamlara 150 ml su eklendi. Ayrıca bu uygulama sırasında her cam ortamda aynı çeşitten, ayrı 5 bireyin bulunmasına dikkat edildi ve her 4 hafta sonrası gelişmelerin not edilmesi sırasında oluşabilecek karışıklıkları ve sıkıntıları önlemek için, çeliklere numaralı bantlar takıldı. Bu bantlar sırası ile; Hasandede çeşidi için H1,H2,H3,H4,H5 ve Kalecik Karası çeşidi için K1,K2,K3,K4,K5'tir. Bu uygulama sonrasında da her 4 hafta sonunda ısıtmalı ortamdan çıkarılarak kök gelişimi gözlenecek ve tekrar ısıtmalı ortama konulmayacak olan 6 cam kap, Şekil 2.1.'de verilmiştir. Bu sistemde 4, 8 ve 12 ci hafta sonrası kontrollerinden dolayı, 3'er tekerrürlü olacağından toplam 18 (3 x 6) cam kap, ısıtmalı ve 12 saatlik periyotlar ile aydınlık-karanlık evre dönüşümlü ortama, 24 Mart tarihinde, aynı anda yerleştirildi. Her haftanın sonunda ısıtmalı kapalı ortam aydınlık evrede ve gündüz saatlerinde 30 dakika havalandırılmış ve her cam ortamdaki azalan su miktarı tekrar 150 ml ye tamamlandı. Böylece nem, ortam sıcaklığı, ışık miktarı, köklenme ortamı gibi değerler sabit olarak kabul edildi. Ortamda oluşabilecek herhangi bir aksaklığa karşı tüm ortam gözetim altında tutuldu. Her 4 hafta sonunda çıkarılan 6 adet cam ortamda ki çeşitlerin ve bireylerin kök gelişimleri uzunluk, adet ve kök kalitesi notu şeklinde rapor edildi. Rapor edilen bireyler tekrar ısıtmalı ortama alınmadan diğer bireylerle uygulama, 8. hafta sonuna ve son olarak 12. hafta sonuna kadar aynı şekilde sürdürüldü.

Bireyler şu hususlara göre rapor edildi;

Kök kalitesi notu, her çeliğin sahip olduğu kök sistemi 0-4 arasında değişen değerlere sahip 5 ayrı grup halinde rakamsal olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmede;

- 0 = Köklenme olmadığını  
1= Zayıf köklenme olduğunu (0-25 mm)  
2= Orta düzeyde köklenme olduğunu (26-50 mm)  
3= Köklenmenin iyi olduğunu (51-75 mm)  
4= Köklenmenin çok iyi olduğunu belirtilmektedir. (>75 mm)

Ayrıca; perlit içerisinden ölçüm amacıyla çıkartılan köklerden, perlit ortamına takılarak, kök kısımlarının bir bölümü perlit içerisinde kaldığı görüldü. ıkartılırken perlit içinde kalan makro boyuttaki kök parçaları çıkartılarak rapor edildi. Ancak 1 cm boyutun altında ki kök parçalarının tahmini sayı ve boyutlarının verileri rapora dahil edildi.



Şekil 2.1. IBA'in Hasandede ve Kalecik Karası kök gelişimi için oluşturulan cam ortamlar

### **2.3. Bitkisel Dokudan DNA İzolasyonu**

Genetik çalışmaların başlıca ögesi konumunda bulunan DNA (Deoksi Ribonükleik Asit), çalıştığımız tür ve çeşitlerden alınan dokulara uygulanan spesifik işlemler sonucunda elde edilen genetik materyalin kendisidir, bu çalışma içerisinde RAPD-PCR metodunda kullanılmak üzere eldesi sağlandı. Bu elde işleminde hedef olarak belirlenen başlıca unsur, izolasyon sonucu elimizde bulunan DNA yoğunluğu ve saflık derecesidir. Bu unsurlardan uzak olan DNA molekülü ile yapılan çalışmaların sonra ki aşamalarında, sonuç elde edilememesi veya net sonuçların ortaya konulamaması gibi durumlar söz konusu olabilmektedir. Yani, “temel madde” olarak gördüğümüz DNA çalışmanın en önemli unsurudur.

DNA izolasyon işlemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan solüsyonlar, hangi dokudan izolasyon yapılacağına göre değişken olup, ilgili izolasyon protokolüne bağlı kalınarak uygulanabilmektedir [58,75,76,77,78]. Ayrıca, hazır olarak piyasadan temin edilen çeşitli markaların spesifik dokulara uygun DNA izolasyon kitiyle de DNA elde işlemine kolayca gidilebilir. Kit kullanımı oldukça pratik, zaman açısından hızlı bir çözüm olduğu ve genel olarak tercih edildiği bilinmektedir.

Yapılan bu çalışma da her iki yöntemle de DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinden 28'er birey uygulamaya tabi tutuldu. Bitkisel doku olarak *Vitis vinifera*'nın yaprakları kullanıldı. Yapraklar her iki izolasyon yönteminde de sıvı azot kullanılarak izolasyon basamaklarının ilk aşamasına hazır hale getirilmek için havanda ezilmek suretiyle toz haline getirildi.

#### **2.3.1. DNA İzolasyon Kiti Kullanılarak DNA Elde Yöntemi**

DNA izolasyonu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) protokolüne bağlı kalınarak gerçekleştirildi.



### 2.3.2. Bitkisel Dokudan DNA İzolasyon Yöntemi

Bitkilerde DNA izolasyonundan önce temin edilen dokunun korunması oldukça önemlidir. Temin edilen bitkisel dokular izolasyon sırasına kadar soğuk ve nemli yerlerde saklanmalıdırlar. Bitkisel dokuların dikkatli bir şekilde korunması izolasyon sonrası elde edilen DNA'nın kalitesini olumlu şekilde etkilemektedir. Bitkilerden DNA izolasyonu genel olarak aşağıda belirtilen prensiplere göre yapılmaktadır; bitkisel hücrelerini, hayvansal hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri bitki hücrelerinin selülozdan yapılmış bir hücre duvarı içermesidir. Bitkilerdeki hücre duvarı, bitkisel dokunun sıvı azot ya da kuru buz içerisinde öğütülmesi ile kırılır ve böylece DNA hücre içerisinde serbest kalır. Hücre duvarı kırıldıktan sonra, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ve PVP (Polyvinylpyrrolidone) gibi deterjanlar kullanılarak hücre zarı parçalanır. Homojen hale getirilen bitki hücresi içerisindeki DNA'ya bağlı proteinler kloroform ya da fenol karışımı eklenerek uzaklaştırılır. RNA'yı yıkan RNaz enzimi kullanılarak solüsyon içerisindeki RNA'lar uzaklaştırılır. DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesi için etil alkol ile bir ya da birkaç defa yıkama yapılır. DNA izolasyonu sırasında DNA'yı parçalayan enzimler için en uygun olan pH düzeyinden kaçınılmalıdır. DNA'yı parçalayan enzimler olan DNazlar pH 7,0 civarında çalışırlar (Dunham ve Bryant 1983). Bu durumda bitki ekstraksiyon bufferi pH 8,0 hatta pH 9,0 civarında olmalıdır.

Bitki hücreleri genelde çok sayıda ikincil bileşik içerirler, bunun sonucu olarak belirli türlerde yüksek düzeydeki ikincil bileşikler DNA'nın saflığını bozmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için alternatif ekstraksiyon tamponları kullanılır. Teknik ve özel sorunlara çözüm getirmek amacıyla izolasyon tamponları kullanılır [79].

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların saflıkları ve miktarlarının belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemler kullanılır, DNA agaroz jelde koşularak standart DNA'larla karşılaştırma yapılır veya son dönemde sıklıkla kullanılan ve oldukça hızlı ve basit bir çözüm olan Nano-drop cihazıyla direk olarak bu veriler sağlanır.

Çalışmada kullanılan bitki çeşitlerinden temin edilen tam büyüklüğe gelmiş taze yapraklar saf su altında yıkanmış alimünyum folyo ile sarılmıştır ve ardından örnekler sıvı azot içerisine batırıldı. Her örnek havan içerisinde sıvı azot ile öğütülerek santrifüj tüplerine yerleştirildi [80].

- 1– Toz haline gelmiş yapraklar 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı ve üzerine 750µl CTAB'lı mikroekstraksiyon tamponu ve 4 µl 2–merkaptolanol eklendi. Örnek ile tamponun iyice karışması sağlandı.
- 2– Örnekler 65°C'deki su banyosunda yaklaşık 45 dakika bekletildi. 15 dakikada bir örnekler alt–üst edilerek tampon ile iyice karışması sağlandı.
- 3– Sıcak su banyosundan alınan örnekler oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. Üzerine 750 µl kloroform: izoamil alkol (24:1 oranında) eklendi ve iyice karışması sağlandı.
- 4– Ependorf tüpler içindeki örnekler 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
- 5– Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alındı. Üzerine 750 µl etanol (% 100'lük, soğuk) ve 250 µl, 0,3 M sodyum–asetat çözeltisi eklendi. Bu aşamada presipite olan DNA, gözle görülebilir hale gelir pipet ucuna sarılarak yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. Alternatif olarak 10.000 rpm'de 30 sn kadar santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve alkolün fazlası uzaklaştırıldı.
- 6– DNA 200 µl Tris-EDTA (TE) tamponunda çözüldü. Bu karışıma 20 µl RNase eklendi ve 37 °C'deki su banyosunda 3 saat bekletildi.
- 7– Örnek üzerine 250 µl fenol ve 250 µl kloroform eklendi. Birkaç kez alt–üst edilerek karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
- 8– Yeni bir tüpe alınan süpernatantın üzerine 600 µl etanol (%100, soğuk) eklendi ve DNA'nın çökmesi sağlandı.

9– Örnek tüpleri 13.000 rpm’de kısa süre santrifüj edilerek, alkolün fazlası uzaklaştırıldı.

10– DNA pelletinin üzerine 400 µl soğuk %70’lik etanol eklendi. 13.000 rpm’de kısa süre santrifüj edilerek alkolün fazlası uzaklaştırıldı.

11– DNA 100 µl TE tamponunda çözüldü.

12– DNA örnekleri kullanıma kadar –20°C’de saklandı.

Kullanılan DNA izolasyon yöntemi Hulbert ve Bennetzen (1991) 'den modifiye edildi.

#### **2XCTAB Mikroekstraksiyon Tamponu, pH 7.5 (100 ml)**

0.025 M - EDTA

2.175 M - NaCl

0.1 M - Tris

%2 - CTAB

#### **TE Tamponu (pH 7.5)**

10 mM Tris–HCl

1 mM EDTA

#### **2.3.3 Uygun Ölçülerdeki DNA’ların Seçimi ve Saklanması**

Elde edilen DNA’ların saflık dereceleri ve yoğunlukları Nano-drop cihazıyla kontrol edilerek, izolasyon sonucu DNA eldesi işleminden geçen en uygun yoğunlukta ve saflıkta 25 birey içlerinden seçilerek, bir sonra ki aşama olan RAPD-PCR sürecine alındı. Ayrıca RAPD-PCR metodunda kullanılmak üzere elde edilen ve ardından uygun yoğunluk ve saflık derecelerine sahip olduğu tespit edilen DNA örnekleri -20 °C soğuk ortamda muhafaza edildi.

