

**UZUNDERE’NİN CEVİZLİ KÖYÜNDE YETİŞEN
CEVİZLERİN (*Juglans spp.*) MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Murat KAYA

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı
Yrd. Doç. Dr Emine ORHAN
2013
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UZUNDERE'NİN CEVİZLİ KÖYÜNDE YETİŞEN CEVİZLERİN
(*Juglans spp.*) MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Murat KAYA

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

ERZURUM
2013

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

UZUNDERE'NİN CEVİZLİ KÖYÜNDE YETİŞEN CEVİZLERİN
(*Juglans spp.*) MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN danışmanlığında, Murat KAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 23/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak oybirliği / oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü



Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP 2012/237

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

UZUNDERE’NİN CEVİZLİ KÖYÜNDE YETİŞEN CEVİZLERİN (*JUGLANS* *SPP.*) MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Murat KAYA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN

Bu araştırma, Erzurum ilinin Uzundere ilçesine bağlı Cevizli köyünden getirilen ceviz (*Juglans* spp.) tipleri arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, arazi çalışması yapılarak 30 ceviz tipi tespit edilmiştir. Bu ceviz tipleri arasındaki genetik ilişkiyi karakterize etmek için RAPD yöntemi kullanılmıştır.

RAPD analizi için kullanılan 27 primerden amplifikasyon (sayısal çoğaltılma) durumuna göre seçilen 19’u ile yürütülen işlemler sonucunda toplam 81 adet bant oluştuğu tespit edilmiştir. Bu bantlardan 73 adedi genotipler arasında polimorfizm göstermiştir. Tüm bantlar değerlendirildiğinde ise polimorfik olanların oranı %81,40 olarak belirlenmiştir. Kullanılan primer başına ortalama 4,26 polimorfik bant tespit edilmiştir. 30 ceviz tipi arasında en düşük farklılık oranı (27,100) C14 ile C17 tipleri arasında tespit edilirken en yüksek farklılık oranı (320,766) ise, C18 ve C22 tipleri arasında tespit edilmiştir. Bu sonuçların ceviz ıslahı çalışmalarında yararlı olacağı ortaya çıkmıştır.

2013, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Juglans*, Genetik İlişki, RAPD

ABSTRACT

MS Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION USING OF WALNUTS (*Juglans spp.*) GROWING IN THE “CEVİZLİ” VILLAGE OF UZUNDERE

Murat KAYA

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr Emine ORHAN

This study was carried out for determine the genetic relationship at Cevizli village belongs to Uzundere district of Erzurum province. In the study, 30 walnut types have been identified with the field work. RAPD method was used to characterize the genetic relationships between this walnut types.

A total 27 primers used for RAPD analysis, and 19 out of them were selected. These 19 primers resulted total 81 bands which 73 of them were polymorphic. Average polymorphic band ratio was 81,40%. Avarage 4,26 polymorphic bands per primer was obtained. The highest genetic distance (320,766) was detected between C18 and C22, while the highest genetic distance (27,100) was observed between C14 and C17 types. These results appeared to be beneficial in walnut breeding.

2013, 40 pages

Keywords: *Juglans*, genetic relationship, RAPD

TEŞEKKÜR

Öncelikle bana bu konuyu veren, araştırmaya yönlendiren ve bugüne kadar yapmış olduğumuz çalışmalarında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, Yüksek Lisans'a başladığım günden itibaren çalışmalarına önder olan çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN'a yürekten teşekkürü borç bilirim.

Tezimde kullanmış olduğum bitki materyallerini elde etmeme yardımcı olan Sayın Yavuz GÜNEY ve Sayın Hanifi ULUDAĞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Sayın Levent ODACI, Sayın Selim AKYOL, Sayın Adem YANIK, ve Sayın Eray MEMİŐ'e çok teşekkür ederim.

Murat KAYA

Haziran, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	17
3.1. PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler.....	18
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	19
3.3. Yöntem.....	20
3.3.1. DNA izolasyonu.....	20
3.3.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi.....	21
3.3.3. DNA amplifikasyon koşulları ve primerler.....	23
3.3.4. RAPD-PCR analizleri.....	25
3.3.5. Agaroz jel elektroforezi.....	26
3.3.6. Veri analizleri.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1. DNA İzolasyonu.....	28
4.2. RAPD-PCR Analizleri.....	29
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	36
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	41

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
PCR	: Polimerase Chain Reaction
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	: Revolutions per minute
SSR	: Simple Sequence Repeat
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
UV	: Ultraviolet

Kısaltmalar

bp	: baz çifti
µl	: Mikrolitre
MgCl ₂	: Magnezyum klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya’da önemli ceviz üreticisi ülkelerin üretim değerleri	6
Şekil 1.2. Yıllara göre Türkiye ceviz üretim miktarı (ton)	7
Şekil 3.1. QIAGEN marka izolasyon robotunun içinden bir görüntü	21
Şekil 3.2. Ceviz tiplerinin %1 lik agaroz jelde ki DNA miktarları.....	23
Şekil 3.3. C1 ceviz tipine ait 27 primerin amplifikasyon durumu	25
Şekil 3.4. Çoğaltılan DNA parçalarının büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA markörü (Ladder, 0,5-10 kb).....	27
Şekil 4.1. OPW-01 primerine ait görüntü	31
Şekil 4.2. OPW-04 primerine ait görüntü	31
Şekil 4.3. OPW-06 primerine ait görüntü	31
Şekil 4.4. OPW-07 primerine ait görüntü	32
Şekil 4.5. OPW-11 primerine ait görüntü	32
Şekil 4.6. OPW-17 primerine ait görüntü	32
Şekil 4.7. OPA-01 primerine ait görüntü	33
Şekil 4.8. OPY-06 primerine ait görüntü	33
Şekil 4.9. UPGMA metoduyla oluşturulan ceviz tipleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya’da önemli ceviz üreticisi 4 ülkenin üretim değerleri	6
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ceviz tipleri ve alındığı yerler	17
Çizelge 3.2. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm değerleri	22
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan 27 adet RAPD primeri, baz dizilimleri ve amplifikasyon durumları.....	24
Çizelge 3.4. RAPD-PCR döngüsü programı	26
Çizelge 4.1. PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen yaklaşık bant büyüklükleri ile bant sayıları ve polimorfizm oranları.....	30
Çizelge 4.2. Farklılık indeksi	35

1. GİRİŞ

Ceviz; sınıfı *Dicotyledoneae*, takımı *Juglandales*, familyası *Juglandaceae*, cinsi *Juglans* olan sert kabuklu bir meyve türüdür (Şen, 1986). *Juglans* cinsi içerisinde 20 kadar tür bulunmasına karşın, çoğunlukla *Juglans regia*'nın kültürü ve ticareti yapılmaktadır (Manning 1978).

Juglans regia, dünyada en yaygın ceviz türüdür. Cevizin kökeni, Hazar Denizi kıyısında 35-40 kuzey enlem derecelerinde bulunan Ghillan bölgesindedir. G. Kafkasya ve Anadolu bu türün ana vatan bölgeleri arasında sayılabilir. Bu tür, Karpat dağlarından Mançurya ve Kore'ye kadar yayılmıştır. Kültürü yapılan ceviz çeşitlerinin hemen tamamına yakını bu türe girmektedir. Ceviz, Karpat Dağları'ndan Türkiye, İran, Irak, Afganistan, Güney Rusya, Hindistan, Mançurya ve Kore'ye kadar uzanan geniş bir bölgenin tabii bitkisidir. Bu ülkelerden Avrupa, ABD ve diğer ülkelere yayılmıştır. Anadolu'da yaşayan insanların en az 3000 yıldır bu bitkiyi tanıdıkları ve faydalandıkları bilinmektedir. Bugün İsviçre Alplerinin 1000-1200 m yüksekliklerinde, ülkemizde ise Munzur dağlarında 1730 m yükseklikte cevizin yetiştiği görülmüştür. Romalılar cevize "Jovis Glans" demişlerdir ki bu Jüpiter'in "Kral Meyvesi" anlamına gelir. Buradan cevizin cins ismi *Juglans* çıkmıştır (Anonim 2013a).

Ceviz ağacının taç yapısı tohumdan yetişmiş ceviz ağaçlarında kuvvetli ve geniş, aşılı ceviz ağaçların da ise çeşit ve ekolojik şartlara bağlı olarak yayvan ve dik gelişim gösterir. Yan dallarda yüksek oranda meyve veren ceviz çeşitleri yayvan; uç dallarda meyve veren ceviz çeşitleri ise dik gelişim gösterir. Sert kabuklu meyveler grubuna giren cevizin meyvesi ağaç üzerinde yeşil kabuk, sert kabuk ve iç cevizden oluşur. Yeşil kabuk "kal" olarak isimlendirilir. Yeşil kabuk, kılıf ve çiçek örtüsünden, sert kabuk ise yumurtalık duvarlarından oluşur. Esasında yediğimiz iç ceviz, cevizin embriyosudur (Anonim 2013c).

Genç ceviz ağaçlarında gövde pürüzsüz ve gümüşü renklidir. İlerleyen yıllarda gövdede pürüzler ve çatlaklar oluşabilir. Kabuk rengi, gri-siyah arası renktedir. Sürgünler, tüysüz ve çeşitlere göre yeşil veya esmer renklidir. Özleri bölmeli olan sürgünlerde, 5-6 yaprakçıktan oluşan yapraklar yer alır. Yaprakçıklar, genellikle geniş elips şeklinde ve tam kenarlıdır. Yaprakçık boyu çeşit ve ekolojik koşullara göre 5-15 cm arasında değişebilir. Yaprakçıkların genişlik ve uzunlukları ile sayıları ceviz türlerinde değişiklik göstermektedir. Yaprakçıklar aromatik bir kokuya sahiptirler (Anonim 2013c).

Ceviz çiçekleri güzel görünüşe ve kokuya sahip olmadığı için tozlanması rüzgârla olur. Rüzgârla tozlanmada çiçek tozu kaybı çok fazla olacağından, bir erkek çiçek püskülünde çok sayıda erkek organ ve buna bağlı olarak çok sayıda çiçek tozu (polen) vardır. Cevizde yenen kısım tohumdur. Bu nedenle döllenme mutlaka gereklidir. Bütün ceviz çeşitleri karşılıklı olarak birbirlerini döllerler. Fakat cevizlerde tozlanma problemleri, genellikle uyumsuzluktan çok erkek ve dişi çiçeklerin farklı zamanlarda açması ve olgunlaşması nedeniyledir. Cevizlerde erkek ve dişi çiçekler aynı anda olgunlaşmaz, genellikle erkek çiçekler önce olgunlaşır, dökülüp gider; dişiler ondan sonra çıkar. Bundan dolayı ceviz bahçesi kurarken mutlaka ya erkek ve dişi çiçeklerinin olgunlaşması aynı döneme gelen birden fazla çeşit ile karışık bir dikim tercih edilmelidir. Bir ceviz bahçesinde iyi bir tozlanma ve döllenme sağlayabilmek için en iyi metot, bahçeyi iki veya daha çok çeşitle kurmaktır. Erken veya geç çiçek tozu veren çeşitler bir arada dikilmemelidir. Böylece yeterli, tozlanma sağlanacak ve maksimum verim alınacaktır. Eğer cevizlerde tek çeşitle bahçe kurma yoluna gidilirse; birde bu çeşidin çiçeklenme durumu dikkate alınmamışsa, o bahçeden düzenli meyve alınması mümkün olmayacaktır. Çiçek tozları rüzgârla uzaklara taşınabilir. Genç bahçelerde ağaçlar arasında iyi bir rüzgâr dolaşımına imkân verecek aralık varsa, ağaçların polen kaynağına 150-200 m uzak olması tozlanma için yeterlidir. Ancak ağaçlar büyüyüp aradaki mesafeler kapandıkça, çiçek tozlarının bahçe içindeki etkinliği azalır. Bu nedenle polen vericilerle tozlanan ağaçlar arasında en çok 60-90 m aralık bulunmalıdır. Tozlayıcı çeşitlerin meyve kalitesi iyi ise birbirini tozlayan çeşitlerden birer sıra tesis edilebilir (Anonim 2013a).

Ceviz çeşitlerinin iklim ihtiyaçları çok iyi saptanmalı ve özellikle ilkbahar geç donları yönünden risk olmamalıdır. Yüksek yaz sıcaklıkları, kış donları, sisler, yağış miktarı, yağış zamanı ve rüzgâr gibi iklim koşulları yetiştirilecek ceviz çeşidine göre önem arz etmektedir. Bir bölgede ceviz yetiştiriciliğini sınırlayan en önemli faktörlerin başında ilkbahar ve sonbahar geç donları gelmektedir. Çok geç yapraklanan ceviz çeşitlerinde vejetasyon süresi kısa olduğu için, olgunlaşamayan sürgünlerin erken sonbahar donlarından zarar gördüğü de bir gerçektir. İlkbahar geç donlarından sadece dişi çiçekler değil aynı zamanda erkek çiçekler de zarar görmektedirler. Kış soğukları bitkileri öldürecek kadar (-25°C) düşük olmamalıdır. 38°C sıcaklıktan sonra güneş yanıklığı, iç büzülmesi gibi zararlanmalar başlar. Bu nedenle 25°C ve 38°C ceviz ağacının yetiştirebileceği sıcaklık aralığını göstermektedir. Soğuklama ihtiyacı (800-1800 saat) karşılanmalıdır. Cevizin rüzgârla tozlanması nedeniyle tozlanmayı garanti altına alacak yeterli oranda rüzgâr ve açık hava ceviz yetiştiriciliğinde arzulanan iklim istekleri arasında bulunmaktadır. Özellikle tozlanma zamanı havaların sisli gitmesi arzulamaz (Anonim 2013b).