## 2.4. RAPD-PCR Uygulamaları

### 2.4.1. Primerlerin Seçimi

Bu popülasyonlardaki allellerin sıklığının tespitinde önceden kullanılmış primerlerden optimizasyon aşamasında 11 tane primer denendi. Bu primerler; OPA-01, OPA-05, OPA-18, OPB-03, OPB-07, OPD-15, 1F, 2F, 4F, F-05, F-06'dır. Ancak Çizelge 2.1'de belirtilen iki adet primer dışında diğer primerlerden sonuç alınamadı.

**Çizelge 2.1.** Çalışmada kullanılan primerler.

	<b>Primer Dizileri</b>
<b>1. OPA-01</b>	5'-CAG GCC CTT C-3'
<b>2. 4F</b>	5'-CAT CCC CCT G-3'

### 2.4.2. PCR Koşulları

PCR yapay oligonükleotitler kullanılarak in vitro ortamda hedef bölgenin çoğaltılmasıdır. Diğer bir ifade ile DNA replikasyonunun in vitro ortamda gerçekleşmesidir [81].

Bir PCR için aşağıdaki bileşenlere ihtiyaç vardır:

**Kalıp DNA:** Genomik, plazmid, faj DNA'sı ya da herhangi bir DNA parçası kullanılabilir.

**Polimerazlar:** dNTP kullanarak çalışılan hedef dizinin sentezini katalizlerler. Çeşitli türleri olsa da sıklıkla *Thermus aquaticus*'tan elde edilen taq polimerazlar kullanılır.

**Primerler:** Kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktasını oluşturan genellikle 18-25 nükleotit uzunluğundaki yapay oligonükleotitlerdir.

**dNTP:** Deoksiribonükleozid trifosfat olarak isimlendirilen dNTP'ler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) primerden sonra zincirin uzaması için gereklidir.

**Tamponlar ve MgCl<sub>2</sub>:** Reaksiyon sırasında enzimin aktivitesini arttırmak için kullanılır [82,83].

Bir PCR reaksiyonu bu bileşenlerin eşliğinde üç basamakta gerçekleşir:

- 1- Kalıp DNA yüksek sıcaklıkta denatüre olarak zincirler birbirinden ayrılır (ayrılma=denatürasyon).
- 2- Primerler denatüre olmuş zincirlere bağlanır (bağlanma=*annealing*).
- 3- Primerlerin bağlanmasından itibaren polimeraz enziminin de aktivesi ile DNA sentezi gerçekleşir (uzama=*extention*).

PCR koşullarının optimizasyonu için önceden PCR yöntemi ile yapılan çalışmalar incelendi ve en iyi sonuçların alınmış olduğu çalışmalardan yararlanılarak optimizasyon gerçekleştirildi.

**Çizelge 2.2.** Çalışmada kullanılan reaktiflerin miktarları

Kullanılan Reaktifler	Miktarları	
	1. Primer	2.Primer
5X Green Tag buffer (PROMEGA®):	4 µL	4 µL
MgCl <sub>2</sub> çözeltisi 25 mM (PROMEGA®):	1.2 µL	1.2 µL
dNTP 10 mM çözeltisi (Sibenzim)	0.25 µL	0.25 µL
Primerler ( <i>RAPD primers</i> ) forward	1 µL	1 µL
Tag Polimeraz Enzimi (PROMEGA®):	0.1 µL	0.1 µL
DNA	1 µL	1 µL
dH <sub>2</sub> O	12.45 µL	12.45 µL
TOPLAM	20 µL	20 µL

PCR için DNA dışındaki tüm bileşenler 0,5 mL'lik ependorf tüplere hazırlandı ve önceden DNA'ları konulmuş olan 0,2 mL'lik ependorf tüplere toplam hacim 20 µL olacak şekilde dağıtıldı. Sonra vurularak karıştırılan tüpler içinde hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi ve PCR cihazına yerleştirildi. PCR cihazına yerleştirilen DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (denatürasyon) için 94 °C, primerlerin DNA zincirinde uygun bölgelere bağlanması (*annealing*) için 35 °C, zincirin uzaması (*extention*) için 72 °C sıcaklık uygulanmaktadır. Bu üç aşama bir döngü adını almaktadır. Çalışmamızda 35 döngü uygulandı ve sentez işleminin tamamlanabilmesi için 72 °C de 10 dakika bekletildi [84].

Çalışmada kullanılan 1. ve 2. primer için en uygun olan PCR koşulları şu şekilde belirlendi:

Başlangıç Denatürasyonu → 94 °C de 5 dk

Ayrılma (Denatürasyon) → 94 °C de 30 sn

Primer bağlanması (*Annealing*) → 35 °C de 1 dk

Uzama (*Extention*) → 72 °C de 2 dk

} 35 döngü

Son uzama (*Final Extention*) → 72 °C de 10 dk

## 2.5. Elektroforez Tekniği

Çalışmada jel yoğunluğu, elektrik akımı ve jelde yürütme süresi için en uygun değerler deneme-yanılma yöntemi ile belirlendi. Elektrolit çözeltisi olarak TBE (Tris-Borat-EDTA) kullanıldı. Çözelti 10 misli konsantre olarak hazırlandı (54 g Tris, 27.5 g Borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA). Bu stok çözelti 10 misli distile su ile sulandırılarak elektrolit çözelti olarak kullanıldı.

### **2.5.1. Agaroz Jelin Hazırlanması**

Çalışmamızda %1.7 lik agaroz jel kullanıldı. Agaroz jel hazırlanırken 1X TBE tamponundan 180 mL alındı ve içerisine 3.060 gr agaroz eklenip karışım berraklaşana kadar kaynatıldı. Karışım 50-60 dereceye kadar soğuduğunda içerisine 0,5 µg/mL etidyum bromür eklenip karıştırıldı. DNA molekülünü boyamak için kullanılan etidyum bromid mutajenik bir etkiye sahiptir. Bu yüzden çalışmada kullanılan jeller ve etidyum ile kirlenen diğer katı maddeler tıbbi atık olarak saklandı.

### **2.5.2. Agaroz Jelin Dökülmesi ve Örneklerin Yüklenmesi**

50-60 °C sıcaklıktaki jel, tarakları takılmış olan jel tepsisine döküldü ve içerisinde hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Taraklar yerleştirildi ve kuyucukların oluşması sağlandı. Jel donduktan sonra taraklar çıkarıldı ve jel içerisinde 1X TBE yürütme tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Soğuyarak katılaşmış olan jel üzerine üst kısmını tamamen örtecek kadar 1X TBE döküldü. PCR ürününden yaklaşık 10µL alındı ve jel üzerinde oluşan kuyucuklara yüklendi. Çıplak gözle görülebilen 5X Green Taq Buffer da bulunan ve UV altında ışımaya yapan boya, elektroforez sırasında DNA bantlarının yaklaşık konumunu göstermektedir. Ürünleri kontrol etmek için 100 bç lik, 5 µL marker yüklendi [85].

### **2.5.3. Örneklerin Jelde Yürütülmesi**

Örnekler en iyi sonucun alındığı 110 voltta 45 dk yürütüldü.

## **2.6. Verilerin Gözlemlenmesi ve Kaydedilmesi**

Yürütülen örnekler SYNGENE (Gene Genius Bio Imaging System) marka UV cihazı sehpasına alınarak gözlemlendi. Jel görüntüleme sistemi ile elde edilen bant görüntüleri bilgisayara aktararak yorumlandı ve siyah beyaz fotoğraflandı.

## 2.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

### 2.7.1. Köklendirme Verilerinin İstatistiksel Analizi

IBA in, bazı *Vitis vinifera* çeşitlerinde köklenme başarısı üzerine etkisini görmek üzere, uyguladığımız yöntemler sonucu elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi için SPSS paket program dahilinde; Derişimler (kontrol, 6000ppm, 7500ppm), haftalar (4. ,8. ve 12. hafta sonları elde edilen gelişim değerleri), çeşitler (Hasandede ve Kalecik Karası çeşidi) ve bireyler arasında ki karşılaştırmalı analizlerin her biri için, Friedmann, Wilcoxon işaret testi ve Kruskall- Wallis testi uygulanmıştır.

### 2.7.2. RAPD-PCR Verilerinin İstatistiksel Analizi

Görüntülenen agaroz jellerdeki PCR ürünlerine bakılarak, monomorfik ve polimorfik bantlar tespit edildi. İki farklı üzüm çeşidine ait populasyondan elde edilen DNA örnekleri, 2 primer ile tarandı. Veriler POPGENE software (POPGENE Version 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi.

#### 2.7.2.1. Allel Frekansları

Diploid populasyonlar için allel frekansları aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\text{Her bir RAPD allelinin frekansı} = X_i = \sum \frac{N_i}{N}$$

N; verilen populasyondaki birey sayısı

N<sub>i</sub>; belirli RAPD bantlarının bulunduğu diploid örneklerdir [86].

#### 2.7.2.2. Genetik Varyasyonların ölçülmesi

Populasyondaki parametreler değişik parametreler ile ölçülebilir [86].



### 2.7.2.2.1. Lokusların Yüzdesi

Bir lokus dikkate alındığında en yaygın allelin popülasyonda ki oranı %95'in (ya da %99) altındaysa, bu lokus polimorfik olarak değerlendirilir [87]. Bu çalışmada polimorfik lokus için 0.99 değeri esas alındı. Eğer çalışmada yeterli sayıda örnek ve yeterli lokus varsa genetik varyasyon, polimorfik lokus ve her lokusta ortalama heterozigotluk ile ölçülebilir. Polimorfik lokusların yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanabilir [86];

$$P = n_p / r$$

P; polimorfik lokusların yüzdesi

$N_p$ ; polimorfik lokusların sayısı

r; toplam lokus sayısı

### 2.7.2.2.2. Heterozigotluk

Gen frekansı göz önünde bulundurulduğunda genetik varyasyon, ortalama heterozigotluk veya gen çeşitliliği ile ölçülebilir. Eğer popülasyon rastgele çiftleşiyorsa ve  $i$ 'nci allelin popülasyondaki sıklığı  $X_i$  ise beklenen heterozigotluk aşağıdaki gibi hesaplanabilir [86].

$$\hat{h} = 1 - \sum 1 X_i^2$$

Bir lokustaki heterozigotluk tahmini  $\hat{h} = 2n (1 - \sum 1 X_i^2)$  ile yapılabilir [86].