Ceviz ağaçları toprak bakımından seçici olmamakla beraber, genellikle derin ve iyi drene olmuş, taban suyu seviyesi 2,5-3 m'den yukarı olmayan, fazla su tutmayan gevşek, süzek, çakıllı, kumlu, tınlı, siltli, alüvyonlu topraklardan hoşlanır. Ceviz kirece dayanıklıdır ve alkali toprakları sever. Cevizler toprak ve sulama suyundaki tuzluluğa aşırı derecede duyarlıdır. Tuzluluk arttıkça verim azalır. Kök derinliğini sınırlayan tamamen killi, milli ve kum birikintileri ceviz ağaçlarının gelişme gücünü, ve ağaç iriliğini sınırlayabilir (Anonim 2013b).

Ceviz için uygun pH değeri 6 civarındadır. pH değerini optimum düzeyde tutmak amacıyla asidik ve bazik gübrelerin seçimine özen gösterilir. pH değeri 8'den yukarı olduğunda fosfor, demir, çinko ve bor noksanlığına neden olabilir. Ceviz yetiştiriciliğinde %5 aktif kireç, demir klorozuna neden olabilmektedir (Anonim 2013c).

Ceviz insan sağlığı için büyük önem taşır. Ceviz, tiamin, vitamin B6 ve folacin'i içeren birçok vitamin içerir. Vitaminlere ilave olarak; demir, çinko, bakır, magnezyum,

fosfor ve potasyumca da zengindir. Sodyum ve selüloz yönünden ise fakirdir. Meyve türlerinde gümüş içeren tek meyve turu cevizdir. İnsan vücudunda, gümüş iyonuna gereksinim duyulan tek organımız ise beyindir. Gümüş, insan beyninin sağlığının korunmasında ve öğrenmede etkilidir. Çünkü gümüş iyonu antibakteriyal özellik taşımaktadır. Ceviz selenyum içeren ender gıdalar arasındadır. Selenyum, önemli antioksidant enzimler olan selenoproteinleri yapmak için proteinlerle bağlanır. 100 gram yenilebilir iç ceviz, yaklaşık 14 gr protein ve 65 gr yağ içerir. Ceviz içeriğindeki proteinin büyük kısmı sindirilebilir proteindir. Bu özellik vejetaryen beslenmede, besin değerinin yüksek olması bakımından, cevizin değerini artırmaktadır. Ceviz kolesterol içermez, doymamış yağ içeriği ise yüksektir. Ceviz yağının %58'i linoleic asit, %12'si ise linolenic asitten oluşur. Bu iki yağ asidi sağlıklı bir yaşam için gereklidir (Anonim 2013c).

Ceviz enerji kaynağı yüksek bir meyve türüdür. 100 gr cevizin enerji kaynağı yaklaşık 700 kalordir. Cevizde düşük lizin/arginin oranı ile birlikte yüksek miktarlarda arginin, fiber, tanenler ve polifenoller içermektedir. Bilimsel araştırmalar diyetli bitki besinleri ile düşük riskli kalp krizi ve kanser arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu göstermiştir. Cevizin zengin PUFA içeriği nedeniyle LDL oksidizabilitesini artırdığı bulunmuştur. Ceviz, kanın pıhtılaşmasını önler, koroner kalp hastalık riskini azaltır, trigliserid ve kolesterol düzeyini düşürür, sinir iletimini sağlar, yüksek bir enerji verir, iyi bir protein kaynağıdır ve içerdiği vitaminler, mineraller ve eser elementler nedeniyle metabolizmada önemli görevler üstlenir. Cevizin yeşil kabuğundan elde edilen ürünler, kolon temizliğinde, bağırsak kurtlarının giderilmesinde ve böbreklerin düzenli çalışmasında kullanılmaktadır. Olgunlaşmamış cevizin tanen içeriği çok yüksektir. Olgunlaşmamış ceviz yenildiğinde (aşırıya kaçılmamak koşulu ile) saç kökleri iyi beslenir ve güçlü saç oluşumu sağlanır (Anonim 2013c).

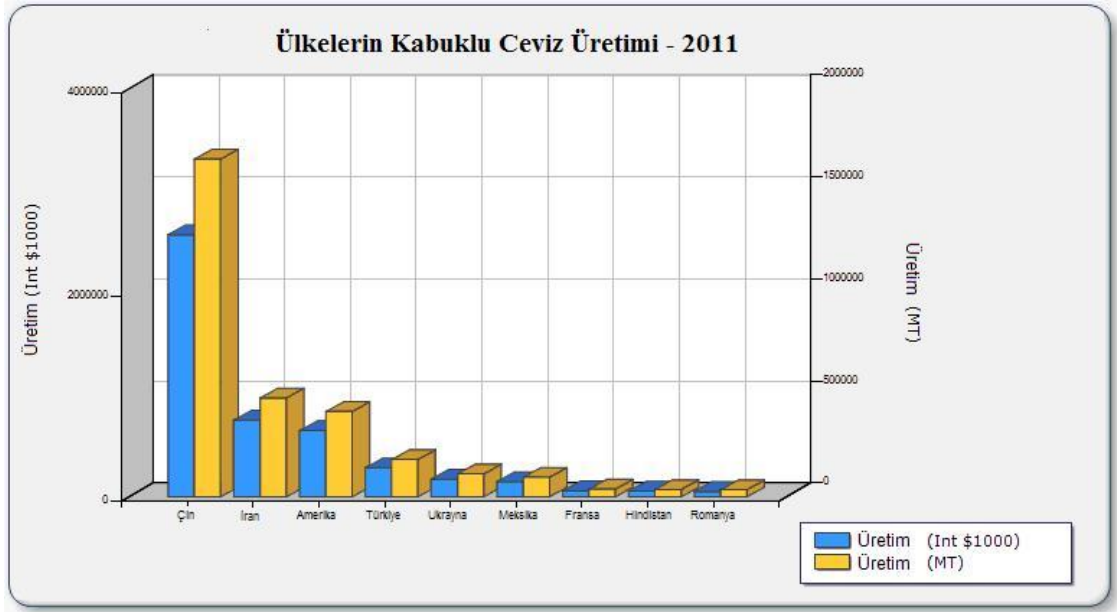
Ceviz odunun değeri, düzensiz, çok şekilli ve çok karışık renkli olmasından kaynaklanmaktadır. Ceviz anatomik, fiziksel, mekanik ve işlenme özellikleri iyi olan, cilalanma kabiliyeti yüksek dekoratif bir oduna sahiptir. Bu nedenle başta masif mobilya ve kaplama üretimi olmak üzere, silah endüstrisinde tüfek kundağı ve tabanca

kabzası olarak değerlendirilmekte, parke üretiminde, spor aletleri, müzik aletleri yapımında, oymacılıkta ve daha birçok yerde kullanılmaktadır (Anonim 2013c).

Bir besin kaynağı olarak ceviz ayrıca, meyvesinin mezokarbı, Juglon ve Hydrojuglon- β -glukosid bakımından zengin olup, boya ve tanen endüstrisinde, endokarbı sertleşmeden önce de gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Meyvenin endokarbı yanıcı madde arasına karıştırıldığı gibi, plastik dolgularda, pil kutularında ve endüstriyel ortu maddesi yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca, insektisitlerde, kürk temizleyici madde ve radyo hoparlörü yapımında, kauçuk ve sirke endüstrisinde kullanılmaktadır. Taze yapraklar keskin kokulu, acı ve buruktur. Yün, pamuk ve ipek ipliklerinin boyanmasında doğal boyar madde olarak kullanılabilir (Anonim 2013c).

Dünya’da ceviz üretimi her yıl düzenli olarak artarak, 2 282 264 tona kadar yükselmiştir. Dünyada önemli ceviz üreticisi ülkeler Çin, Amerika Birleşik Devletleri, İran ve Türkiye’dir. Yaklaşık 979 366 ton üretim ile dünyada birinci sırada yer alan Çin’in ceviz üretimi genellikle tohumdan yetişmiş tiplerden karşılandığı için, standardizasyon problemi bulunmaktadır. Hâlbuki ABD ceviz üretiminin tamamı standart çeşitlerle kurulu kapama ceviz bahçelerinden temin edilmektedir (Anonim 2013c).

Türkiye ceviz üretiminde Çin, İran ve ABD’den sonra 4. sırada yer almaktadır (Anonymous 2013d). Şekil 1.1’de Dünya’da önemli ceviz üreticisi ülkelerin üretim değerleri grafiği yer almaktadır. Çizelge 1.1’de ise Dünya’da önemli ceviz üreticisi 4 ülkenin üretim değerleri verilmiştir.

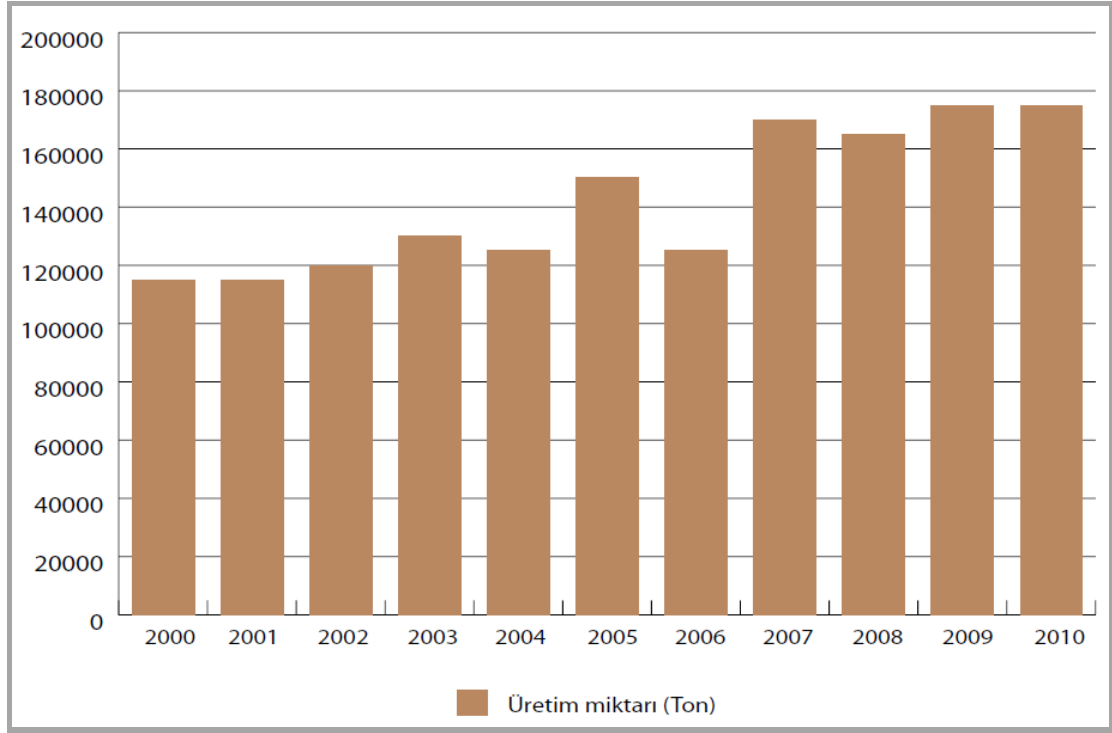


Şekil 1.1. Dünya’da önemli ceviz üreticisi ülkelerin üretim değerleri (Anonymous 2013d)

Çizelge 1.1. Dünya’da önemli ceviz üreticisi 4 ülkenin üretim değerleri (Anonymous 2013d)

Sıra no	Ülkeler	Üretim (ton)
1	Çin	1 655 510
2	İran	485 000
3	Amerika	418 212
4	Türkiye	183 240

Ülkemizde 2010 yılı itibariyle meyve veren ve meyve vermeyen toplam ceviz ağacı sayısı 9 milyona yaklaşmıştır. Ülkemizde artan fidan sayısının ceviz üretim miktarımıza yansımamasının en önemli nedeni, gerek ağaçlandırma çalışmalarında ve gerekse kapama bahçe tesislerinde seçilen çeşitlerin uç dallarda meyve veren ve erken yapraklanan çeşitler olmasıdır. Türkiye yıllık ceviz üretimi TÜİK rakamlarına göre 178 142 ton civarındadır (Anonim 2013c). Şekil 1.2’de Türkiye ceviz üretim miktarının yıllara göre dağılımı yer almaktadır.



Şekil 1.2. Yıllara göre Türkiye ceviz üretim miktarı (ton)

Ceviz ağaçlarının son yıllara kadar tamamen tohumdan aşısız olarak üretilmesi, ülkemizin geniş bir ceviz popülasyonuna sahip olmasına neden olmuştur. Bu nedenle, genetik açımdan dolayı her bir ceviz ağacı bir çeşit ya da genotip durumundadır. Bu durum ıslah açısından çok önemlidir (Akça 2003).

Tüm dünyada yetiştiriciliği yapılan ceviz çeşitleri şans çöğürlerinden veya ıslah programlarından meydana gelmiştir. Bu çeşitlerin karakterize edilmesi ıslahçılar için oldukça önemlidir. Ayrıca çeşitlerin ismine doğru olarak kısa bir süre içerisinde tanımlanması meyvecilikte çok önemlidir. Ancak genetik çeşitliliği karakterize etmek için kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler oldukça zaman almakta ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. DNA markör teknikleri ile farklı ekolojideki genetik materyallerin karakterize edilmesi sağlanmaktadır (Doğan 2006).

Ülkemiz gen kaynaklarında bulunan ceviz çeşit ve genotiplerinin DNA parmak izlerinin çıkartılmasıyla ülkemizde büyük sorun haline gelen ismine doğru ceviz fidanı üretimi

ve dağıtımını kontrol edilebilir hale gelebilecek ve ileride yapılacak ıslah çalışmalarına da genetik bilgi sağlanmış olacaktır.