### 2.7.2.2.3. Allellerin Sayısı

Genetik çeşitliliğin tahmin edilebilmesi için lokustaki allellerin sayısından ( $n_a$ ) yararlanılabilir. Ancak bu değerler örnek sayısına bağlı olarak değişebilir.

$$\text{Ortalama } (n_a) = \sum i n_{ai}$$

$n_a$ : allellerin sayısı

$n_{ai}$ : i'ninci lokustaki allellerin sayısı [86]

### 2.7.2.2.4. Bir lokustaki Allellerin Etkili Sayısı

Allel sayısı ortalama olarak zararlı genler hakkında fikir verebilir, allel sayısı ne kadar az ise genetik varyasyon o kadar küçük demektir. Etkili allel sayısı aşağıdaki gibi hesaplanabilir (86);

$$n_e = 1 / \sum X_i^2$$

$n_e$  : allellerin etkili sayısı

$X_i$ : i'ninci allelin sıklığı

### 2.7.2.2.5. Shannon'un Bilgi Endeksi

Shannon'un bilgi içeriği her populasyonda RAPD bantlarının sıklığı ile hesaplanmıştır [86].

$$H_0 = -\sum p_i \ln p_i$$

$H_0$  : Shannon'un bilgi içeriği

$P_i$  : RAPD bantının sıklığı

### 2.7.2.3. Alt Populasyonların Gen Farklılıklarının Analizi

Populasyonlar arasında ve populasyon içinde gen farklılıklarının bilinmesi gerekmektedir. Bir alt populasyona ait gen kimliği (1-gen farklılığı) aşağıdaki formülle hesaplanabilir [86];

$$J_k = \sum X_{ki}^2$$

$J_k$  : gen kimliği

$X_{ki}$  : k'ninci alt populasyonun i'ninci allelinin sıklığı

Bir alt populasyonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu  $H_s$ 'dir. Bu aşağıdaki formülle hesaplanabilir [86];

$$H_s = \sum_j h_j / s$$

$h_j$  : j'ninci alt populasyonda beklenen heterozigotluk

$s$  : alt populasyon sayısı

Tüm populasyonlarda gen kimliği ;  $J_k = \sum X^2$  ile hesaplanabilir [86].

$J_k$  : gen kimliği

$X$  : allellerin ortalama sayısı

Alt populasyonlarda bireylerin beklenen heterozigotluk  $H_s$  ile gösterilir ve

$H_s = \sum \hat{h}_j / s$  ile hesaplanır [86].

$H_j$ : j'ninci alt populasyonda beklenen heterozigotluk

$s$  : alt populasyonların sayısı

Toplam populasyonlardaki gen kimliği  $J_T = \sum X_i^2$  ile hesaplanabilir [86].

$J_T$  : gen kimliği

$X_i$ : ortalama allel sayısı

Toplam populyasyonda bireylerin beklenen heterozigotluk,  $H_T = 1 - \sum X_{ia}^2$  ile hesaplanabilir [86].

$H_T$  : toplam populyasyonda bireylerin beklenen heterozigotluk durumu

$X_{ia}$  : tüm alt populyasyonlarda ortalama  $i$ 'nci allelin sıklığı

Toplam populyasyonda gen çeşitliliği  $H_T = 1 - J_T$ 'dir [86].

$H_T = H_S - D_{ST}$   $D_{ST}$  : alt populyasyonlar arasında ortalama gen çeşitliliği

Alt populyasyonlar arasında ki gen farklılaşmasının göreceli büyüklüğü  $G_{ST}$  olarak adlandırılır ve  $G_{ST} = D_{ST} / H_T$  eşitliği ile bulunabilir [86].

$D_{ST}$  : alt populyasyonlar arasında ortalama gen çeşitliliği

$H_T$  : toplam populyasyonda ki gen çeşitliliğidir.

Alt populyasyonlar arasında ortalama minimum genetik mesafe  $D_m$  ile ifade edilir [86].

$D_m = sD_{ST} / (s - 1)$  eşitliği ile hesaplanabilir.

$S$  : alt populyasyon sayısı

### 3. SONUÇ VE TARTIŞMA

#### 3.1. IBA'ın Köklenme Başarısı Üzerine Etkisi

IBA uygulaması sonucu 3 tekrarlı cam ortamlar 4. , 8. ve 12. hafta sonlarında sırası ile dışarı alınarak, ortalama kök adedi, kök uzunluğu ve kök kalitesi notu belirlendi. Kök kalitesi notu her bir bireyin, her kontrol sonu ve her derişim için rapor edilen en kısa kök ile en uzun kök boyutunun ortalaması alınarak yapılmıştır. Bu değerler bir tablo haline getirilerek Çizelge 3.1. , Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3. verilmiştir. Ayrıca her bireyin kök uzunluğu ve bitkisel gelişimi de fotoğraflanarak takip edildi ( Şekil 3.1., Şekil 3.2.).

**Çizelge 3.1.** 4. Hafta sonunda yapılan kontrollerde, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin kök gelişim değerleri

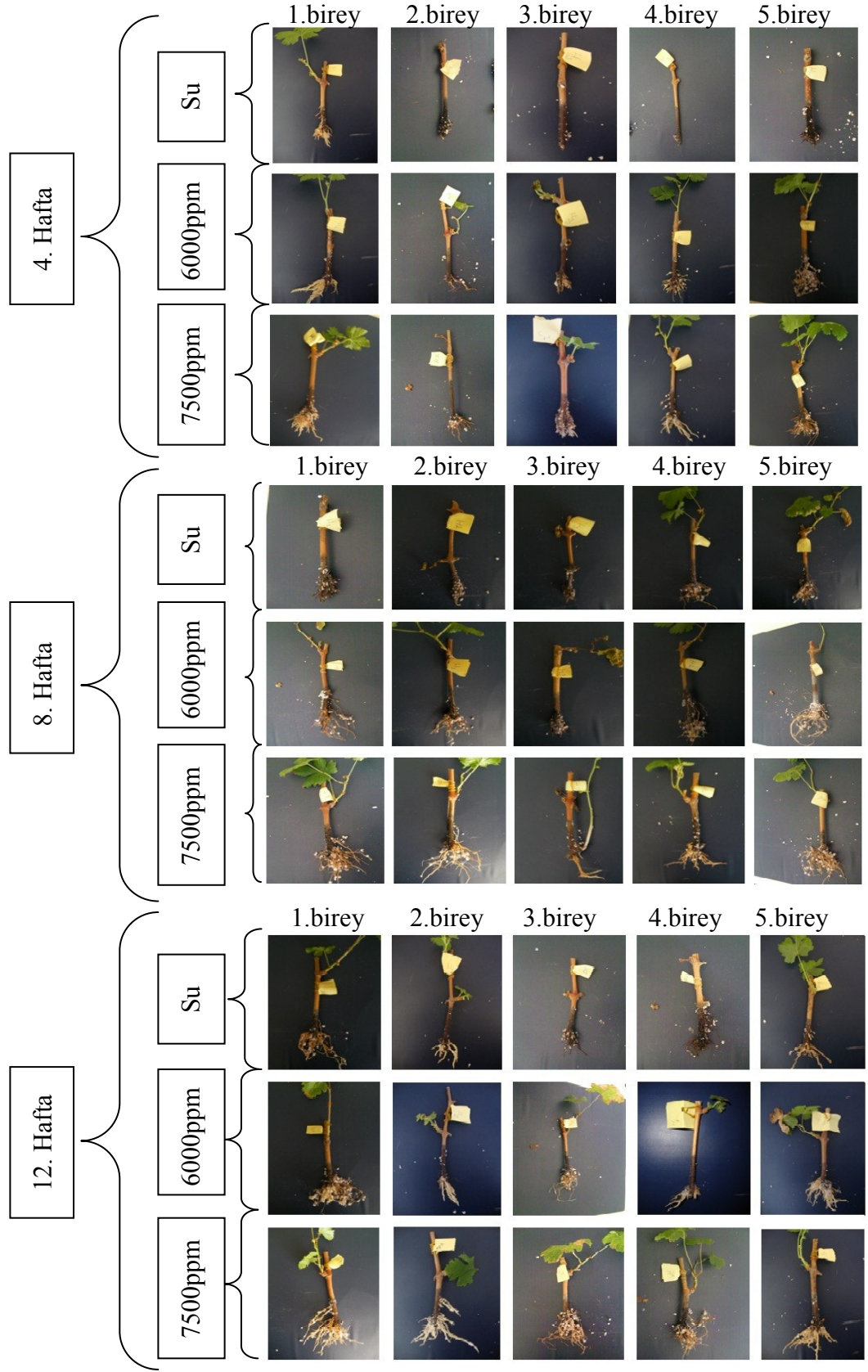
4.Hafta Sonu	HASANDEDE ÜZÜMÜ ( <i>Vitis vinifera</i> )			KALECİK KARASI ( <i>Vitis vinifera</i> )		
	SU	6000 ppm	7500 ppm	SU	6000 ppm	7500 ppm
1. Nolu Birey	10-12 adet kök 0,5-2 cm (1)	12-14 adet kök 1-3 cm (1)	14-16 adet kök 1-4 cm (1)	Köklenme gözlenmedi. (0)	1-2 adet kök 0,1-0,5 cm (1)	4-6 adet kök 0,5-1 cm (1)
2. Nolu Birey	8-10 adet kök 0,1-0,3 cm (1)	8-10 adet kök 0,5-3 cm (1)	10-12 adet kök 1-3 cm (1)	Köklenme gözlenmedi. (0)	4-6 adet kök 0,1-0,5 cm (1)	6-8 adet kök 0,5-2 cm (1)
3. Nolu Birey	Köklenme gözlenmedi. (0)	8-10 adet kök 0,5-1 cm (1)	10-12 adet kök 0,5-2 cm (1)	Köklenme gözlenmedi. (0)	2-4 adet kök 0,5-1 cm (1)	4-6 adet kök 0,5-1 cm (1)
4. Nolu Birey	Köklenme gözlenmedi. (0)	14-16 adet kök 0,5-2 cm (1)	14-16 adet kök 1-4 cm (1)	Köklenme gözlenmedi. (0)	4-6 adet kök 0,1-0,5 cm (1)	8-10 adet kök 3-6 cm (2)
5. Nolu Birey	8-10 adet kök 0,1-0,5 cm (1)	10-12 adet kök 2-5 cm (2)	12-14 adet kök 2-6 cm (2)	6-8 adet kök 0,5-1 cm (1)	8-10 adet kök 0,1-1,5 cm (1)	8-10 adet kök 1-4 cm (1)

**Çizelge 3.2.** 8. Hafta sonunda yapılan kontrollerde, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin kök gelişim değerleri