Bu çalışmada, Erzurum'un Uzundere ilçesine bağlı Cevizli Köyü'nde yetiştirilen cevizler arasındaki genetik ilişkinin RAPD yöntemi kullanılarak karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Cevizli köyü, Çoruh vadisinde bulunmaktadır. Çoruh vadisi, sadece Türkiye'nin değil Dünya'nın sayılı genetik çeşitlilik arz eden noktalarından birisi özelliğinde olup çok sayıda bitki türü yetişmektedir. Çoruh vedisinin genelinde ceviz yetişmektedir. Çalışma için örnek alınacak olan Cevizli köyünde de oldukça fazla ceviz yetişmektedir. Köyün "Cevizli" isminin bundan dolayı verildiği olasıdır. Bu çalışmanın asıl amacı, Çoruh vadisi gibi genetik çeşitliliğin yüksek olduğu bir alanda, özellikle daha dar bir çerçevede yani sadece Cevizli köyünde yetişen cevizlerdeki genetik çeşitliliğin ne ölçüde bulunduğu belirlenmesidir. Çalışma alanındaki cevizler, köy sakinlerinden elde edilen bilgilere göre, genellikle şans çöğürü olup yani tohumdan yetişmiş cevizlerdir. Bu bakımdan ceviz tipleri arasında genetik ilişkinin belirlenmesi bitki ıslahı çalışmaları için önem arz etmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Moleküler markörler, farklılığı DNA düzeyinde ölçen ve araştırılan genotiplerde istenen bir geni ya da özelliği izlemek için kullanılabilen markörlerdir (Yıldırım 2007). Aynı zamanda moleküler markörler, gözlenebilir karakterlere dayanan morfolojik markörlere ve temeli proteine dayanan biyokimyasal markörlere göre oldukça güvenilirdir. Sayıları fazladır, çevreden etkilenmezler, bitki gelişimin herhangi bir evresinde kolayca gözlenebilirler ve lokuslar arası interaksiyon oluşmamaktadır. Bu nedenlerle DNA markörleri ıslah çalışmalarında bitki materyallerinin seleksiyonu için en iyi araçtır. (Ovesna *et al.* 2002)

Moleküler markörler; kesilen parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP), rastgele çoğaltılan polimorfik DNA markörleri (RAPD), çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP), dizisi etiketlenmiş sekanslar (STS), mikrosatelitler (SSR), bölünerek çoğaltılmış polimorfik dizi (CAPS), tek iplik tamamlama polimorfizmi (SSCP), ampikon uzunluk polimorfizmi (ALP), basit sekans tekrarlamaları arası polimorfizm (ISSR), ifade edilmiş dizi etiketleri (EST) ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) gibi farklı tekniklerden oluşmaktadır (Rafalski 2002; Kozun and Ebmeyer 2003; Röder *et al.* 2004; Khlestkina and Salina 2006)

Farklı DNA markör çeşitlerinin geliştirilmesi teknolojik ihtiyaçlardan, laboratuvar ve maddi imkân farklılıklarından, genetik markörlerin genomda fazlaca bulunabilmesinden ve türlerin biyolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Moleküler markör tekniklerinin her birinin diğerlerine kıyasla bazı üstün ve zayıf yönleri bulunmaktadır (Powell *et al.* 1996).

İlk keşfedilen moleküler markör sistemi RFLP'dir. Üzerinde çalışılan bitkinin DNA'sı çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilir ve agoroza bir güç kaynağı yardımı ile yürütülür. DNA'lar southern blot tekniği kullanılarak naylon membrana aktarılır. Markör olarak kullanılan DNA parçacıkları P³² veya biotin ile işaretlenir ve membran da

bulunan kesilmiş DNA'lar ile eşleşmeye (hibridizasyona) tabi tutulur. Film geliştirilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilerek dayanıklı ve duyarlı bitkiler arasında farklılık (polimorfizm) bulmaya çalışılır. Çok fazla DNA'ya ihtiyaç duyulması, pahalı ve fazla zaman alması tekniğin dezavantajını; sonuçların güvenilirliği ve kodominat marker sistemine sahip olması ise avantajını oluşturmaktadır (Tanksley *et al.* 1992; Ahn and Tanksley 1993; Staub *et al.* 1996).

RFLP metodundaki zorlukları aşmak ve PCR tekniğinin getirdiği avantajlardan yararlanmak amacıyla RAPD tekniği geliştirilmiştir (Williams *et al.* 1990). Sistemin temeli, dayanıklı ve duyarlı bitkiler rasgele üretilmiş 6-10 baz uzunluğundaki RAPD primerleriyle PCR yapılması ve bireyler arasında farklılığın belirlenmesidir. PCR esnasında primerler tesadüfi olarak genoma bağlanmakta ve bağlanılan bölgeler çoğaltılmaktadır. PCR ürünleri, elektroforez edildikten sonra ethidium bromide ile boyanarak oluşan polimorfik bantlar dikkate alınarak dayanıklı ve duyarlı bireyler birbirlerinden ayrılmaktadır. Kullanılan her RAPD primeri için oluşan PCR ürünleri iki grup içerisinde incelenmektedir. Birincisi değişken olarak adlandırılırlar ve bunlar nükleotitlerdeki inversiyon, delesyon (silinme) ve primer bağlanma bölgelerindeki nükleotit değişikliğinden kaynaklanmaktadır. İkincisi değişken olmayanlar (monomorfik) olarak adlandırılmaktadırlar. RAPD analizi temelde basittir ve tekniği kullanmak için dizilim (sekans) analizine gerek yoktur. Uygulanması hızlı ve kolaydır. Çoğaltma işlemi normal PCR koşullarından farklı olmakta, primer bağlanma sıcaklığı çok düşük (35-37°C) tutulmakta ve tek bir primer kullanılmaktadır. Markörün uygulamasının hızlı ve kolay olması avantajını; yalnızca dominant markerler oluşturulması, PCR esnasında yanlış eşleşmelerin oluşu, PCR şartlarındaki küçük bir değişimin bile sonuçları etkilemesi ve laboratuvarlar arasında tekrarlanma problemine neden olması tekniğin dezavantajını oluşturmaktadır (Williams *et al.* 1990; Santos *et al.* 1994; Thormann *et al.* 1994).

AFLP'de ebeveynler ve ıslah sonucu elde edilen bireylerin DNA'ları iki restriksiyon enzimiyle (4 baz ve 6 baz) kesilmekte ve DNA'nın kesilmesi sonucu oluşan bu DNA parçacıkları adaptörlerle birleştirme (ligasyon) yapılmaktadır. Ligasyon ürünleri birer

baz ilave edilmiş primerlerle PCR yapılmakta ve elde edilen PCR ürünleri 3 baz ilave edilmiş primerlerle (primerlerin birisi radyoaktif veya floresent ile işaretlenmekte) seçici PCR tabi tutulmaktadır. PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre sonuçlar değerlendirilmektedir. Tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi, sonuçların tekrarlanabilir olması en önemli avantajını oluşturmaktadır. Dezavantajı ise pahalı olması, laboratuvar ekipmanına gereksinim duyulması ve dominat markör olmasıdır (Vos *et al.* 1995; Ridout and Donini 1999).

Canlı genomunda çok sıklıkla tekrarlanan DNA dizileri bulunmaktadır. Bu diziler belirli sayılarda tekrarlanmaktadır. Dizilerin genomun neresinde bulunduğu ve kaç defa tekrarlandığı türden türe değişiklik göstermektedir. Aynı tür içindeki fertler arasında da bu dizilerin bulunup bulunmamasına dayalı olarak SSR tekniği geliştirilmiştir. Tekrarlanan bölgelere özgü spesifik primerler geliştirilmekte ve bu primerler ile PCR yapılmaktadır. PCR ürünleri, elektroforez yapıldıktan sonra ethidium bromide veya gümüş nitrat kullanılarak boyandıktan sonra polimorfizim aranmaktadır. Tekniğin, kodominant yapı göstermesi ve tekrarlanabilir olması en önemli avantajını; genom bilgisine ve dizilim analizine ihtiyaç duyulması dezavantajını oluşturmaktadır. (Rangwen *et al.* 1995; Ridout and Donini 1999).

Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) markörleri, bir DNA dizilim bölgesindeki (1000 baz çiftinden daha kısa) dizi varyantları ve mutasyonları (özellikle nokta mutasyonları) belirlemede kullanılan bir markör sistemidir (Orita *et al.*, 1989). PCR ile çoğaltılan bir genom bölgesi, uygun ısıda denatürasyona tabi tutularak mutasyon bölgesinde II. ve III. DNA konformasyonlarının oluşturulması esasına dayanmaktadır. Varyasyona bağlı olarak oluşan II. ve III. konformasyondaki DNA molekülleri jel elektroforezinde farklı bant profilleri oluşturularak varyantların tespitine olanak sağlamaktadır. Teknoloji olarak basit olmasına rağmen, her bir mutasyon için farklı ortamların oluşturulması gerekliliği, bu tekniğin uygulamasını kısıtlayan en önemli etkidir (Liu 1998).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) genomun herhangi bir bölgesindeki tek nükleotid dizilim farklılıklarıdır. Genomda oldukça yaygın bulunan bu markörlere intron ve ekzon bölgelerinde, 500-1000 bç sıklıkta rastlanılabilir (Wang *et al.* 1998). Genellikle iki alele sahip olan SNP markörlerinin polimorfizmleri daha düşük kalmakta, veri tabanı katalog bilgisine ve polimorfizm dizi bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır (Smigielski *et al.* 2000). SNP'ler araştırmacıların ihtiyaçlarına göre çalışmalarını kolaylaştırmak için dizi konumu, fonksiyonu, türler arası homoloji ve heterozigotluk derecesi olmak üzere 4 büyük bilgi eksenini tek veya daha fazlası bir arada olmak üzere düzenlenebilmektedir. (Smigielski *et al.* 2000). Genomda bilinen 1,42 milyon SNP'nin her 1,91 Kbç başına 1 SNP yoğunlukta bulunduğu bilinmekle birlikte ekson gen bölgelerinde 60 000 SNP bulunduğu ve eksonun %85'inin SNP'nin 5 Kbç yakınında yer aldığı belirlenmiştir (Anonymous 2013e). SNP bilgilerine ulaşmak için; GenBank, PubMed, LocusLink ve Genome Sequence gibi kaynak bilgiler ile NCBI veri tabanındaki bilgiler kullanılmaktadır (Smigielski *et al.* 2000). Geliştirilen yeni moleküler biyoloji teknikleri (mikrodizin, gerçek zamanlı PCR) ile çok sayıda SNP'nin analizi daha hızlı ve ekonomik olarak yapılabilmektedir. SNP'ler genetik çeşitlilik, popülasyon yapısı, kantitatif özellik lokusları (QTL), markör destekli seleksiyon (MAS) çalışmalarında ve ailesel ilişkilerin araştırılmasında yaygın kullanılmaktadır.

ISSR tekniğinde, ikili, üçlü, dördü ve beşli tekrarlanan nükleotidlere sahip primerler kullanılmakta, bu primerlerle iki mikrosatellit arası bölge çoğaltılabilmekte ve elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra belirlenebilmektedir (Zietkiewicz *et al.* 1994). Kullanılan primerlerle genomik lokuslar farklı bant büyüklüklerinde çoğaltılmakta, primerler genelde 3' veya 5' uçlarının sonlarındaki mikrosatellit bölgelerine uzanan 1-4 dejenere nükleotit içermekte ve uzunlukları 15-30 nükleotit arasında değişmektedir. Primerlerdeki GC oranının fazla olması bağlanma sıcaklığının yüksek olmasına yol açarken buna karşılık kararlı bağlanmayı sağlar ve bu nedenle her bir primerin DNA'ya yapışma sıcaklığı içeriğindeki baz kompozisyonuna göre belirlenir. Çoğaltılmış ürünler genelde 200-2000 bç arası uzunluktadır. ISSR, dominant markördür ve dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilmesi avantajlarından biridir (Joshi *et al.* 2000). Yüksek polimorfizm ve

üretkenlik göstermesi ISSR analizlerini genetik benzerlik, gen haritalama ve taksonomi çalışmalarında uygulanabilir kılmaktadır (Gupta *et al.* 1994; Zietkiewicz *et al.* 1994). Bu markör sisteminde de RAPD markör sisteminde olduğu gibi tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve benzer büyüklükteki parçacıkların homolog olmaması dezavantajları arasında sayılabilir (Kesawat and Das 2009).

PCR-RFLP olarak da bilinen CAPS uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle (endonükleaz) parçalanmasına dayanan ve sonucunda DNA parçacık uzunluk polimorfizminin elde edildiği bir tekniktir. DNA üzerinde meydana gelen SNP gibi tek nükleotid değişimleri ve eklenme-sililmeler (InDel) endonükleazların tanıma bölgelerini değiştirerek farklı uzunlukta DNA parçalarının oluşmasına neden olmaktadır. Lokus-spesifik PCR ürünlerinin bir veya birden fazla endonükleazla parçalanması ile oluşan ürünlerin agaroz veya poliakrilamid jelde yürütülmesine dayanmaktadır. CAPS markörleri kodominant, lokus spesifiktir ve homozigot-heterozigot allel ayrımını rahatlıkla yapabilmektedir (Koniczny and Ausubel 1993). CAPS metodunun avantajları arasında çok düşük miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması, kodominant allel ayrımını yapabilmesi, basit ve ucuz olması sayılabilir. Mutasyonlara bağlı olarak meydana gelen DNA dizi değişimleri endonükleazların tanıma bölgelerini etkileyerek sınırlayıcı etki oluşturabilmekte ve bundan dolayı SSR ve AFLP gibi yüksek polimorfizm elde edilmesini engellemektedir. Buna rağmen CAPS, gen haritalama çalışmalarında, moleküler tanımlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Weiland and Yu 2003).

Kodlama yapan genom bölgeleri mesajcı RNA'ya transkripte olarak protein sentezi için kalıplık görevi görmektedir ve günümüzde ters transkriptaz enzimi kullanarak RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmektedir. cDNA RNA'dan üretilen kararlı bir yapı olup, yapısındaki intronlar kırılarak (splicing) ekzonlardan oluşmuş, anlatımı yapılan bir genin dizilenmesi ile 5' EST veya 3' EST (Expressed Sequence Tag) olarak ifade edilirler (Jongeneel, 2000). 5' EST genelde kodlama yapan bölgelerden (ekzon) elde edilir ve bu bölgeler genelde türler arası korunmuştur ve gen aileleri içinde çok fazla değişmezler. 3' genelde kodlama yapmayan bölgelerde (intron) veya translasyona

uğramayan bölgelerden (UTR) elde edilir ve kodlama yapan bölgelere oranla türler arasında daha az korunaklıdır. Günümüzde EST belirlenmesi çok hızlı ve kolay şekilde yapılabilmekte, dijital veri bankalarında yaklaşık 6,5 milyon EST dizisi bulunmaktadır. EST dizileri, gen transkriptlerinin belirlenmesi, gen keşifleri, gen anlatımı ve düzenlenmesiyle ilgili bilgi edinilmesinde, dizi belirlenmesinde ve EST temelli RFLP, SSR, SNP, CAPS gibi önemli moleküler markör sistemlerinin geliştirilmesinde bir araç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, EST dizileri DNA mikroarray çalışmalarında gen anlatımlarının belirlenmesinde prob olarak, genetik bağlantı haritaları ve fiziksel haritaların oluşturulmasında da kullanılabilir (Kurata *et al.* 1997; Davis *et al.* 1999). EST dizileri SSR dizileri için yararlı bir kaynaktır ve çeşitli bitki türlerindeki EST dizilerinin yaklaşık %1-5 arası 20 baz çifti veya daha fazla uzunlukta SSR bölgeleri barındırmaktadır (Kantety *et al.* 2002). EST-SSR bölgeleri, transkripte olmayan bölgelere oranla daha korunaklı olan transkripsiyon bölgelerinde bulunmakta ve yakın türlere transferleri mantıklı görünmektedir. EST dizilerinden elde edilen primerler kullanılarak ilgili bölgenin çoğaltılması ve dizilenecek kıyaslanması pek çok SNP'yi ortaya çıkarabilir. Temel olarak, EST markörleri ilgi alanındaki spesifik genlerin klonlanmasında, komple genom dizilenmesinde, çeşitli akraba organizmalardaki fonksiyonel genlerin haritalanmasında çok popülerdir (Kesawat and Das 2009).

Ceviz (*Juglans spp.*) türünde RAPD yöntemi ile ilgili yapılmış olan çalışmalar; RAPD tekniği ile (*J. hindsii* x *J. regia*) x *J. regia* melez bitkileri kullanılarak genetik haritalama çalışması yapılmıştır. 25 RAPD primeri kullanılmış ve 66 markör belirlenmiştir (Woeste *et al.* 1996).

Malvoti *et al.* (1997) tarafından yapılan bir çalışmada, RAPD moleküler markör tekniği değişik ceviz melezlerinin ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Araştırmada iki farklı *J. nigra* x *J. regia* F1 melezleri ile (*J. nigra* x *J. regia*) x *J. nigra* ve (*J. nigra* x *J. regia*) x *J. regia* geri melez bitkileri kullanılmıştır. 80 adet primer polimorfizm bakımından önce taranmış ve bunların arasından 25 adet polimorfizm gösteren primer RAPD analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Yapılan RAPD analizleri sonucunda toplam

91 bant üretilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar RAPD tekniğinin cevizlerde F1 melez bitkilerin ayırt edilmesinde ve ebeveynlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kaliforniya Üniversitesi'nde yapılan ıslah çalışmalarında ortaya çıkan yeni çeşitler ve ebeveyn olarak kullanılan 19 ceviz (*J. regia*) çeşit ve genotipinin RAPD tekniği ile karakterizasyonu ve genotipler arası genetik ilişkileri belirlenmiştir. Çalışmada 72 primer kullanılmış ve tüm primerler bant vermiştir. Polimorfizm bakımından ancak 18 primer bir ile iki arasında polimorfik bant vermiş olup toplam 23 polimorfik bant elde edilmiştir. Bantların büyüklüğü 250 bç ile 1700 bç arasında değişmiştir. Tüm genotipler arasında polimorfizm görülmüş ve soyağacı elde edilmiştir. Islah programında kullanılan ebeveynler ile bunlardan elde edilen yeni çeşitler arasında ortak bantlar olduğu gibi sadece yavru bitkilerde amplifike olan bantlara da rastlanmıştır. Araştırmacılar, RAPD teknolojisinin ceviz ıslahı programlarında, yeni çeşitlerin tanımlanmasında, genotipler arasındaki genetik benzerliğin ortaya çıkarılmasında, ebeveyn seçiminde kullanışlı olabileceğini bildirmişlerdir (Nicese *et al.* 1998).

Malvoti *et al.* (2001), Lara 480 ve Chandler 1036 çeşitleri arasında yaptıkları tür içi melezleme çalışmasından 82 bitki elde ederek genetik haritalama çalışması için kullanmışlardır. Çalışmada izoenzim ve RAPD teknikleri kullanılmıştır. RAPD analizlerinde 400 primer taranmış ve 100 tanesi tekrarlanabilir ve güçlü bantlar vermiştir. 100 primerden toplam 193 bant elde edilmiştir. İzoenzim analizlerinde 12 enzim sistemi kullanılmış ve bunlardan sadece 4 adet açılım gösteren markör elde edilmiştir. 193 RAPD ve 4 izoenzim markörü genetik haritanın oluşturulmasında birlikte kullanılmıştır.

S.C.D.P. Valcea istasyonunda Romanya Ulusal Koleksiyonundan temin edilen ceviz cinsine ait 51 çeşit arasındaki genetik varyasyon RAPD tekniği kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada 25 primer kullanılmıştır. Sonuç olarak RAPD markırlarının ceviz genotipleri arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Francesca *et al.* 2010).

Fatahi *et al.* (2010)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, 31'i İran ve 4'ü yabancı olmak üzere toplam 35 ceviz genotipi arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede RAPD primerleri ile morfolojik karakterler birlikte kullanılmıştır. Çalışmanın moleküler kısmında toplam 18 RAPD primeri kullanılmıştır. 174'ü polimorfik olan toplam 180 DNA bandı elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda RAPD tekniğinin ceviz genotipleri arasındaki genetik çeşitliliği belirlemede etkili bir teknik olduğu ifade edilmiştir.

Ertürk ve Dalkılıç (2011), sekiz ceviz genotipi arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için RAPD metodundan faydalanmışlardır. Toplam 45 primer denemiş ve 37 primer ile sonuç alınmıştır. Bu primerlerden büyüklükleri 200-5000 bp arasında olan 340'ı polimorfik olan toplam 513 bant elde edilmiştir. RAPD markırları ile elde edilen dendogramda, 8 ceviz genotipinin 3 ana grupta toplandığı belirlenmiştir. En yüksek benzerlik indeksi (0,779) NO-2 ve No-8 genotipleri arasında bulunmuştur. Sonuç olarak RAPD markırlarının ceviz genotiplerini karakterize etmede ve gruplandırmada kullanılabileceği belirlenmiştir.

Ceviz çeşitleri arasındaki genetik ilişki ve genetik çeşitlilik konusunda yapılmış olan bir başka çalışmada, 24 morfolojik özellik üzerinde çalışıldıktan sonra 25 RAPD primeri ve 7 SSR primeri kullanılarak moleküler olarak bir değerlendirme yapılmıştır. RAPD markırların SSR markırlara göre, morfolojik değerlerle ilişkisi az olarak tespit edilse de her iki markır tekniği ile polimorfizm belirlenebilmiştir (Francesca *et al.* 2013).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu araştırmada kullanılacak olan ceviz (*Juglans* spp.) tiplerine ait yaprak örnekleri 2012 yılı Mayıs ayında Erzurum ilinin Uzundere ilçesinin Cevizli köyünde yapılan arazi çalışması ile temin edilmiştir. 30 ceviz ağacından yaprak örnekleri alınarak buz kutusu içerisinde muhafaza edilmiş ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılarak -80°C buzdolabına koyularak laboratuvar çalışmasına kadar muhafazası sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan ceviz tiplerinin alındığı yer/mevki, koordinatları ve rakım bilgisi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ceviz tipleri ve alındığı yerler

Örnek No	Yer/Mevki	Koordinatlar		Rakım (m)
		N	E	
C1	Ağa Mahallesi	40° 37' 21"	41° 43' 40"	1238
C2	Ağa Mahallesi	40° 37' 17"	41° 43' 05"	1242
C3	Ağa Mahallesi	40° 36' 49"	41° 43' 30"	1235
C4	Haznedar Mahallesi	40° 37' 51"	41° 43' 16"	1238
C5	Haznedar Mahallesi	40° 37' 56"	41° 43' 21"	1290
C6	Haznedar Mahallesi	40° 37' 56"	41° 43' 21"	1221
C7	Çukur Bahçe	40° 37' 50"	41° 43' 04"	1208
C8	Haznedar Mahallesi	40° 37' 56"	41° 43' 20"	1239
C9	Haznedar Mahallesi	40° 37' 56"	41° 43' 22"	1216
C10	Haznedar Mahallesi	40° 37' 57"	41° 43' 23"	1216
C11	Ağa Mahallesi	40° 37' 54"	41° 43' 15"	1205
C12	Ağa Mahallesi	40° 37' 11"	41° 43' 11"	1227
C13	Ağa Mahallesi	40° 37' 40"	41° 43' 11"	1217
C14	Ağa Mahallesi	40° 37' 45"	41° 43' 14"	1212
C15	Ağa Mahallesi	40° 37' 50"	41° 43' 15"	1208
C16	Ağa Mahallesi	40° 37' 44"	41° 43' 15"	1216
C17	Külâh Mahallesi	40° 37' 11"	41° 43' 02"	1277
C18	Ağa Mahallesi	40° 37' 17"	41° 43' 05"	1243
C19	Ağa Mahallesi	40° 38' 50"	41° 43' 57"	1273
C20	Ağa Mahallesi	40° 38' 50"	41° 43' 57"	1273
C21	Ağa Mahallesi	40° 37' 15"	41° 43' 04"	1269

Çizelge 3.1 (devam)

Örnek No	Yer/Mevki	Koordinatlar		Rakım (m)
		N	E	
C22	Ağa Mahallesi	40° 37' 12"	41° 43' 03"	1271
C23	Ağa Mahallesi	40° 37' 12"	41° 43' 05"	1271
C24	Ağa Mahallesi	40° 37' 12"	41° 43' 03"	1271
C25	Tarpusor	40° 37' 09"	41° 43' 02"	1280
C26	Tarpusor	40° 37' 09"	41° 43' 02"	1280
C27	Kulah Mahallesi	40° 37' 11"	41° 43' 02"	1277
C28	Kulah Mahallesi	40° 37' 23"	41° 43' 02"	1263
C29	Kulah Mahallesi	40° 37' 23"	41° 43' 02"	1263
C30	Kulah Mahallesi	40° 37' 23"	41° 43' 02"	1263

3.1. PCR ve Elektroforez İşlemleri için Kullanılan Çözeltiler

- **Ethidium bromür çözeltisi:** 500 ml 0,5xTBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
- **Bovine serum albumin:** 1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.
- **Bromfenol blue çözeltisi:** 0,25 g bromfenol blue, 0,25 g xylene cyanol FF ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmış ve çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.
- **0,5X TBE tamponu:** Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak satın alınmış ve 0,5 birim 10X TBE tampon + 9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

- **Primerlerin Hazırlanması:** Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 μ M olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Moleküler çalışmalar esnasında kullanılan alet ve cihazlar aşağıda verilmiştir.