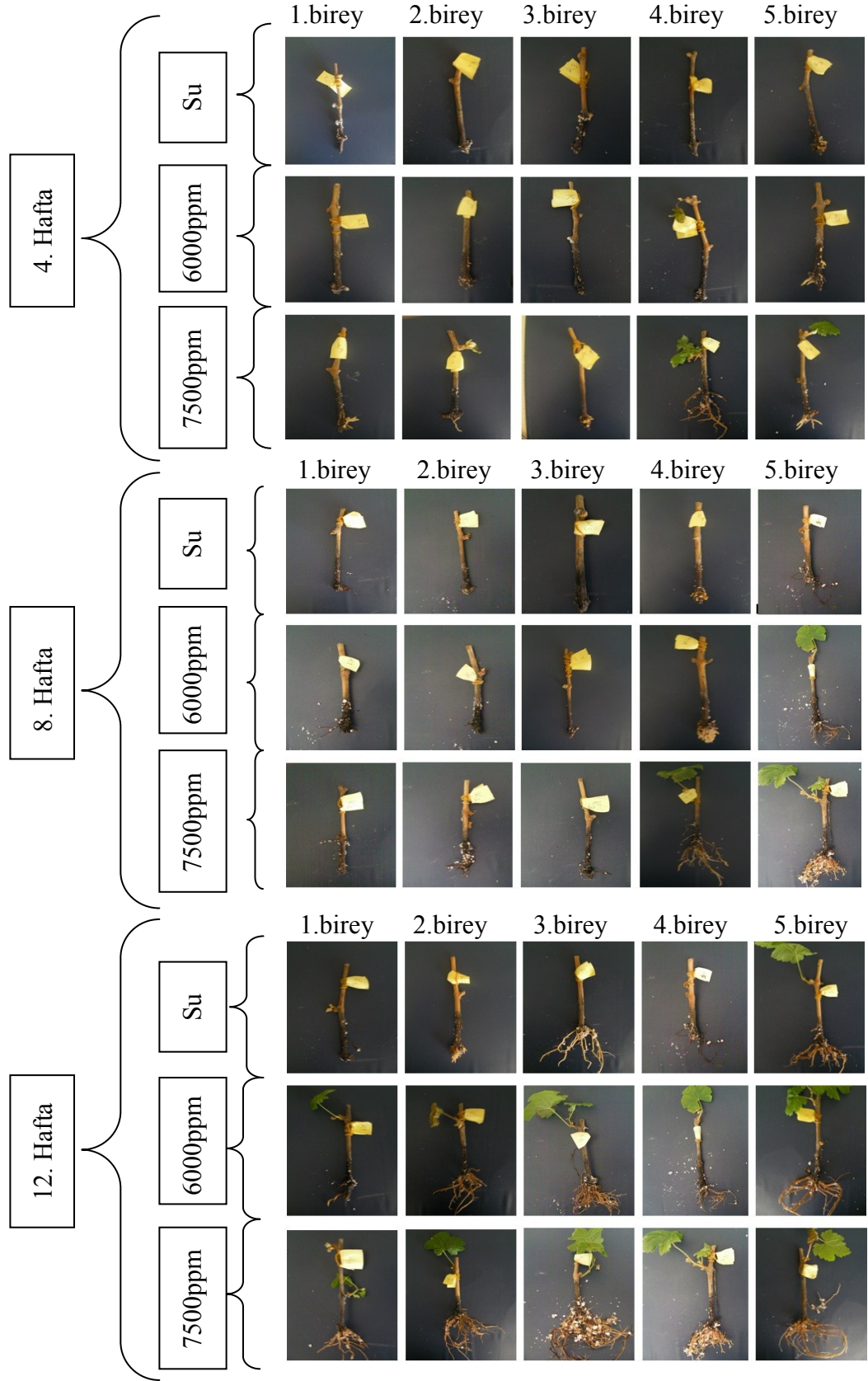
8. Hafta Sonu	HASANDEDE ÜZÜMÜ ( <i>Vitis vinifera</i> )			KALECİK KARASI ( <i>Vitis vinifera</i> )		
	SU	6000 ppm	7500 ppm	SU	6000 ppm	7500 ppm
1. Nolu Birey	12-14 adet kök 1- 3,5 cm (1)	14-16 adet kök 1-6 cm (2)	18-20 adet kök 2-8 cm (2)	2-4 adet kök 0,5-2 cm (1)	3-4 adet kök 1-4 cm (1)	8-10 adet kök 3-5 cm (2)
2. Nolu Birey	12-14 adet kök 0,1-0,5 cm (1)	12-14 adet kök 1-5 cm (2)	14-16 adet kök 3-7 cm (2)	4-6 adet kök 0,5-1 cm (1)	8-10 adet kök 0,5-1 cm (1)	12-14 adet kök 1-3 cm (1)
3. Nolu Birey	6-8 adet kök 0,5-1,5 cm (1)	10-12 adet kök 1-3 cm (2)	12-14 adet kök 1-7 cm (2)	1-2 adet kök 0,1-0,5 cm (1)	2-4 adet kök 0,5-1,5 cm (1)	6-8 adet kök 0,5-3 cm (1)
4. Nolu Birey	12-14 adet kök 1-5 cm (2)	14-16 adet kök 1-2 cm (1)	16-18 adet kök 3-7 cm (2)	10-12 adet kök 0,1-0,5 cm (1)	10-12 adet kök 0,5-1 cm (1)	16-18 adet kök 3-7 cm (2)
5. Nolu Birey	10-12 adet kök 3-7 cm (2)	14-16 adet kök 3-9 cm (3)	16-18 adet kök 4-10 cm (3)	8-10 adet kök 2-6 cm (2)	10-12 adet kök 1-5 cm (2)	18-20 adet kök 3-7 cm (2)

**Çizelge 3.3.** 12. Hafta sonunda yapılan kontrollerde, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin kök gelişim değerleri

12. Hafta Sonu	HASANDEDE ÜZÜMÜ ( <i>Vitis vinifera</i> )			KALECİK KARASI ( <i>Vitis vinifera</i> )		
	SU	6000 ppm	7500 ppm	SU	6000 ppm	7500 ppm
1. Nolu Birey	16-18 adet kök 3-7 cm (2)	18-20 adet kök 4-8 cm (3)	22-24 adet kök 4-10 cm (3)	2-4 adet kök 1-3 cm (1)	8-10 adet kök 2-2,5 cm (1)	10-12 adet kök 1-4 cm (1)
2. Nolu Birey	12-14 adet kök 1-3 cm (1)	12-14 adet kök 2-5 cm (2)	18-20 adet kök 1-9 cm (2)	7-9 adet kök 0,5- 2 cm (1)	12-14 adet kök 2-10 cm (3)	14-16 adet kök 2-12 cm (3)
3. Nolu Birey	8-10 adet kök 0,5-3 cm (1)	14-16 adet kök 1-7 cm (2)	18-20 adet kök 3-9 cm (3)	7-9 adet kök 4-8 cm (3)	24-26 adet kök 2-12 cm (3)	28-30 adet kök 4-14 cm (4)
4. Nolu Birey	18-20 adet kök 1-3 cm (1)	18-20 adet kök 2-6 cm (2)	22-24 adet kök 6-10 cm (4)	10 adet kök 0,5-6 cm (2)	12-14 adet kök 3-5 cm (2)	20-22 adet kök 3-7 cm (2)
5. Nolu Birey	10-12 adet kök 2-8 cm (2)	18-20 adet kök 3-9 cm (3)	20-22 adet kök 4-10 cm (3)	12 adet kök 2-6 cm (2)	16-18 adet kök 5-13 cm (4)	22-24 adet kök 6-14 cm (4)



**Şekil 3.1.** Hasandede çeşidinin tüm haftalar sonucunda ki genel gelişim görüntüsü



**Şekil 3.2.** Kalecik Karası çeşidinin tüm haftalar sonucunda ki genel gelişim görüntüsü



Elde edilen verilerin istatistiksel analizi doğrultusunda ortaya çıkan karşılaştırmalı tablolar, oluşturuldu (Çizelge 3.4., Çizelge 3.5., Çizelge 3.6., Çizelge 3.7., Çizelge 3.8., Çizelge 3.9.). Bu çizelgelerde bulunan genel başlıklardan U1’de; çeşitlere ait bireylerin ortalama kök uzunluğu, A1’de ise; çeşitlere ait bireylerin ortalama kök adedi alındı. Yapılan analiz sonuçlarını ve Hasandede-Kalecik Karası arasında ki, derişimlerde baz alarak, haftalara göre farklılığın anlamlı olup olmadığının ifadesi olan p değerleri tespit edildi.  $p < 0,05$  standardına göre değerlendirmesi yapıldı. Bu değerlendirmeye göre istatistiksel olarak;  $p < 0,05$  olduğunda bireylerin değerleri açısından “anlamlı fark olduğu” durumundan, diğer durumlarda ise bireylerin değerleri açısından “anlamlı fark olmadığından” bahsedilebilmektedir. Tablolar da ayrıca, fark olmayan durumlar aynı harf kullanılırken, fark olan durumlar ise farklı harf ile ifade edildi.

U1: Tablolar

**Çizelge 3.4.** 4. Hafta kök uzunluğuna ait gelişim tabloları

<b>Çeşitler</b>	<b>Su</b>	<b>6000 ppm</b>	<b>7500 ppm</b>
<b>Hasandede</b>	0,35 (a)	1,85 (b)	2,45 (c)
<b>Kalecik Karası</b>	0,15 (a)	0,49 (c)	1,95 (c)

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin farklı IBA derişimleri uygulanan 4.hafta sonunda, kök uzunluğundaki gelişime yönelik yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu, p değerine bağlı olarak yapılan karşılaştırmada; su (kontrol) ve 7500ppm IBA derişimin de ki gelişim açısından, çeşitler arasında fark olmadığı gözlenirken, 6000ppm IBA derişimin de farklı yönde gelişim gösterdiği görülmektedir.

**Çizelge 3.5.** 8. Hafta kök uzunluğuna ait gelişim tabloları

<b>Çeşitler</b>	<b>Su</b>	<b>6000 ppm</b>	<b>7500 ppm</b>
<b>Hasandede</b>	2,31 (a)	3,2 (a)	5,2 (b)
<b>Kalecik Karası</b>	1,32 (a)	1,6 (a)	3,55 (b)

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin farklı IBA derişimleri uygulanan 8. hafta sonunda, kök uzunluğundaki gelişime yönelik yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu, p değerine bağlı olarak yapılan karşılaştırmada; her iki çeşidinde gelişim olarak benzerlikler gösterdiği ve gelişimin tüm haftalarda benzer oranlarda olduğu gözlemlendi. Ayrıca gelişim açısından Su (kontrol) ve 6000ppm IBA çözeltisinde ki gelişim açısından fark bulunmazken, 6000ppm ve 7500ppm IBA çözeltisi arasında gelişim açısından fark olduğu görülmektedir.

**Çizelge 3.6.** 12. Hafta kök uzunluğuna ait gelişim tabloları

<b>Çeşitler</b>	<b>Su</b>	<b>6000 ppm</b>	<b>7500 ppm</b>
<b>Hasandede</b>	3,15 (a)	4,7 (b)	6,6 (c)
<b>Kalecik Karası</b>	3,3 (a)	5,65 (b)	6,7 (c)

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin farklı IBA derişimleri uygulanan 12. hafta sonunda, kök uzunluğundaki gelişime yönelik yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu, p değerine bağlı olarak yapılan karşılaştırmada; her iki çeşidinde gelişim olarak her derişimde benzer gelişim oranına sahip olduğu görülmektedir. Her iki çeşitte de derişimin artması kök gelişimini pozitif yönde etkilemiştir. Bu durum her derişimde gelişimi, oranlarına bağlı olarak farklı harflerle ifade edildi.

A1: Tablolar

**Çizelge 3.7.** 4. Hafta kök adedine ait gelişim tabloları

<b>Çeşitler</b>	<b>Su</b>	<b>6000 ppm</b>	<b>7500 ppm</b>
<b>Hasandede</b>	5,8 (a)	11,4(a)	13,0(b)
<b>Kalecik Karası</b>	1,4(a)	4,8(c)	7,0(c)

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinde, farklı IBA derişim uygulamalarının 4.hafta sonunda kök adedi verilerinin istatistiksel değerlendirme sonucu, p değerine bağlı olarak yapılan karşılaştırmada; iki çeşit arasında su grubunda benzer oranda gelişim gözlenirken, 6000ppm ve 7500ppm'lik IBA derişimlerinde farklı oranlarda gelişim gözlendi. Hasandede çeşidinde, su ve 6000ppm IBA derişimin de gelişim açısından farklılık bulunmazken, 6000ppm ve 7500ppm IBA derişimler de fark olduğu kaydedilmiştir. Kalecik karası çeşidinde ise; su ve 6000ppm IBA derişim de fark olduğu ancak 6000ppm ve 7500ppm arasındaki gelişim oranında fark olmadığı görülmektedir.