- ✓ DNA izolasyon robotu (QIAGEN)
- ✓ Buzdolabı (4°C) (Arçelik)
- ✓ Derin Dondurucu (-20°C)(Uğur)
- ✓ Hassas Terazı (Shimadzu, AY220)
- ✓ PCR Cihazı (Thermo Scientific, Arktik Thermal Cyder)
- ✓ Otomatik Mikro Pipetler (Eppendorf)
- ✓ Otoklav (Wiseclove, Orginal fuzzy Control Sistem)
- ✓ Soğutmalı Santrifüj (Thermo Scientific, MR 23i Centrifuge)
- ✓ Nanodrop (Thermo Scientific)
- ✓ Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, MR Hei-Standart)
- ✓ Isısal döngü cihazı (Thermal Cyclers-Thermo)
- ✓ Mikrodalga Fırın (Blueline)
- ✓ Güç kaynağı (OWI Seperation System)
- ✓ Elektroforez Sistemi (OWI) ve (Sigma-Aldrich, SHU13)
- ✓ Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, Gel-Doc 2000)
- ✓ Saf Su Makinası (Nüve, NS112)
- ✓ Buz Makinası (Scotsman AF-80)
- ✓ Etüv (Memmert)
- ✓ Vorteks (Wisemix, VM-10)
- ✓ -86°C Buzdolabı (Nuair Glacier, ultralow)

3.3. Yöntem

RAPD (rasgele çoğaltılmış DNA farklılığı tekniği), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR= Polymerase Chain Reaction) yardımıyla sentetik oligonükleotidler olan 10 baz uzunluğundaki primerlerin genomik DNA'larla çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

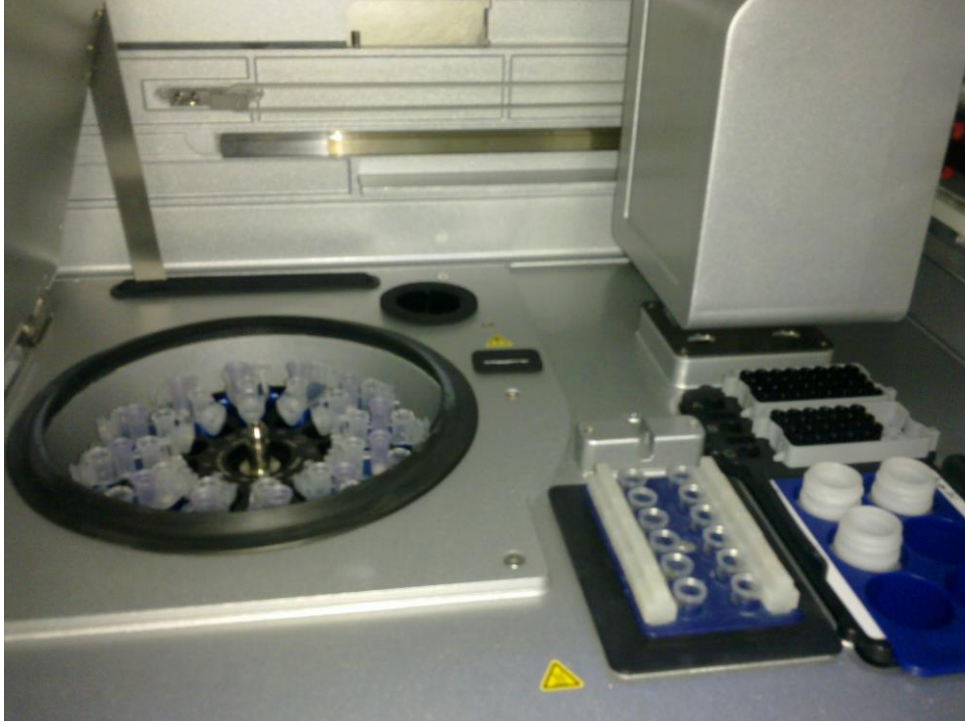
Isısal döngü cihazı içerisinde, uygun bir çoğaltma sıcaklığında, oligonükleotidler kalıp DNA üzerindeki bağlanma noktalarına yapışarak eğer bu noktalar birbirinden çoğaltılabilir uzaklıklarda bulunuyorlarsa kısmen kısa DNA parçacıkları üretmektedirler. Üretilen nükleotidlerin sayısı ve miktarında farklılıklar olmaktadır. Çünkü farklı örneklerin DNA'larındaki primer bağlanma bölgeleri farklılık göstermektedir (Çalışkan 2005).

3.3.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu, QIAGEN marka DNA izolasyon robotunda bitki DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. Şekil 3.1 de DNA izolasyon robotunun içinden bir görüntü yer almaktadır. Öncelikle aşağıdaki ön işlemler yapılmış sonra örnekler cihaza yerleştirilmiştir.

1. İzolasyonu yapılacak olan -86°C 'de tutulmuş olan yaprak örnekleri, porselen havan içerisinde sıvı azotla parçalanmıştır. Parçalanmış olan yapraklar 2 ml'lik eppendorf tüplere konulmuştur. (her bir ceviz tipinden 100 mg (0,1gr) yaprak hassas terazide tartılmıştır)
2. Parçalanmış yaprak örnekleri üzerine 400 ml Buffer AP1, 4 ml RNaz-A ilave edilmiş ve eppendorf tüplerin kapağı kapatılarak vorteksleme yapılmıştır.
3. Eppendorf tüpler 65°C 'ye ayarlanmış olan etüvde 10 dk tutulmuş ve birkaç kez alt üst edilerek karışmaları sağlanmıştır.
4. Etüvden çıkarılınca üzerlerine 130 ml Buffer AP2 eklenmiştir. Sonra, buz içerisinde 5 dk bekletilmişlerdir.
5. $20000\times g$ 'de 4°C 'ye ayarlanmış olan santrifüjde 5 dk santrifüj yapılmıştır.

6. Santrifüj işlemi sonrasında oluşan sıvı fazdan dikkatlice alınarak kapaksız /kapaklı 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarım gerçekleştirilmiş ve son olarak örnekler cihaza yerleştirilmiştir.



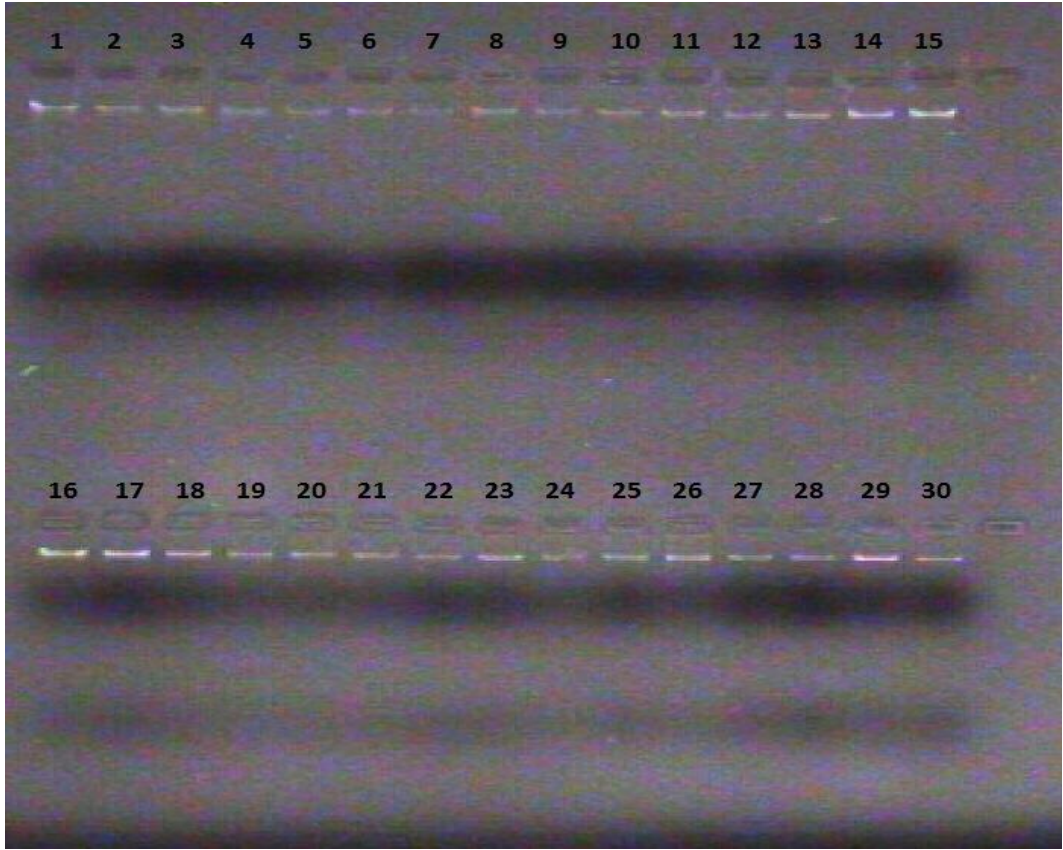
Şekil 3.1. QIAGEN marka izolasyon robotunun içinden bir görüntü

3.3.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi

İzolasyon sonrasında elde edilen DNA'ların miktarı ve kalitesi optik dansite (OD) ile kontrol edilmiştir. Bunun için, 260 (OD₂₆₀) ve 280 (OD₂₈₀) nanometre optik dansitedeki nanodrop spektrofotometre okumaları yapılmıştır. Elde edilen değerler ve bunların birbirine oranları kullanılarak, DNA miktar ve saflıkları belirlenmiştir. DNA'nın saflığını gösteren bu değer (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 1,2-1,7 arasında olması gerekmektedir (Ercişli vd 2008). Çizelge 3.2'de çalışmada kullanılan ceviz çeşitlerinin DNA miktar ve saflık değerleri verilmiştir. Şekil 3.2 ise ceviz genotiplerinin %1 lik agaroz jelde ki DNA miktarları görülmektedir.

Çizelge 3.2. DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm değerleri

Örnek No	260 nm	Saflık Değeri (OD₂₆₀/OD₂₈₀)	DNA Miktarı (ng/µl)
C1	0,0429	1,30	17,02
C2	0,0628	1,38	13,85
C3	0,0440	1,12	13,17
C4	0,0455	1,18	36,54
C5	0,0465	1,16	112,79
C6	0,0431	1,36	10,87
C7	0,0517	1,16	84,04
C8	0,0442	1,21	30,19
C9	0,0545	1,54	5,19
C10	0,0555	1,10	46,73
C11	0,0447	1,15	194,13
C12	0,0451	1,21	190,19
C13	0,0471	1,27	7,60
C14	0,0539	1,44	6,92
C15	0,0446	1,40	7,11
C16	0,0470	2,65	8,94
C17	0,0496	1,07	47,69
C18	0,0097	1,35	9,33
C19	0,0142	1,54	13,65
C20	0,0118	1,23	11,35
C21	0,1894	1,16	182,12
C22	0,0091	1,27	8,75
C23	0,0119	1,20	11,44
C24	0,0183	1,29	17,60
C25	0,0104	1,28	16,10
C26	0,1510	1,17	145,19
C27	0,0699	1,15	67,21
C28	0,0090	1,27	8,65
C29	0,0914	1,27	87,88
C30	0,0279	1,21	26,82



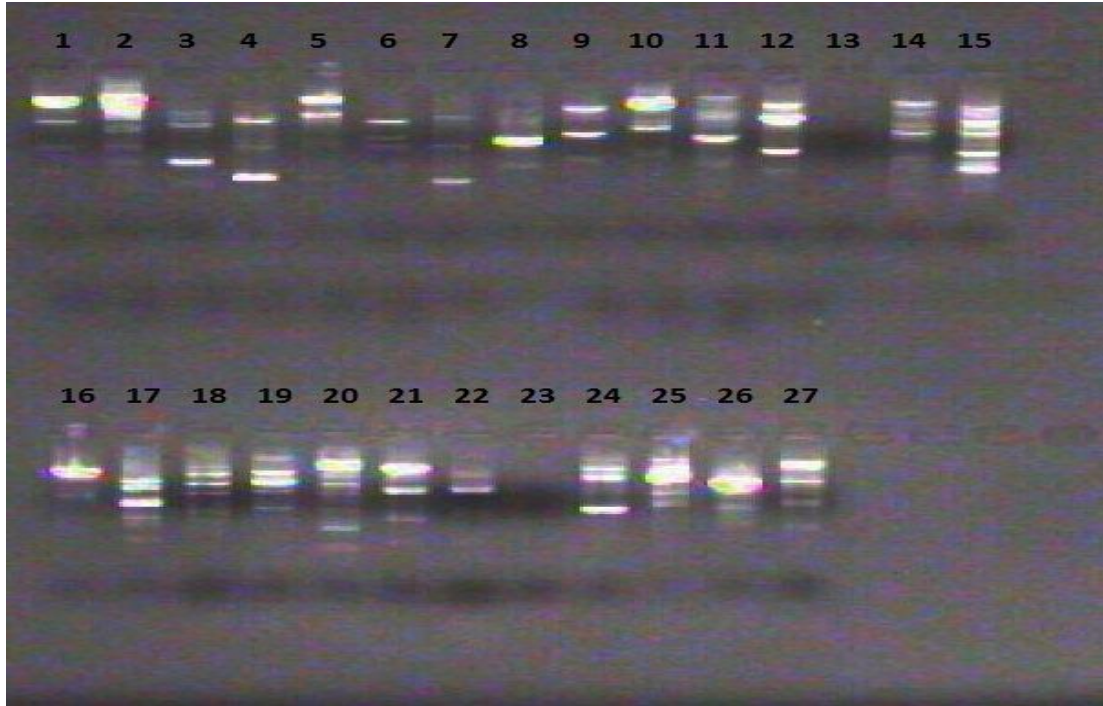
Şekil 3.2. Ceviz tiplerinin %1 lik agaroz jelde ki DNA miktarları (1:C1, 2:C2, 3:C3, 4:C4, 5:C5, 6:C6, 7:C7, 8:C8, 9:C9, 10:C10, 11:C11, 12:C12, 13:C13, 14:C14, 15:C15, 16:C16, 17:C17, 18:C18, 19:C19, 20:C20, 21:C21, 22:C22, 23:C23, 24:C24, 25:C25, 26:C26, 27:C27, 28:C28, 29:C29, 30:C30).

3.3.3. DNA amplifikasyon koşulları ve primerler

Öncelikle, hangi RAPD primerlerinin kullanılacağı belirlenmiştir. Bunun için, ceviz genotiplerinden C1 genotipi kullanılmıştır. 10 baz uzunluğundaki toplam 27 primer (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) kullanılarak RAPD tekniği ile PCR'da ceviz tiplerine ait bantlar elde edilmiştir. Bunlardan 25'si amplifikasyon vermiştir. Çizelge 3.3'de, bu primerlerin isimleri ve baz sırası (5' → 3') ve amplifikasyon durumları verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.3 bu primerlerin amplifikasyon durumları görülmektedir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan 27 adet RAPD primeri, baz dizilimleri ve amplifikasyon durumları

Sıra No	Primer Adı	Baz Sırası (5'→3')	Amplifikasyon
1	OPW-01	CTCAGTGTCC	+
2	OPW-04	CAGAAGCGGA	+
3	OPW-05	GGCGGATAAG	+
4	OPW-06	AGGCCCGATG	+
5	OPW-07	CTGGACGTCA	+
6	OPW-08	GACTGCCTCT	+
7	OPW-11	CTGATGCGTG	+
8	OPW-13	CACAGCGACA	+
9	OPW-17	GTCCTGGGTT	+
10	OPW-18	TTCAGGGCAC	+
11	OPW-20	TGTGGCAGCA	+
12	OPA-01	CAGGCCCTTC	+
13	OPA-02	TGCCGAGCTG	-
14	OPA-04	AATCGGGCTG	+
15	OPA-13	CAGCACCCAC	+
16	OPH-14	ACCAGGTTGG	+
17	OPH-17	CACTCTCCTC	+
18	OPH-18	GAATCGGCCA	+
19	OPH-19	CTGACCAGCC	+
20	OPY-06	AAGGCTCACC	+
21	OPY-07	AGAGCCGTCA	+
22	OPY-08	AGGCAGAGCA	+
23	OPY-13	GGGTCTCGGT	-
24	OPY-15	AGTCGCCCTT	+
25	OPY-16	GGGCCAATGT	+
26	OPB-08	GTCCACACGC	+
27	OPB-10	CTGCTGGGAC	+



Şekil 3.3. C1 ceviz tipine ait 27 primerin amplifikasyon durumu

(1:OPW-01, 2:OPW-04, 3:OPW-05, 4:OPW-06, 5:OPW-07, 6:OPW-08, 7:OPW-11, 8:OPW-13, 9:OPW-17, 10:OPW-18, 11:OPW-20, 12:OPA-01, 13:OPA-02, 14:OPA-04, 15:OPA-13, 16:OPH-14, 17:OPH-17, 18:OPH-18, 19:OPH-19, 20:OPY-06, 21:OPY-07, 22:OPY-08, 23:OPY-13, 24:OPY-15, 25:OPY-16, 26:OPB-08, 27:OPB-10)

3.3.4. RAPD-PCR analizleri

PCR işlemi için aşağıdaki protokol izlenmiştir;

0,2 ml'lik PCR tüplerinin her birine, 3 µl 10X PCR tamponu, 1,3 µl BSA (10 mg/ml), 0,60 µl dNTP (10 mM), 1,20 µl MgCl₂ (25 mM), 3,00 µl DNA (100 ng/µl), 1,2 µl primer (5 µM), 0,30 µl 5 Unit/µl *Taq* DNA polimeraz ve 17,60 µl saf su ilave edilerek hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Buharlaşma olmaması için her reaksiyon tüpüne mineral yağ damlatılmıştır. Bu işlemlerin ardından örnekler PCR Thermal Cycler cihazına yerleştirilmiştir.

PCR cihazı, örnekleri öncelikle otomatik olarak 2 dakika 94°C tutmaktadır. Ardından, 4 döngü olacak şekilde sırasıyla 30 saniye 94°C, 1 dakika 37°C, 2 dakika 72°C'de tutarak

41 döngü olacak şekilde sırasıyla 30 saniye 93°C, 1 dakika 35°C, 2 dakika 72°C'de işlem yapmaktadır. Son olarak 5 dakika 72°C'de tutarak süreç tamamlanmaktadır (Çizelge 3.4). PCR aletinden çıkarılan örnekler 4°C'de muhafaza edilmiştir (Ercişli vd 2008).

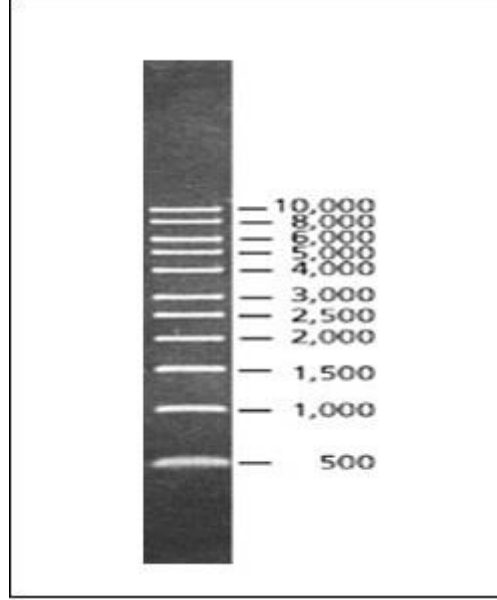
Çizelge 3.4. RAPD-PCR döngüsü programı

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94°C	02:00 dk	2
94°C	00:30 sn	
37°C	01:00 dk	
72°C	02:00 dk	
94°C	00:30 sn	2
35°C	01:00 dk	
72°C	02:00 dk	
93°C	00:30 sn	41
35°C	01:00 dk	
72°C	02:00 dk	
72°C	05:00 dk	

3.3.5. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1,5 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5XTris–Borate EDTA (TBE) tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır. İçerisine 0,5 µg/ml olacak miktarda Ethidium bromid eklenmiştir. Hazırlanan jel, örneklerin yükleneceği kuyucuklar için tarak yerleştirilerek hazırlanan elektroforez tankına dökülmüştür. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek yüklenmiştir. Jelin ilk kuyucuğuna elektroforez işlemi sonucunda oluşacak bantların doğru şekilde yorumlanmasını sağlayacak olan 1 kb DNA markör (Ladder, 0,5-10 kb) (Şekil 3.4) yüklenmiştir. Elektrik akımı verilerek 75 Volt değerinde 60 dakika süre ile DNA'lar

elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez tankından çıkarılan jel, görüntüleme cihazında UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 3.4. Çoğaltılan DNA parçalarının büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA markörü (Ladder, 0,5-10 kb)

3.3.6. Veri analizleri

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi her bir bireyde her primer için bantların var (1) veya yok (0) oluşuna göre ifade edilmiştir. Oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bantların varlığı primerlerin hibridize olduğu ve bu primerlerin ait olduğu operon bölgelerinin incelenen örneklerde bulunduğu anlamında değerlendirilmiştir. Populasyon içi değerlendirmeler Jaccard (1908)'in benzerlik indeksiyle, populasyonlar arası değerlendirmeler ise SPSS V.17 ile hesaplanmış ve dendogramları UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Analysis) analizi ile oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA izolasyonu

Çalışmada, ceviz tiplerine ait yaprak örneklerinde yapılan DNA izolasyonunda QIAGEN marka DNA izolasyon cihazı ve bitki izolasyon kiti kullanılmıştır. Elde edilen DNA'ların miktarları ile saflık değerleri nanodrop spektrofotometrede (Thermo) ölçülerek belirlenmiştir.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Buna göre, DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilecek değerlerle belirlenebilmektedir. 1 optik dansite (OD), çift sarmallı DNA için 50 µg/ml, tek sarmal DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için ise 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. 260 ve 280 nm dalga boylarında ki değerler arasındaki oran (OD_{260}/OD_{280}), nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1,8 ve RNA'da ise yaklaşık 2'dir. Eğer ortamda fenol veya protein bulunuyorsa oran bu değerlerden düşük olabilmektedir (Olgun ve Topal 1999).

Seçilen 30 adet ceviz ağacından alınan yaprak örneklerinde yapılan izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları ve saflık değerleri, Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Nanodrop spektrofotometre verileri değerlendirilerek ceviz tiplerine ait DNA'ların araştırmadaki RAPD-PCR uygulamaları için yeterli miktarda ve saflıkta bulunduğu karar verilmiştir.

4.2. RAPD-PCR Analizleri

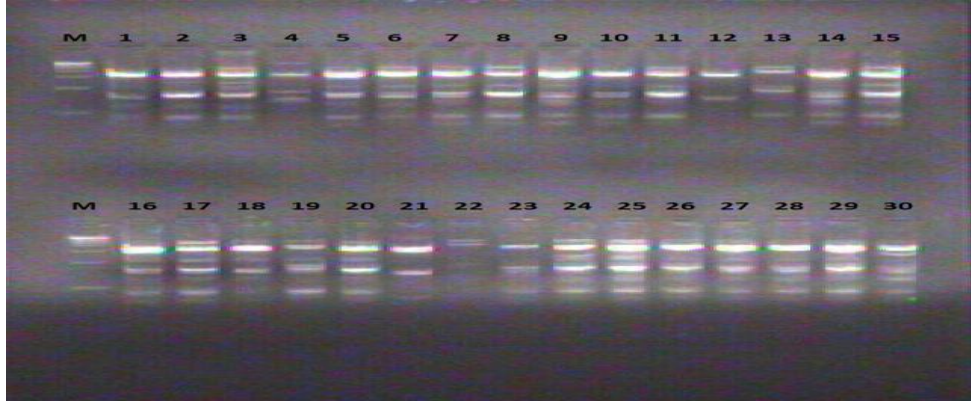
30 ceviz tipinden elde edilen DNA örnekleri, 10 baz uzunluğuna sahip olan RAPD primerleri kullanılarak PCR işlemlerine tabi tutulmuştur. Yapılan PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen bant sayıları, polimorfizm oranları ve yaklaşık bant büyüklükleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

PCR işlemlerinde RAPD analizi için kullanılan 27 primerden amplifikasyon durumuna göre 19 primer seçilmiş ve seçilen 19 primer toplam 81 adet bant oluşturmuştur. Toplam 81 adet banttan 73’ü genotipler arasında polimorfizm göstermiş ve polimorfizm oranı %81,40 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). En fazla bant sayısı OPW-01 primerinden (10 bant) elde edilirken en az bant sayısı OPY-15 primerinden (1 bant) elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından OPW-01 primeri (10 bant) en fazla sayıya sahip iken OPW-05 ve OPW-06 primerleri 2 bantla en az polimorfik bant oluşturan primerler olmuştur. OPW-04 nolu primerden 3 adet, OPW-08 nolu primerden 2 adet, OPY-15 nolu primerden 1 adet monomorfik bant elde edilmiştir.

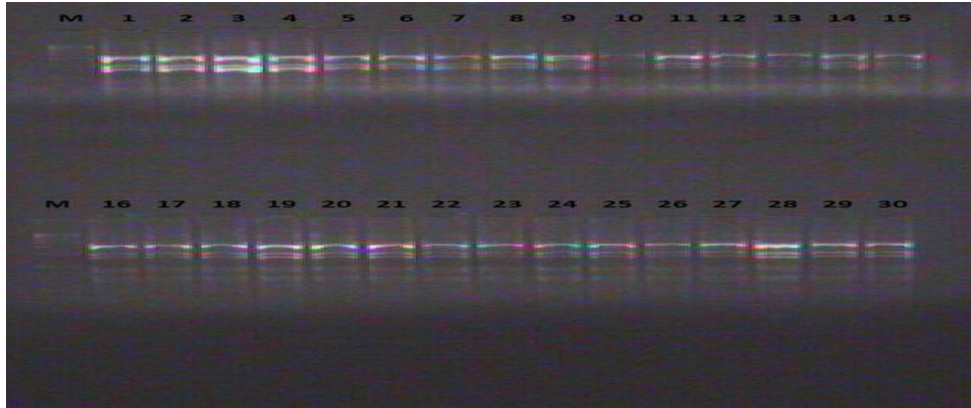
Primer başına elde edilen ortalama bant sayısı 4,26 ve ortalama polimorfik bant sayısı ise 3,84 olarak belirlenmiştir. En düşük bant büyüklüğü (100 bç), OPW-06, OPW-11, OPW-17 ve OPA-01 primerlerinden; en büyük bant büyüklüğü (4000 bç) ise OPW-01 primerinden elde edilmiştir. Çalışılan primerlere ait 8 primerin bant görüntüleri, Şekil 4.1- Şekil 4.8’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen yaklaşık bant büyüklükleri ile bant sayıları ve polimorfizm oranları

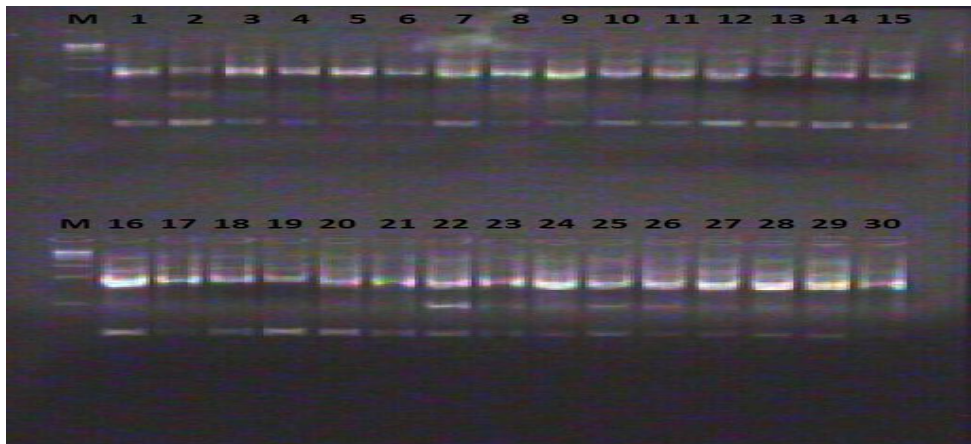
Sıra no	Primer	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)	Yaklaşık bant büyüklüğü (bp)
1	OPW-01	10	10	100	280-4000
2	OPW-04	3	0	0	750-2000
3	OPW-05	2	2	100	350-1000
4	OPW-06	3	2	66,67	100-3000
5	OPW-07	3	3	100	700-2000
6	OPW-08	2	0	0	500-900
7	OPW-11	5	5	100	100-2000
8	OPW-13	4	4	100	150-1500
9	OPW-17	4	4	100	100-950
10	OPW-18	4	4	100	350-900
11	OPW-20	5	5	100	350-2000
12	OPA-01	9	9	100	100-2000
13	OPH-17	5	5	100	300-950
14	OPH-18	3	3	100	300-1200
15	OPH-19	5	5	100	250-1000
16	OPY-06	5	4	80	100-1000
17	OPY-07	4	4	100	200-2500
18	OPY-08	4	4	100	250-1300
19	OPY-15	1	0	0	500-1200
Ortalama		4,26	3,84	%81,40	
TOPLAM		81	73		