**Çizelge 3.8.** 8. Hafta kök adedine ait gelişim tabloları

<b>Çeşitler</b>	<b>Su</b>	<b>6000 ppm</b>	<b>7500 ppm</b>
<b>Hasandede</b>	11,4 (a)	13,8 (a)	16,2 (b)
<b>Kalecik Karası</b>	6,0 (c)	7,6(c)	13,0 (b)

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin farklı IBA derişim uygulamalarının 8.hafta sonunda, kök adedi ile ilgili istatistiksel değerlendirme sonucu, p değerine bağlı olarak yapılan karşılaştırmada; su ve 6000ppm IBA derişiminde, farklılık olduğu gözlendi. 7500ppm IBA derişim de ise; her ili çeşitte benzer gelişim gösterdi.

**Çizelge 3.9.** 12. Hafta kök adedine ait gelişim tabloları

<b>Çeşitler</b>	<b>Su</b>	<b>6000 ppm</b>	<b>7500 ppm</b>
<b>Hasandede</b>	13,8 (a)	17,0 (a)	21 (b)
<b>Kalecik Karası</b>	8,2 (c)	15,4 (a)	19,8 (b)

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin farklı IBA derişimler de uygulanan 12. hafta sonunda, kök adedinde ki gelişime yönelik yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu, p değerine bağlı olarak yapılan karşılaştırmada; Çeşitler arasında suda ki gelişim farklı oranlarda iken 6000ppm ve 7500ppm IBA derişimler de gelişim oranlarında fark olmadığı görülmektedir. Hasandede çeşidi içerisinde ki gelişim yalnızca 6000ppm ve 7500ppm IBA derişimleri arasında fark göstermekte iken, Kalecik Karası çeşidi içerisinde ki gelişim her üç derişimde de farklı oranlardadır.

H.Zenginbal ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışmada, Hayward ve Matua kivi (*Actinidia deliciosa*, *A. Chev.*) odun çelikleri, 1 Ocak'ta alınmıştır. Çelikler 3 ay süreyle soğuk hava deposunda +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Depodan çıkarılan çeliklere IBA'nın 0, 50, 100, 150, 2000, 4000, 6000 ppm dozları uygulanmıştır. Çelikler, alttan ısıtma ve mistleme ünitesine sahip ısıtmasız cam serada perlit ortamında 90 gün köklenmeye alınmıştır. Çalışmada köklenme oranı, canlı çelik oranı, kök sayısı ile kök kalitesi belirlenmiştir. Araştırma sonucunda en iyi sonuçlar, çeliklere 6000 ppm IBA uygulamasından elde edilmiştir [69].

V.Erdoğan ve A. Aygün'ün 2007 yılında yaptığı çalışmada, kara dut yeşil çeliklerin köklenmesi üzerine IBA'nın etkisi incelenmiştir. Çelikler Temmuz ayı ortasında alınmış ve IBA'nın farklı dozları uygulanmıştır. Serada sisleme ünitesinde perlit dikilen çelikler 60 gün süre ile köklenmeye bırakılmıştır. IBA uygulamaları köklenmeyi ortalama %14.2 arttırmıştır. Kontrol çeliklerinde köklenme % 42.5 olurken 4000ppm, 6000ppm ve 8000ppm dozlarında sırasıyla %57.5, %60 ve %52.5 köklenme elde edilmiştir. Ortalama kök sayısı, uzunluğu, kuru ağırlığı ve köklenme derecesi gibi kalite kriterleri en yüksek 8000ppm uygulamasında olmuştur [66].

D.Söyler ve N.Arslan, 2000 yılında yaptığı çalışmada, köklendirmede kullanılan farklı hormonların farklı dönemlerde elde edilen sonuçlarında Nisan ve Mayıs aylarında köklendirmeye alınan *Capparis spinosa L.* Çeliklerinden, hızlı daldırma metodu ile uygulanan 500ppm NAA %28, 250ppm IBA ise %29 oranında kök gelişimi gözlenmiştir [67].

K.Yıldız ve arkadaşları 2009 yılında yapılan çalışmada, kara duttan (*Morus nigra L*) alınan odun, yarı odun ve yeşil çeliklerin köklenme durumu incelenmiştir. Kontrol grubu yanında, odun ve yarı odun çeliklerinde 6000 ve 7500 ppm, yeşil çeliklerde ise 4000 ve 6000 ppm indol bütirik asit (IBA) uygulamaları yapılmıştır. Odun çeliklerinde, kontrol grubunda %9.5 oranında köklenme olurken, 6000 ppm IBA uygulamasından %24 oranında köklenme elde edilmiştir. 7500 ppm IBA uygulanan odun çeliklerinin hiç biri köklenmemiştir. Yarı odun çeliklerinde, kontrol uygulamasından %13.33 oranında bir köklenme elde edilirken bu oran 6000 ve 7500 ppm IBA uygulanan çeliklerde sırasıyla %60.00 ve %76.67 olarak gerçekleşmiştir. Yeşil çeliklerde ise hormon uygulaması yapılmayan kontrol çeliklerin %25'i köklenirken, 6000 ve 7500 ppm IBA uygulanan çeliklerin sırasıyla %55.9 ve %68.5'i köklenmiştir. Çelik başına kök sayısı, odun çeliklerinde hem kontrol hem de hormon uygulamasında düşük bulunmuştur. Yarı odun çeliklerinde kök sayısı kontrolde 1.0 iken, 7500 ppm IBA uygulanan çeliklerde 5.07'ye ulaşmıştır. Yeşil çeliklerde ise kontrol grubunda kök sayısı 4.38 olarak belirlenirken, bu değer 6000 ppm IBA uygulananlarda 10.33, 7500 IBA uygulananlarda ise 11.34 olarak tespit edilmiştir [71].

U.Şirin ve F.E. Tekintaş, 2004 yılında yaptığı çalışmada, *Uniperus oxycedrus* subsp. *Macrocarpa* çelikleri üzerinde, köklenmenin seyrini incelemek amacı ile perlit ortamına dikilen çeliklerden 4., 8., 12. ve 16. haftalarda alınan örnekler üzerinde incelemeler yapılmış ve Sonbahar döneminde dikilen çeliklerde adventif kök oluşumuna ilişkin herhangi bir hücre farklılaşması ve kök primordiası oluşumu görülmezken, çelik tabanında yoğun bir kallus dokusu gelişimi olduğu saptanmıştır. İkbahar döneminde ise bilezik alma uygulaması yapılan çeliklerde dikimden itibaren 4. haftada ve 16. haftada alınan örneklerde, kök primordiyumu gelişimi olduğu görülmüştür. Adventif kök hücrelerinin ilk çıkışının kambiyumun hemen dış

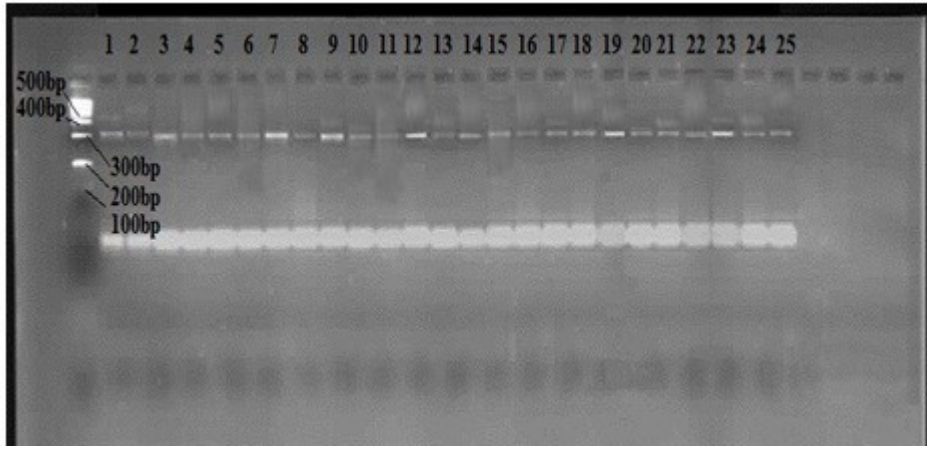
tarafından ve floem dokusu içinden yoğun bir hücre farklılaşması şeklinde geliştiği belirlenmiştir. Ayrıca sklerankimatik halkların bu türe özgü olarak oldukça fazla sayıda olduğu belirlenmiştir [72].

Bu çalışmada; önceki benzer çalışmalardan baz alınan ortam koşulları, çeliklerin alınma ve yerleştirilme süreçleri, uygulanan doz ve hormon seçimi gibi hususlar ile birlikte metod olarakta hızlı daldırma metodu kullanıldı. Benzer çalışmalardan baz alınarak uygulanan yöntemin sonuçlarında karşılaştıma yapılabilmesi açısından uygunluk sağlayacağı düşünüldü. IBA uygulamasının kök gelişimi konusunda pozitif yönde etki ettiği, kök kalitesi notu, kök adedi ve kök uzunluğu gibi değerler baz alındığında haftalara bağlı olarak kök gelişimini olumlu yönde etkilediği ve benzer çalışmalarla paralellik gösterdiği belirlendi. Friedmann, Wilcoxon ve Kruskal-Wallis testlerinden yararlanılarak, ortalama kök uzunluğu için, p değerine bağlı olarak yapılan analiz ve karşılaştırmalar sonucunda, Hasandede ve Kalecik Karası çeşitleri arasında ki, IBA yoğunluğuna bağlı değişen kök gelişiminde anlamlı fark olduğu görüldü. Haftalar arasında ve IBA derişimleri arasında ki ikili değerlendirmelerde bazı derişim veya haftalarda, p değerine bağlı olarak farklılığın olmadığı yönünde sayısal değerlere ulaşılmış olsa bile bu durum genel olarak ele alındığında gelişimin bütün ortak şartlara rağmen Hasandede ve Kalecik Karası çeşitleri arasında farklı oranlarda olduğunu ve iki çeşit arasında, IBA uygulamasında verilen farklı tepkiler ile bu çeşitler arasında ki farkı ortaya koymada yardımcı olabileceğinden söz edilebilir. Hasandede çeşidinde haftalara bağlı olarak 6000ppm değerinde IBA uygulanan çeliklerde optimum gelişim gözlenirken, derişimin artması ile gelişimin aynı hızla artmadığı ortalama sayısal değerlerde gözlenmektedir. Aynı durum Kalecik Karası çeşidine ait bireylerde 7500ppm değerine yaklaşıldığında görülmekle birlikte kök gelişimi bakımından daha yüksek dozda IBA uygulandığında gelişim hızının arttığı görüldü. Yani Kalecik Karası çeşidinde yüksek oranda kök gelişimi gözlemek için Hasandede çeşidine oranla daha yüksek dozda IBA uygulanması gerektiğinden sözedilebilir. Ayrıca çalışmanın daha fazla *Vitis* çeşidi, farklı dönemlerde alınan çelikler ve farklı IBA konsantrasyonlarıyla fazla sayıda deneme yapılması, daha genel bakış açısıyla elde edilen değerlerin, benzer sonuçları işaret edip etmeyeceğinin anlaşılabilmesi, çeşitler arasında ki gelişimin ortaya konulması yönünden yararlı olacaktır.