Şekil 4.1. OPW-01 primerine ait görüntü



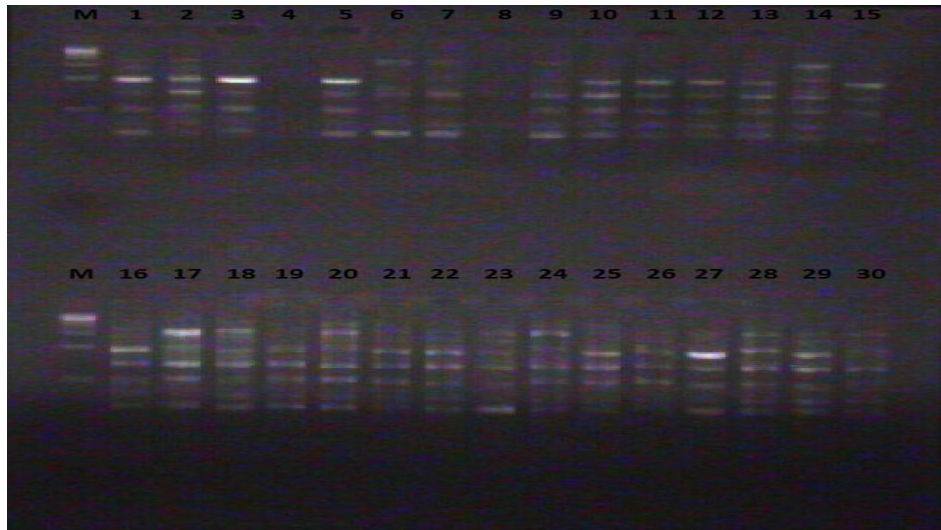
Şekil 4.2. OPW-04 primerine ait görüntü



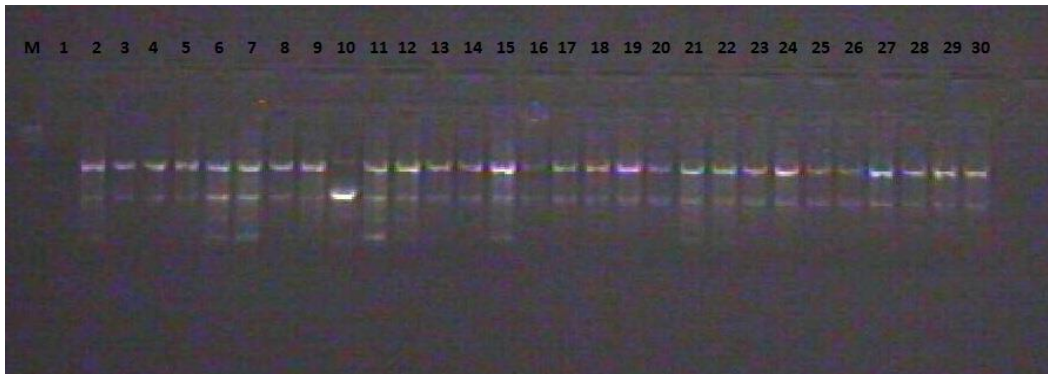
Şekil 4.3. OPW-06 primerine ait görüntü



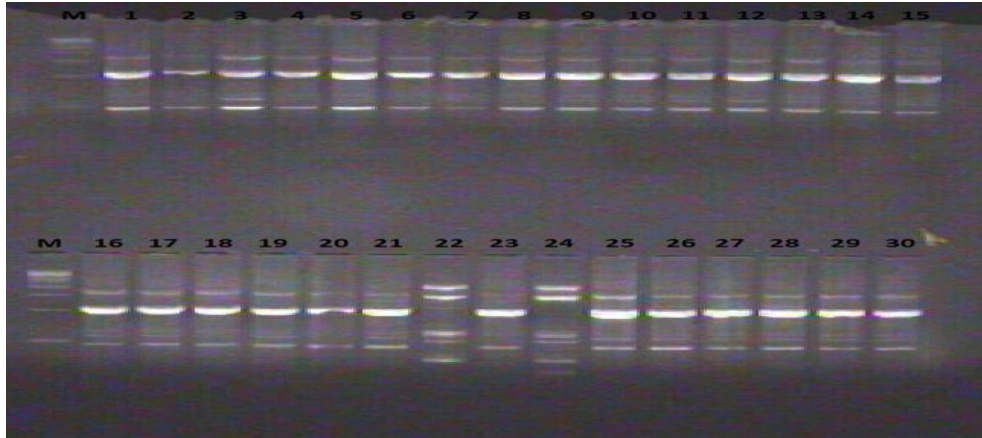
Şekil 4.4. OPW-07 primerine ait görüntü



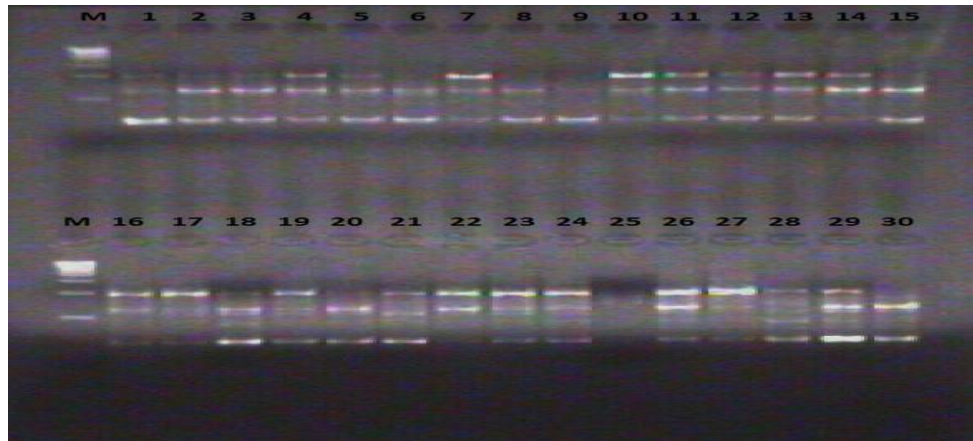
Şekil 4.5. OPW-11 primerine ait görüntü



Şekil 4.6. OPW-17 primerine ait görüntü



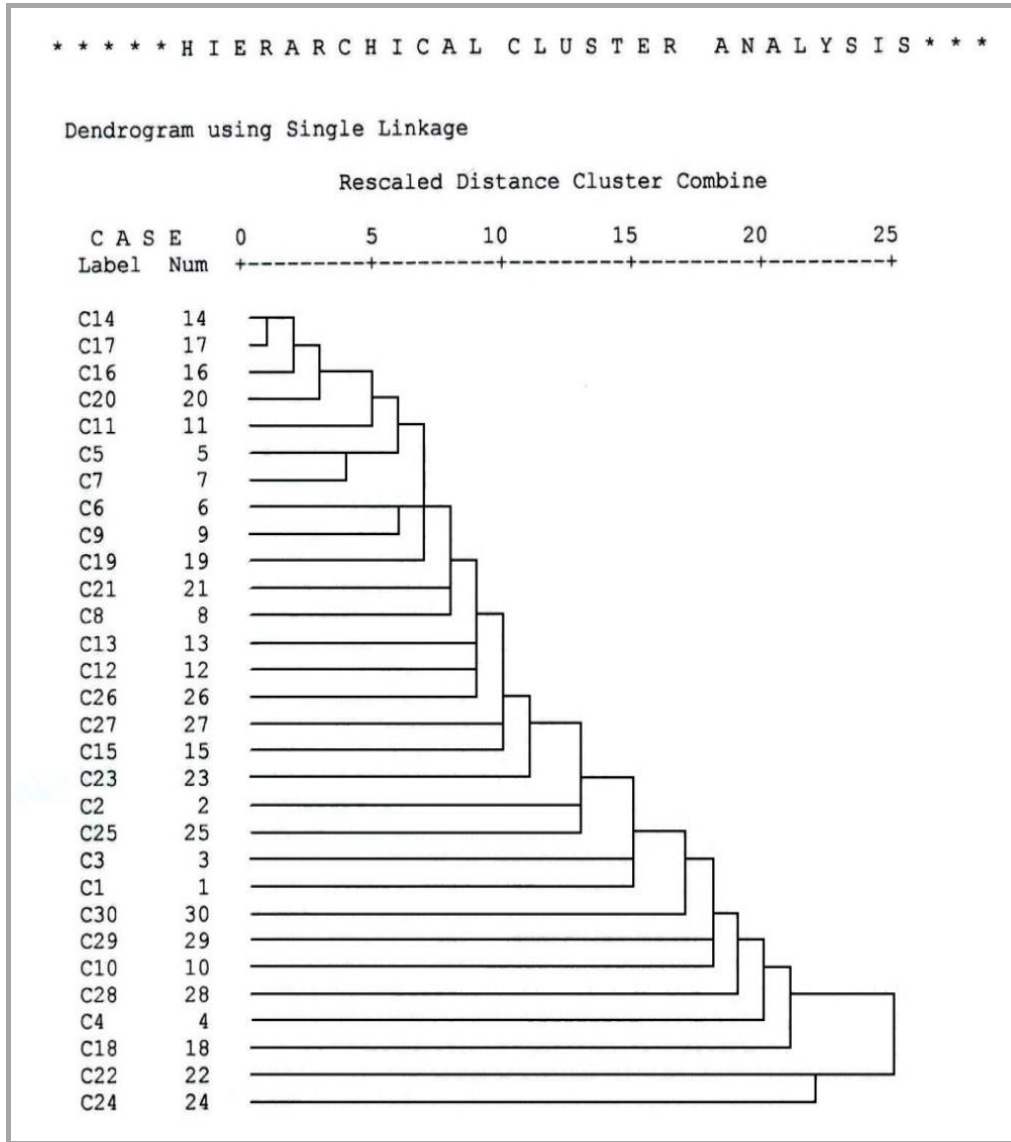
Şekil 4.7. OPA-01 primerine ait görüntü



Şekil 4.8. OPY-06 primerine ait görüntü

Farklılık indeksi ve dendrogram: Ceviz tipleri arasında genetik akrabalık düzeyinin bir ifadesi olan farklılık indeksi, Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en düşük farklılık indeksi (27,100) C14 ve C17 tipleri arasında belirlenmiştir. En yüksek farklılık indeksi (320,766) ise, C18 ve C22 tipleri arasında belirlenmiştir.

Ceviz tipleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren bir başka ifade olan dendrogram, Şekil 4.9’da verilmiştir. Dendrogram incelendiğinde ceviz tipleri arasında genetik çeşitliliğin fazla olduğu görülmektedir. Birbirine en yakın genotipik benzerlik C14 ve C17 tipleri arasında ortaya çıkmıştır. C22 ve C24 tiplerinin ise diğer ceviz tiplerinden oldukça farklı oldukları ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.9. UPGMA metoduyla oluşturulan ceviz tipleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram

Çizelge 4.2. Ceviz tipleri arasındaki farklılık indeksi

Tip No	Farklılık indeksi																													
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	1C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30
C1	,000																													
C2	163,675	,000																												
C3	177,371	159,065	,000																											
C4	219,390	224,762	231,405	,000																										
C5	108,210	122,193	103,483	157,410	,000																									
C6	136,475	156,833	143,843	168,230	79,735	,000																								
C7	125,489	100,974	126,893	170,934	45,025	63,732	,000																							
C8	171,015	142,334	156,360	141,163	90,691	94,107	82,926	,000																						
C9	126,023	146,381	151,892	169,919	86,223	57,301	74,934	66,784	,000																					
C10	179,584	191,861	209,995	238,048	141,392	159,780	155,793	148,175	158,535	,000																				
C11	148,050	147,467	132,515	159,304	66,846	59,915	64,253	80,582	88,197	134,216	,000																			
C12	166,056	135,859	169,066	133,200	113,283	118,712	115,404	117,813	126,020	165,187	95,300	,000																		
C13	150,901	134,260	151,714	186,463	85,939	125,518	72,594	125,401	125,282	180,648	110,761	123,529	,000																	
C14	129,142	112,360	128,481	156,429	62,707	78,613	58,427	84,768	69,043	123,076	51,036	91,893	83,388	,000																
C15	186,081	129,162	160,068	247,848	119,926	120,421	101,867	125,778	133,985	198,296	104,743	155,894	140,607	107,166	,000															
C16	141,264	122,469	132,870	177,251	74,969	107,449	78,563	87,970	90,005	134,011	71,998	120,589	103,383	36,569	80,483	,000														
C17	148,368	122,380	124,508	167,922	66,606	90,246	70,060	80,794	66,616	142,302	54,936	102,053	102,754	27,100	101,719	48,062	,000													
C18	243,064	204,993	217,747	271,824	182,592	196,346	176,839	186,013	185,754	266,613	179,246	180,908	217,859	151,411	216,144	172,373	138,231	,000												
C19	162,048	145,406	147,394	145,817	78,685	121,006	83,880	94,474	102,089	154,381	87,708	111,020	108,701	67,746	135,965	80,835	63,772	178,877	,000											
C20	145,951	94,819	138,149	173,238	71,922	77,943	59,910	74,663	76,558	138,324	78,463	124,901	100,929	42,894	109,100	53,970	46,654	152,753	69,680	,000										
C21	157,444	143,000	158,981	182,719	110,966	94,741	92,907	114,816	111,256	155,136	79,063	101,984	123,914	66,019	117,573	94,715	79,199	188,616	94,352	91,294	,000									
C22	298,035	260,015	302,316	251,632	217,514	249,028	231,916	250,835	258,450	293,802	208,246	230,833	175,415	213,104	289,057	233,926	216,864	320,766	217,176	207,602	251,433	,000								
C23	186,129	153,329	204,602	214,338	127,567	144,395	116,476	141,116	135,277	172,579	135,030	166,681	159,648	83,994	155,539	102,803	94,014	193,269	136,133	93,070	125,549	273,166	,000							
C24	272,418	203,972	265,208	280,525	188,174	204,410	192,549	201,722	203,025	255,464	197,197	218,587	243,455	177,687	252,306	198,649	164,507	256,326	179,745	162,299	210,013	145,159	209,658	,000						
C25	213,747	178,814	157,254	239,613	140,311	127,527	143,905	117,543	121,125	207,681	114,002	158,879	168,725	118,564	131,147	139,526	108,544	236,888	123,697	118,486	95,279	283,864	184,017	231,033	,000					
C26	149,565	92,066	150,418	186,239	91,595	99,506	105,997	106,253	116,021	154,307	76,094	72,132	123,084	73,245	129,513	101,941	83,405	183,549	107,764	98,520	77,800	238,223	129,492	181,727	97,555	,000				
C27	151,737	154,228	170,209	188,282	85,859	110,014	92,527	127,428	111,251	149,005	95,257	134,553	106,575	76,243	148,295	104,939	103,343	227,654	104,576	101,518	102,849	247,110	114,158	205,068	105,190	96,807	,000			
C28	211,953	179,121	228,616	223,388	144,266	142,170	140,907	176,454	129,487	221,574	154,170	146,173	172,715	135,016	205,228	171,585	131,256	214,249	152,681	160,291	169,496	281,295	181,376	232,691	195,174	133,154	147,876	,000		
C29	157,109	163,323	197,063	224,185	128,460	146,449	127,255	161,850	156,011	192,284	122,835	178,862	149,176	120,821	158,768	130,931	140,048	247,628	163,074	128,336	136,292	283,013	140,977	272,423	186,434	141,115	122,229	191,303	,000	
C30	174,328	149,173	175,180	242,115	119,264	137,622	136,600	142,356	154,137	189,489	131,971	161,381	169,328	129,016	164,269	146,998	148,382	262,807	160,601	134,517	141,444	300,022	173,775	260,064	157,236	113,748	133,175	192,915	129,543	,000