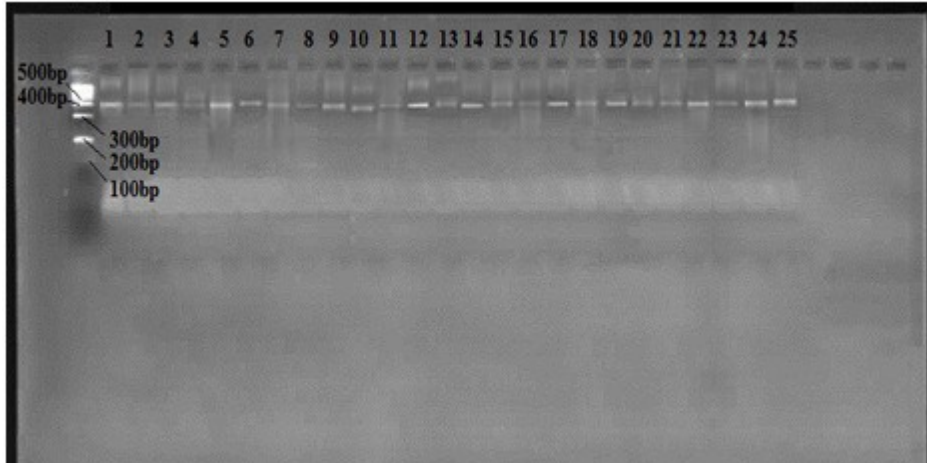
### 3.2. Çeşitlere Uygulanan RAPD-PCR ve Elektroforez Metodu Sonrası Elde Edilen Bulgular

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinde, RAPD-PCR metodu kullanılarak OPA-01 ve 4F primerleri ile taranması sonucu elde edilen elektroforez jel görüntüleri Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6., Şekil 3.7.'de verildi.

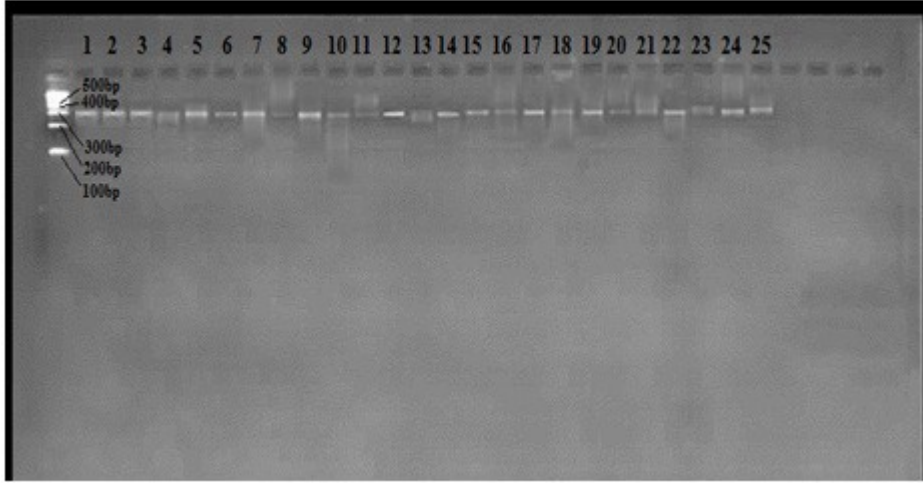
Şekil 3.3. Hasandede çeşidinde OPA-01 primeri ile elde edilen RAPD bantları



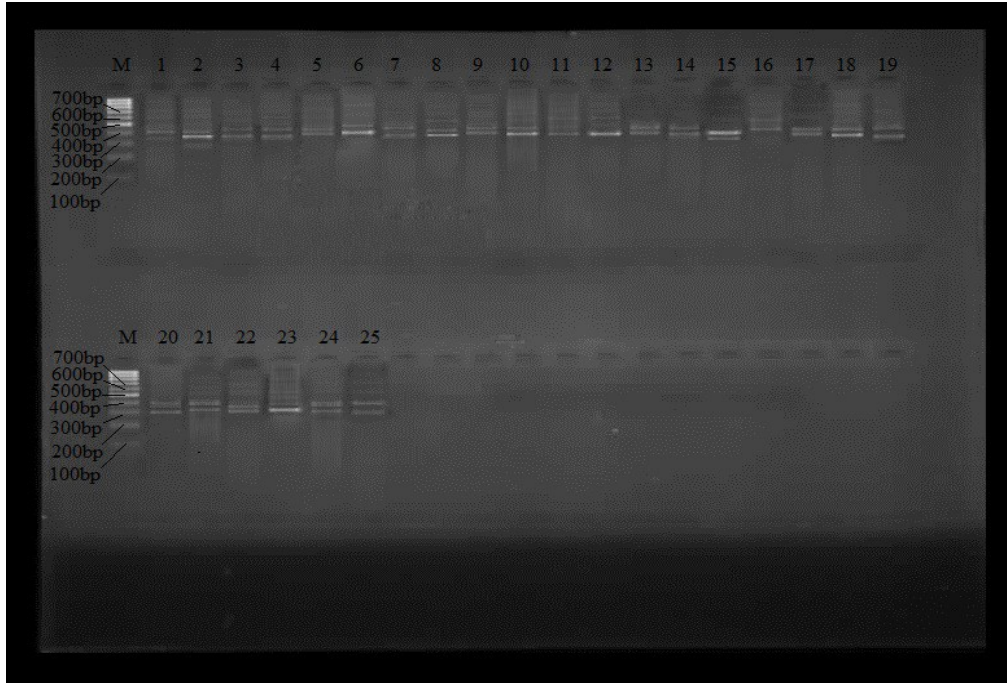
Şekil 3.4. Kalecik Karası çeşidinde OPA-01 primeri ile elde edilen RAPD bantları



**Şekil 3.5.** Hasandede çeşidinde 4F primeri ile elde edilen RAPD bantları



**Şekil 3.6.** Kalecik Karası çeşidinde 4F Primeri ile elde edilen RAPD bantları



İrk içi ve ırklar arası polimorfizmi belirlemek için yapılan moleküler genetik analiz sonucunda elde edilen RAPD bantları var “1” ve yok “0” şeklinde değerlendirildi. Elde edilen verilere göre oluşturulan veri matrisi ek olarak tezin son kısmında verildi.



### 3.2.1. Değerlendirilen RAPD Primerleri

Hasandede ve Kalecik karası ırkları OPA-01 ve 4F olmak üzere iki RAPD primeri ile değerlendirildi. Gözlenen RAPD bantlarının büyüklüklerine ait değer aralıkları (bç) çizelge 3.10'de verildi.

**Çizelge 3.10.** Değerlendirmeye alınan 2 primerin tüm çeşitler ve bireylerde oluşturdukları RAPD bantlarının büyüklüklerinin yaklaşık değerleri

Primerin Adı	Gözlenen Bantların Yaklaşık Büyüklükleri (bp)
OPA-01	300-500
4F	300-475

### 3.2.2. Populasyonun Genetik Yapısı

Bu çalışmada Hasandede ve Kalecik karası ırklarına ait bireylerin OPA-01 ve 4F primerleri ile taranması sonucunda elde edilen verilere göre toplam 11 polimorfik RAPD bantı gözlemlendi.

### 3.2.3. Polimorfik Lokusların Yüzdesi

Hasandede ırkında 4 polimorfik bant gözlenirken, Kalecik Karası ırkında 7 adet polimorfik bant gözlemlendi. Irklardaki polimorfik lokusların yüzdesi Hasandede ırkı için %36.36 iken Kalecik Karası ırkında %63.64 olarak hesaplandı. Na değeri; bütün alleller aynı sıklıkta olduğu zaman gözlenen allel sayısıdır. Bu değer Hasandede ırkında 1.3636, Kalecik Karası ırkında ise 1.6364 olarak hesaplandı. Etkili allel sayısı (Ne) ise; Hasandede ırkında 1.0414, Kalecik Karası ırkında ise 1.2371 olduğu gözlemlendi. Zararlı genlerin bulunması durumunda, Ne oranı her zaman için Na'dan daha küçüktür. Bu çalışmada Ne oranı Na oranından küçük hesaplandı. İki *Vitis vinifera* ırkında genetik çeşitlilik istatistik özeti Çizelge 3.11'de verildi.

### 3.2.4. Heterozigotluk

OPA-01 ve 4F primerleri ile elde edilen verilere göre Kalecik Karası ırkında heterozigotluğun daha fazla olduğu gözlemlendi.

### 3.2.5. Shannon'un Bilgi Endeksi

Shannon'un bilgi endeksinin Kalecik Karası ırkında daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu endekse değerleri ile heterozigotluk ile paralellik göstermektedir. Irklar için bu değerler 0.06 ve 0.23 olarak belirlendi.

**Çizelge 3.11.** Hasandede ve Kalecik Karası ırklarında iki lokus için genetik çeşitlilik istatistik özeti ( $Na^1$ ; Gözlenen allel sayısı,  $Ne^2$ ; Allellerin etkili sayısı,  $h^3$ ; Gen çeşitliliği,  $I^4$ ; Shannon'un bilgi içeriği)

Çeşitler	Örnek Sayısı	$Na^1$	$Ne^2$	$h^3$	$I^4$
Hasandede	25	1.3636	1.0414	0,0346	0.0683
Kalecik Karası	25	1.6364	1.2371	0.1485	0.2363

**Çizelge 3.12.** Hasandede ve Kalecik Karası ırklarında tanımlanmış istatistik değerleri

	Örnek Sayısı	Na	Ne	h	I
Ortalama	50	2.00	1.3798	0.2195	0.3400
Standart Sapma	50	0.00	0.4163	0.2056	0.2719

### 3.2.6. Çeşitler içi ve eşitler Arasında Genetik Farklılıklar

Hasandede ve Kalecik Karası ırklarında, Irk içi ve ırklar arasındaki farklılığı gösteren değerler izelge 3.13'te verildi.

**Çizelge 3.13.** Hasandede ve Kalecik Karasında gen çeşitliliği analizi

	<b>rnek Sayısı</b>	<b>H<sub>T</sub></b>	<b>H<sub>S</sub></b>	<b>G<sub>ST</sub></b>
<b>Ortalama</b>	50	0.2195	0.0916	0.5829
<b>Standart Sapma</b>		0.0423	0.0075	
<b>Polimorfik Lokus</b>		11		

### 3.3.7. Genetik Kimlik ve Genetik Mesafe

Nei'ye göre hesaplanan, Hasandede ve Kalecik Karası ırkları arasındaki genetik kimlik ve mesafe değerleri izelge 3.14'da verildi.

**Çizelge 3.14.** Hasandede ve Kalecik Karası ırkları arasındaki genetik kimlik ve mesafe değerleri çaprazın üstünde Genetik kimlik ve çaprazın altında genetik mesafenin tarafsız ölümü

<b>eşitler</b>	<b>1<sup>1</sup></b>	<b>2<sup>2</sup></b>
<b>Hasandede</b>	****	0.7197
<b>Kalecik Karası</b>	0.3289	****

RAPD belirleyicilerinin, ıslah çalışmalarında uygun ataların seçilmesi ve genetik çeşitliliğin korunması açısından önemli olduğu bilinmektedir (Karcicio, 2006). RAPD-PCR tekniği kullanılarak elde edilen değerler; reaksiyon koşullarına, kullanılan örnek ve primer sayısına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Sistemin tekrarlanabilirliği hassastır. Bu tez çalışmasında verilerin güvenilirliğini sağlamak amacı ile PCR koşulları iyi bir şekilde optimize edildi ve her primer için

deneyler yinelenerek, sadece tekrarlanabilir nitelikteki bantlar bilgi verici özellikte kabul edildi. Çalışmada literatürde, *Vitis* türlerinde bilgi verici özellikte olduğu bilinen primerlerin seçilmesine dikkat edildi. RAPD-PCR tekniğinde, rasgele dizilime sahip kısa oligonükleotidler kullanılması ve elde edilen bant profilleri belli bir bölgeyi temsil ettiği için çok sayıda örnek ve primerle çalışılmasında fayda vardır. Ayrıca RAPD-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere elde edilen DNA'nın miktar ve yoğunluğunun önemi tartışılmaz olmakla birlikte DNA elde yöntemlerinin bu amaca yönelik olması, hızlı ve pratik olarak elde edilmesi, birey sayısının fazla olması gereken çalışmalarda tercih edilebilir. Bu çalışmada kullanılan DNA izolasyon kiti ve protokolden yararlanılarak manuel olarak uygulanan izolasyon yöntemi karşılaştırılmıştır. Ve yoğunluk açısından protokolle manuel elde edilen bireylerin DNA miktarları yüksek olmakla beraber, saflık dereceleri DNA izolasyon kiti ile elde edilen bireylerde daha uygun oranlarda elde edildiği görülmüştür. Her iki yöntemde kullanılarak içlerinden PCR aşamasına en uygun değerlere sahip DNA'lar seçilerek kullanılması çalışmanın sonuçlarının net olması açısından uygun olacağı düşünülmektedir.

This and Dettweiler (2003) tarafından GenRes 081 Avrupa projesi kapsamında yapılan çalışmada, Avrupa *Vitis* sp. veri bankası oluşturulmasında laboratuvarlar arası mikrosatelit verilerin kolayca karşılaştırılması amacıyla mikrosatelit yöntemiyle veri değerlendirilmesine yönelik bir metot geliştirilmiş ve projede VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 ve VrZAG79 lokuslarının, üzüm çeşitlerinin ayrımında çok etkili olduğu bildirilmiştir. Bu strateji dünyada en iyi bilinen referans çeşitlere göre allellerin kodlama esasına dayanır. 13 ten 23'e kadar değişen alleller sunan 6 lokusun her biri için, 10-16 arasında değişen referans çeşit seçilmiştir [89].

C.Tessier ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptığı çalışmada; *Vitis* türüne ait 224 çeşitte 21 RAPD primeri ve 2 mikrosatelit lokusu taranmış ve 224 çeşitte, 2 mikrosatelit ve 6 RAPD primer lokusu olmak üzere 8 primerde optimum farklılaşma gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu farklılaşmanın, coğrafik farklılıklardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir [62].

G.Fanizza ve arkadaşları 1999 yılında yaptığı çalışmada, *Vitis vinifera*'da genotipik farklılıkların evriminde RAPD markır numaralarının etkisi üzerine, 10 farklı genotip ve 320 primer ile taramışlar ve çok sayıda (400 ve üzeri) polimorfik bant elde ettiklerini bildirmişlerdir [63].

Islah çalışmalarında, bitkilerin genlerinin değiştirilmesiyle ortaya çıkan varyasyondan yararlanılarak yapılacak seleksiyonlarla daha kaliteli, yüksek verimli, hastalıklar ve zararlılara dayanıklı ve adaptasyon yeteneği yüksek olan yeni çeşitlerin mümkün olduğunca kısa sürede elde edilmesi istenmektedir. Bitki ıslahında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyonun etkinliği arttırılmaya çalışılsa da, bunlar çok uzun zaman alan, zahmetli ve yüksek maliyetli işlemlerdir. Moleküler belirleyicilerin kullanılması ıslah çalışmalarında süreyi kısaltarak, maliyetlerini düşürmektedir. Seleksiyonda, genetik ve linkaj haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde moleküler markırlardan yararlanılmaktadır. Genetik markır çalışmalarından elde edilen verilerle, gen bankalarında örnek duplikasyonları engellenebileceği ve hangi ırkların koruma altına alınması gerektiğine karar verilmesi aşamasında etkilidir [88].

Benzer iklim ve coğrafik koşullarda yetişen farklı iki *Vitis* çeşidinin, fenotipik olarak ayrımının yanı sıra moleküler genetik analizler ile bu ayrımın yapılması ve akrabalık ilişkilerinin ortaya konulması açısından önemlidir. Çalışmada taranan OPA-01 ve 4F primerleri için ırklar arasındaki ( $H_T$ ) ve ırk içi farklılığın ( $H_S$ ) karşılaştırıldı. Hesaplamalar sonucunda bulunan  $G_{ST}$  değeri (0.58), ırk içi farklılıklar olmamasına rağmen ırklar arası genetik farklılığın olduğunu göstermektedir. Ayrıca aynı çeşide ait birçok bireyin baz çifti büyüklüğü açısından aynı sonuçları ortaya koyacak şekilde sonuç vermesi, “vejetatif yolla üreyen bitkilerde genetik çeşitliliğin korunması” konusuna işaret etmektedir. Ve bu duruma paralel sonuçlar ortaya konulacak şekilde aynı baz büyüklüğüne sahip bireylerin görüntüsü jel üzerinde açıkça görülmektedir. Bu durumda çeşitlerin birbirleriyle olan yakınlık-uzaklık ilişkilerini belirlemek için yalnızca çeşitler arasında ki, baz çifti büyüklüğü ve polimorfik bant görüntüsü üzerine ilişkilendirilmelidir.

Hasandede ve Kalecik Karası çeşitlerinin RAPD-PCR tekniği sonucu yapılan analiz ve farklı IBA derişimleri ile kök gelişimi üzerine etkisi, bu iki çeşit arasında ki farklılığı ortaya koyması açısından değerlendirilebilir. Bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler, yapılacak olan daha ileri araştırmalar için bir başlangıç niteliği taşımaktadır. Bu sonuçlar ıslah çalışmalarında uygun ataların tanımlanması amacı ile yapılan çalışmalar ve gelecekte yapılacak olan örnekleme stratejileri için kullanışlı olabileceği düşünölmektedir. Özellikle bu çalışma sonucunda, Kalecik karası çeşidinde ki 4F primeri ile yapılan polimorfik DNA sonucu, örneğin toplandığı bölgeden alınacak olan yeni örneklerle, daha ileri analizlerin yapılması da önerilmektedir. Elde edilen sonuçların başka yöntemlerden alınacak sonuçlar ile karşılaştırılması daha verimli değerlendirme yapılabilmesi açısından önemlidir.

## KAYNAKLAR

- [1] Vavilov, N.I., 1935, Theoretical Basis for Plant Breeding, Vol. 1. Moscow. Origin and Geography of Cultivated Plants. *in* The Phytogeographical Basis for Plant Breeding (D. Love, transl.), 316–366pp. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- [2] Ağaoğlu, Y.S. Söylemezoğlu, G., Ergöl, A. ve alışkan M. 1995. Ülkemizde yetiştirilen bazı sofralık üzüm çeşitlerinin izoenzim bantlarından yararlanılarak Elektroforez tekniği ile tanımlanmaları. Türkiye 2. Bahçe Bitkileri Ulusal Kongresi. Cilt 2. Sebze- Bağ-Şüs Bitkileri, S:567–571, 3–6 Ekim 1995, Adana.
- [3] Ağaoğlu , Y.S., Marasalı, B. ve Ergöl, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği ile moleküler karakterizasyon. Ankara Üniv. Ars. Fonu 96-11-01-02 no.lu Proje Sonuç Raporu, Ankara.
- [4] elik, H., Ağaoğlu, Y.S., Fidan, Y., Marasalı, B. ve Söylemezoğlu, G. 1998. Genel Bağcılık. Sunfidan A.S. Mesleki Kitaplar Serisi. 253 s, ISBN No: 975-96656-0-3 , Ankara.
- [5] Ağaoğlu Y.S., Marasalı, B. ve Ergöl, A. 1998. Asma ıslahında son gelişmeler. IV.Bağcılık Sempozyumu. S: 9–16. 20–23 Ekim 1998, Yalova.
- [6] Söylemezoğlu, G., Ağaoğlu, Y.S., Marasalı, B., Ergöl, A., alışkan M. ve Türkben C., 1998. Üzüm eşitlerinin Yaprak Kökenli Kateşol Oksidaz (CO), Peroksidaz (PER) ve Esteraz (EST) İzoenzimlerinden Yararlanılarak Tanımlanmaları. IV. Bağ. Semp., Yalova, 138-144.

- [7] Çelik, S., Kunter, B.M., Söylemezoğlu, G., Boz, Y., Özer, C. ve Atak, A., 2005. Bağcılıkta Gelişme ve Üretim Hedefleri. VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi: Ankara. 22s.
- [8] Walton, M., 1993, Molecular markers: which ones to use? *Seed World*, July 1993,p: 23–29
- [9] Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubrick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merrit, C.R., Wu, A., Oide, B., Moreno, R.P., Kalavage, A.R., McCombie, W.R., Venter, J.C., 1991, Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 210: 1651–1656.
- [10] Russell, P.J. (ed), 2001, *Genetics*, Benjamin Cummings, San Fransisco, USA.
- [11] Procunier, J.D., Gray, M., Liakat, A.M. et. al., 2003, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Hexaploid Wheat and High Throughput SNP Detection by Invader Operation System, *Proc. Plant and Animal Genomes 11th Conf. San–Diego*, p. 251.
- [12] Somers, D.J., Kirkpatrick, R., Moniwa, M. and Walsh, A., 2003, Mining Single–Nucleotide Polymorphisms from Hexaploid Wheat ESTs, *Genome*, 49:431–437.
- [13] Brookes, A., 1999, The Essence of SNPs, *Gene*, 234: 177–186.
- [14] Khlestkina, E.K. and Salina, E.A., 2006, SNP Markers: Methods of Analysis, Ways of Development, and Comparison on an Example of Common Wheat. *Russian Journal of Genetics*, 42 (6): 585–594.



- [15] Lagercrantz, U., Ellegren, H. and Andersson, L., 1993, The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21: 1111–1115.
- [16] Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma P.C. and Ramesh, B., 1996, Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr. Sci.* 70: 45–54.
- [17] Powell, W., Machray, G.C. and Provan, J., 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci.*, 1: 215–222.
- [18] Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G. and Tanksley, S.D., 1994, Survey of plant short tandem repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 1–6.
- [19] IAEA, 2002, Mutant germplasm characterization using molecular markers: A manual. Training Course Series 19. IAEA, Vienna, 87p.
- [20] Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2):176–83
- [21] Vos P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van Der Lee, T., Frijters, A., Peleman, J., Kuiper, M. and Zalbean, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407 – 4414.
- [22] Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffei, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Nature*, 239: 487–497.
- [23] Ehrlich, H.A., Celfand, G.H., Sninsky, J.J., 1991, Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643–1651.