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Tüm dünyada yetiştiriciliği yapılan ceviz çeşitleri şans çöğürlerinden veya ıslah programlarından meydana gelmiştir. Bu çeşitlerin karakterize edilmesi ıslahçılar için oldukça önemlidir. Ayrıca çeşitlerin ismine doğru olarak kısa bir süre içerisinde tanımlanması meyvecilikte çok önemlidir. Ancak genetik çeşitliliği karakterize etmek için kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler oldukça zaman almakta ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. DNA markör teknikleri ile farklı ekolojilerdeki genetik materyallerin karakterize edilmesi sağlanmaktadır. Dolayısı ile ceviz gen kaynağının içerisinde yer alan tipler arasında genetik ilişkiyi ve genetik varyasyonu belirleme, gen kaynaklarının verimli bir şekilde kullanımını etkileyecek önemli bir konudur.

RAPD-PCR yönteminin tekrarlanabilirliği hassastır. Bu tez çalışmasında güvenilirliği sağlayabilmek için PCR koşulları iyi bir şekilde optimize edilmeye çalışılmış, her bir primer en az iki kez tekrarlanmış ve sadece tekrarlanabilir nitelikteki bantlar değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ise daha önce yapılan çalışmalar ışığında seçilmiş olup, *Juglans* türlerinde bilgi verici özellikte olduğu saptanmış olan primerlerdir.

PCR işlemlerinde RAPD analizi için kullanılan 27 primerden amplifikasyon durumuna göre 19 primer seçilmiştir. Seçilerek kullanılan 19 primer toplam 81 adet bant oluşturmuştur. Bu 81 adet banttan 73'ü tipler arasında polimorfizm göstermiş ve polimorfizm oranı %81,40 olarak belirlenmiştir. En fazla bant sayısı OPW-01 primerinden (10 bant) elde edilirken en az bant sayısı OPY-15 primerinden (1 bant) elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından OPW-01 primeri (10 bant) en fazla sayıya sahip iken OPW-05 OPW-06 primerleri 2 bantla en az polimorfik bant oluşturan primerler olmuştur. OPW-04 nolu primerden 3 adet, OPW-08 nolu primerden 2 adet, OPY-15 nolu primerden 1 adet monomorfik bant elde edilmiştir.

Tipler arasında genetik akrabalık düzeyinin bir ifadesi olan farklılık indeksi, Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu çizelgedeki değerler farklılık indeksi formülü ile hesaplanarak elde edilmiştir. Çizelge incelendiğinde, en düşük farklılık indeksi C14 ve C17 ceviz tipleri arasında tespit edilmiştir. En yüksek farklılık indeksi oranı C18 ve C22 tipleri arasında tespit edilmiştir.

RAPD tekniği kullanılarak yapılmış olan birçok çalışmada (Woeste *et al.* 1996; Fatahi *et al.* 2010; Malvolti *et al.* 2001; Nicese *et al.* 1998; Francesca *et al.* 2010; Ertürk ve Dalkılıç 2011; Francesca *et al.* 2013) olduğu gibi bu çalışmadan elde edilen genel sonuca göre, RAPD tekniği ceviz tipleri arasındaki polimorfizmi belirlemede çok uygun bir tekniktir.

Bu çalışmada, Erzurum'un Uzundere ilçesine bağlı Cevizli Köyü'nde yetiştirilen cevizler arasındaki genetik ilişki RAPD yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Çalışma alanımız olan "Cevizli" köyünün de içinde bulunduğu Çoruh vadisi, sadece Türkiye'nin değil Dünya'nın sayılı genetik çeşitlilik arz eden noktalarından birisi özelliğindedir. Çoruh vedisinin genelinde ceviz yetişmekte olup "Cevizli" köyünde de oldukça fazla ceviz yetişmektedir. Bu çalışmanın asıl amacı, Çoruh vadisi gibi genetik çeşitliliğin yüksek olduğu bir alanda, özellikle daha dar bir çerçevede yani sadece "Cevizli" köyünde yetişen cevizlerdeki genetik çeşitliliğin ne ölçüde bulunduğunun belirlenmesi olmuştur. Çalışma alanında köy sakinleri ile yapılan görüşmeler sonucunda, cevizlerin genellikle şans çöğürü yani tohumdan yetişmiş cevizler olduğu tespit edilmiştir. Bu bakımdan değerlendirecek olursak, küçük bir alan taranarak yapılan bu çalışma sonucunda oldukça yüksek oranda tespit edilen polimorfizm oranı (%81,40), ıslah çalışmaları için önem arz etmektedir. Sonuç olarak, gelecekte yapılacak olan ceviz ıslahı çalışmaları için bu varyasyonun değerlendirilebileceği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- Akça, Y., 2003. Türkiye Ceviz Yetiştiriciliğine Genel Bakış. <http://www.ceviz.gen.tr/yazil.htm>
- Anonim 2013a. <http://www.hobibahcemiz.net/viewtopic.php?f=136&t=8561>(10.04.2013)
- Anonim 2013b. <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-17.pdf> (14.04.2013)
- Anonim 2013c. Orman Genel Müdürlüğü www.ogm.gov.tr/ekutuphane/Yayinlar/Ceviz%20Eylem%20Planı.pdf (25.05.2013)
- Anonymous 2013d. FAOSTAT. <http://www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (14.03.2013)
- Anonymous 2013e. The International SNP Map Working Group. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 409:928-933. <http://www.jcmb.halic.edu.tr/pdf/10-2/2.pdf> (22.03.2013)
- Çalışkan, M., 2005. RAPD analizi ile Güllerde (*Rosa* sp.) Genetik tanımlama. Ankara Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.
- Davis, G.L., McMullen M.D., Baysdorfer C., Musket T., Grant D., 1999. A maize map Standard with sequence dcore markers, grass genomere ference points, and 932 expressed sequence tagg edsites (ESTs) in a 1736 locus map. *Genetics*, 152, 1137-1172.
- Doğan, Y., 2006. Characterization of some walnut cultivars and genotypes (*Juglans regia* L.) via molecular marker techniques.
- Ercişli, S., Orhan, E., Yıldırım, N., Açar, G., 2008. Comparison of Sea Buckthorn Genotypes (*Hippophae rhamnoides* L.) Based on RAPD and FAME Data. *Turk J, Agric. For.* 32, 363-368
- Ertürk, U., Dalkılıç, Z., 2011. Determination of genetic relation ship among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes and their early-bearing progenies using RAPD markers. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1), 5944-5952.
- Fatahi, R., Ebrahimi, A., Zamani, Z., 2010. Horticulture Environment and Biotechnology. 51(1), 51-60
- Francesca, P.I., Pamfil, D., Raica, P., Petricele, I.V., Sisea, C ., Vas, E ., Botos, B ., Bodea, M ., Botu, M., 2010. Assessment of the genetic variability among some *Juglans* cultivars from the Romanian National Collection at SCD P. Valceausing RAPD markers. *Romanian Biotechnological Letters*. 15 (2), 41-49.
- Francesca, P.I., Vicol A.C., Botu M., Raica P.A., 2013. Relationships of walnut cultivars in germplasm collection: comparative analysis of phenotypic and molecular data. *Scientia Hort.*, 153, 124-135.
- Gupta, M, Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J.L., 1994. Amplification of DNA markers from Evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 998-1006.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc. Vaud Sci. Nat.* 44, 223-270.

- Jongeneel, C.V., 2000. Searching the expressed sequence tag (EST) databases: panning for genes. *Brief Bioinform* 1, 76-92.
- Joshi, S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K., Brar D.S., 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 1311-1320.
- Kantety, R.V., Rota M.L., Matthews D.E., Sorrells M.E., 2002. Data mining for simple-sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum, and wheat. *Plant Mol. Biol.*, 48, 501-510.
- Kesawat, M.S., Das B.K., 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. *J. CropSci. Biotech.*, 12 (4), 169-181.
- Khlestkina E.K., Salina E.A., 2006. SNP markers: methods of analysis, ways of development and comparison on an example of common wheat. *Russian J. Genet.* 42, 585-594.
- Konieczny, A., Ausubel F.M., 1993. Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.*, 4, 403-410.
- Korzun V., Ebmeyer E., 2003. Molecular markers and their applications in wheat breeding. Rome, Italy. p:140-143.
- Kurata, N., Umehara Y., Tanoue H., Sasaki T., 1997. Physical mapping of the rice genome with YAC clones. *Plant Mol. Biol.*, 35,101-113.
- Liu B.H., 1998. Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press LLC, Boca Raton New York.
- Malvolti, M.E., Fornari, B., Maccaglia E., Cannata, F., 2001. Genetic Linkage Mapping in an Intraspecific Cross of Walnut (*Juglans regia* L.) Using Molecular Markers. *Acta Horticulturae*, 544, 179-185.
- Malvolti, M.E., Spada, M., Beritognolo, I., Cannata F., 1997. Differentiation of Walnut Hybrids (*Juglans nigra* L. x *Juglans regia* L.) through RAPD Markers. *Acta Horticulturae*, 462, 43-52
- Manning, W. E., 1978. The Classification within The *Juglandaceae*. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 65, 1058-1087.
- Nicese, F. P., Hormaza, J.I., McGranahan, G.H., 1998. Molecular Characterization and Genetic Relatedness among Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes Based on RAPD Markers. *Euphytica*, 101, 199-206.
- Olgun, A., Topal, A., 1999. DNA'nın analizi, (Ed: G.Temizkan, N. Arda), Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Kitap Evi yayımları. s:33
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2766-2770.
- Ovesna J., Polakova K., Leisova L. 2002. DNA analyses and their applications in Plant Breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 38 (1), 29-40.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2, 225-238.
- Rafalski J.A., 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 94-100.

- Rangwen, R., Akkaya M.S., Bhagwar A.A., Lavi U., Cregan P.B., 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90, 43-48.
- Ridout, C.R. and Donini P., 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science.* 4, 76-79.
- Röder M.S., Huang X.O., Ganai M.W. 2004. Wheat microsatellites: potantiel and implications. *Berling Heidelberg*, p: 255-266.
- Santos, J.B.D., Nienhuis J., Skrouch P., Slocum M.K., 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among Brassicaoleracea L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 87, 909-915.
- Smigielski E.M., Sirotkin K., Ward M., Sherry S.T. 2000. dbSNP: a database of single nucleotiden polymorphisms. *Nucl. Acids Res.*, 28(1), 352-355.
- Şen, S.M., 1986. Ceviz Yetiştiriciliği. Eser Matbaası. Samsun, 229 s.
- Tanksley, S.D., Ganai M.V., Prince J.P., de Vicente M.C., Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messequer R., Miller J.C., Miller L., Peterson A.H., Pineda O., Roder M.S., Wing R.A., Wuand W., Young N.D., 1992. High density molecular maps of the tomato and potatogenomes. *Genetics.* 132, 1141-1160.
- Thormann, C.E., Ferreira M.E., Camargo L.E., Tivang J.G., and Osborn T.C., 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88, 973-980.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijnhabs, M., Van De Lee,T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.*, 21, 4407-4414
- Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Morris M.S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T.J., Lipshutz R., Chee M., Lander E.S., 1998. Large scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 280(5366), 1077-1082.
- Weiland, J.J. ve M.H. Yu, 2003. A cleave damplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated withroot-knotnemato deresistance in sugarbeet. *CropSci*, 43, 814-881.
- 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 Res.* 18, 6531-6535
- Woeste, K., McGranahan, G. H., and Bernatzky, R., 1996. Randomly amplified polymorphic DNA loci from a walnut backcross [(*Juglans hindsii* × *J. regia*) × *J. regia*]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121 (3), 358-361.
- Yıldırım,A., 2007. Moleküler Genetik Ders Notları.
- Zietkiewicz, E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics*, 20, 176-183.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum ilinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Erzurum'da tamamladım. 2004 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisansımı yapmaya hak kazandım. 2009 yılında mezun oldum. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.