- [24] Bayer, R., Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1996, Phylogenetic inferences in *Antennaria* (Asteraceae: Gnaphalieae: Cassiniinae) based on sequences from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Am. J. Bot.* 83: 824–832.
- [25] Caetano-Anolle's, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M., 1991, DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9: 553–557.
- [26] Welsh, J., Hoercutt, R.J., McClelland, M. and Sobral, B.W.S., 1991, Parentage determination to maize hybrids using the arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82: 473–476.
- [27] Welsh, J. and McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213–7218.
- [28] Paran, I. and Michelmore, R. W., 1993, Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985–993.
- [29] Konieczyn, A. and Ausubel, F.M., 1993, A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.*, 4(2): 403-10.
- [30] Jarvis, P. , Lister, C., Szabo, V., Dean, C., 1994, Integration of CAPs markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 24: 685–667.
- [31] Landry, P. And Lapointe, F. 1996 RAPD problems in phylogenetics. *Zool. Scripta.* 25(4): 283-290

- [32] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18 (22) 6531.
- [33] Freeman, S. and Herron, J.C. *Evolutionary analyses* (2nd Edition 1999).
- [34] Martin, G.B., Williams, J.G.K and Tanksley, S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and nearisogenic lines. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.
- [35] Smith, J.L., Scott-Craig, J.S., Leadbetter, J.R. Bush, G.L., Roberts, D.L. and Fulbright, D.W. 1994. Characterization of random amplified polymorphic dna (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3:135-145
- [36] Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G.K. and Braun, J.M., 1993, Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods in Enzymology*, 224: 294–309.
- [37] Williams, J.G.K., Hanefey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1993, Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 1993; 218: 704–740.
- [38] Arnheim, N. and Erlich, H. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 131 – 56.
- [39] Heun, M. and Helentjaris, T. 1993. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* 85:961-968.

- [40] Scheweder, M.E., Shatters, R.G. Jr., West, S.H. and Smith, R.L. 1995. Effect of transition interval between melting and annealing temperatures on RAPD analyses. *Biotechniques* 19:38-42.
- [41] Hunt, G.J. and Page, R.E. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphisms in the honey bee. *Theor. Appl. Genet.* 85:15-20
- [42] Çimen, İ., 1988. Meyvecilikte Büyüme Düzenleyicilerin Kullanımı. *Derim*, 5(3): 134-142s. Antalya.
- [43] Burak, M., 1991. Meyvecilikte Büyüme Düzenleyici Maddelerin Kullanım İmkanları. *Derim*, 8(4): 174-186s. Antalya.
- [44] Hartman, H.T., D.E. Kester, 1986. *Plant Propagation. Principles and Practices.* 4 th edition. Printice- Hall, Inc., Englewood Cliffs. New Jersey.
- [45] Eriş, A., 2003. Bahçe Bitkileri Fizyolojisi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No.11 Bursa 152s.
- [46] Riov, J., 1993. Endogeneous and Exogeneous Auxin Conjugates in Rooting of Cuttings, *Acta Horticulturae ISHS International Society Horticulture Science*, VII. International Symposium on Plant Growth Regulators in Fruit Production, No: 329.
- [47] Westwood, M.N., 1993. "Hormones and Growth Regulators", *Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture.* Timber Press, Inc. 9999 S.W. Wilshire, Suite 124, Portland, Oregon 97225.
- [48] Güleryüz, M., 1982. Bahçe Ziraatında Büyütücü ve Engelleyici Maddelerin Kullanılması ve Önemi. Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 279. Erzurum.

- [49] Ürgenç, S., 1982. Orman Ağaçları Islahı. İ.Ü. Orman Fak., Yayınları. 293:280-290.
- [50] Kramer, P.J. ve Kozlowski, T., 1960. Reproduction in Physiology of Trees. Mc.Graw-Hill. Book Company.368-398, London.
- [51] Chong, C., 1983. Influence of high IBA concentrations on rooting. Hort. Abst. 53(12):857
- [52] Leakey, R.R.B., 1983. Stock Plant Factors Affecting Root Initiation in Cuttings of Triplochiton Scleroxylon K.Schum. an Indogenous Hardwood of West Africa. J.of.Hort. Sci., 58(2), 277-290.
- [53] Blakesley, D., Weston, G.D. ve Hau, S.F., 1991. The Role of Endogenous Auxin in Root Initiation. Plant Growth Regulation., Volume 10, Number 4. 341-353.
- [54] Dorn, H., 1938. Histologische Studien Über Die Entwicklung Spross Bürtiger Wurzeln Nach Heteroauxinbehandlung, Planta, 28:20-42.
- [55] Kaşka, N. ve Yılmaz, M., 1974. Bahçe Bitkileri Yetiştirme Tekniği (Hartmann ve Kester'den Çeviri). Ç.Ü.Ziraat Fakültesi Yayınları:79, Ders Kitabı No: 2, 601 s., Adana.
- [56] Öz Aydın. S., 2004. DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi RAPD, Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. Kütahya.
- [57] C. S. Kim, C. H. Lee, J. S. Shin, Y. S. Chung and N. I. Hyung., 1997 Oxford University Press Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 5, 1085–1086.

- [58] Muhammad A. Lodhi, Guang-Ning Ye, Norman F. Weeden, and Bruce I. Reisch., *Plant Molecular Biology Reporter* pages 6-13, 12 (1) 1994. Department of Horticultural Sciences, New York State Agricultural Experiment Station, Comell University, Geneva, NY 14456, USA
- [59] Lin H., Walker M.A., 1997. Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *HortScience* **32**: 1264-1266.
- [60] Y.S. Ağaoğlu, B. Marasalı, A. Ergül., *Tarım Bilimleri Dergisi* 2001, 7 (4) 52-56
- [61] R. Herrera, V. Cares, M.J. Wilkinson & P.D.S. Caligari., *Euphytica* 124: 139–145, 2002. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- [62] C. Tessier, J. David, P. This, J. M. Boursiquot, A. Charrier., *Theor Appl Genet* (1999) 98: 171-177, Springer-Verlag 1999
- [63] G. Fanizza, G. Colonna, P. Resta & G. Ferrara., *Euphytica* 107: 45–50, 1999 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- [64] Jose Ramon Vidal, Morvan Coarer & Alain Defontaine., *Euphytica* 109: 161–172, 1999 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- [65] S.G. Tangolar, S. Soydam, M. Bakır, E. Karaağaç, S. Tangolar, A. Ergül., *Tarım Bilimleri Dergisi* 2009, 15(1) 1-8 Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
- [66] Erdoğan V., Aygün A. (2007). Kara dut'un (*Morus nigra* L.) yeşil çelikle çoğaltılması üzerinde bir araştırma, 2. Ulusal Üzüksü Meyveler Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, 172-175, Tokat.
- [67] D.Söyler, N.Arslan., *Turk. J. Agric. For.* 24 (2000) 595-600 TÜBİTAK

- [68] İ.H. Kalyoncu, N.Ersoy, M.Yılmaz., Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 3(1): 9-18, 2008 ISSN 1304-9984.
- [69] H. Zenginbal, M. Özcan, A. Haznedar., OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2006,21(1):20-26 J. of Fac. of Agric., OMU, 2006,21(1):20-26
- [70] O. Ünal, M. Gökçeoğlu, Ş. F. Topçuoğlu., Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2004, 17(2), 135-147.
- [71] K. Yıldız, Ç. Çekiç, M. Güneş, M. Özgen, Y. Özkan, Y. Akça, R. Gerçekçioğlu., GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 2009, 26(1), 1-5.
- [72] U. Şirin , F.E. Tekintaş., ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 2004; 1(1) : 41 – 45
- [73] Marie-claire Heloir, Jean-Claude Fournioux, Lucie Oziol & Roger Bessis., Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 223–225, 1997. 223,1997 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- [74] K. Yıldız., Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.), 2001, 11(1):51-54
- [75] Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B., 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version 11. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.
- [76] Doyle, J. J. Doyle, J. L. 1991. Isolation of Plant DNA Fresh Tissue. Focus 12:13-15.
- [77] Thomas, M. R., Matsumoto, S., Chain, P., Scott, N.S. 1993. Repetitive DNA of Grapevine: Classes Present and Sequences Suitable for cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics 86:173-180.12

- [78] Lefort, F., Lally, M., Thompson, D. ve Douglas, G. C. 1998. Morphological Traits Microsatellite Fingerprinting and Genetic relatedness of a Stand of Elite Oaks (*Q. robur* L.) at Tullnynally. *Silvae Genetica* 47:5-6.
- [79] Aka-Kaçar, Y., 2003. Bitkilerde DNA İzolasyonu. *Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2:1-3.
- [80] Hulbert, S.H. and Bennetzen, J.L., 1991, Recombination at the Rp1 locus of maize. *Mol. Gen. Genet.*, 226: 377–382.
- [81] Mullis, K.B., Faloona F.A., Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology*, 155, 335-350, 1987.
- [82] Ma, H., Shieh, K.J., Chen, G., Qiao, X.T., Real-time polymerase chain reaction, *The Journal of American Science*, 2 (3), 2006.
- [83] Chuswa, W.T., Medrona, J.F., Identification of RAPD genetic markers in sheep, *Proct 5th. World Congress Genet. Appl. Livestock Prod.*, 21,133, 1994.
- [84] M.McPherson, S.Moller.,2006. PCR, Second Edition by Taylor & Francis Group. ISBN; 0-4153-5547-8 (Print edition), ISBN; 0-203-00267-9 (e-book).
- [85] Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [86] Nei M, *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, 1987



- [87] Ausubal,F., Brent, R., Kingston, E.R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, A.J., Struhl, K.,1992, Short protocols in molecular biology, third edition, John Wiley and Sons Inc. ISBN; 0-471-13781-2.
- [88] Karcicio, M., 2006, Yerel durum buğdayı çeşitlerinde (*Triticum durum Desf.*) RAPD-PCR tekniği ile genetik çeşitlilik analizi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 93s.
- [89] This P.; Dettweiler, E.; 2003: EU-project GENRES ct96 no81: European *Vitis* database and results regarding the use of a common set of microsatellite markers. Acta Hortic. 603, 59-66.

## EK-1

OPA18-1 OPA18-2 OPA18-3 OPA18-4 OPA18-5  
4F-1 4F-2 4F-3 4F-4 4F-5 4F-6  
name = Hasandede  
fis = 0.0

10010 100000  
10010 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10000 100100  
10000 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10100 100000  
11000 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10100 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10100 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10000 100000  
10100 100000  
10000 100000  
10100 100000  
10100 100000  
10000 100000

```
name = Kalecik Karası  
fis = 0.0  
00100 010100  
00100 101100  
00100 001010  
00101 001010  
00100 000110  
00100 000101  
00100 001010  
00100 001101  
00100 000110  
00100 000110  
00100 000100  
00100 000100  
00100 000110  
00100 000110  
00100 001100  
00100 000100  
00100 000110  
00100 001010  
00100 001010  
00100 100100  
00100 010100  
00100 101000  
00100 100000  
00100 100010  
00100 100100
```