

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

“*Triticum dicoccoides* ile *Triticum durum* buğdayları melezlerinde ebeveyn ve F₄ neslinde RAPD yöntemiyle genotip belirlenmesi”

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arş.Grv. Burcu ARSLAN

Tezin Enstitüye verildiği Tarih : 21.09.2001

Tezin savunulduğu Tarih : 03.09.2001

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Süer YÜCE

Diğer Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Erdal BALCAN

MANİSA 2001

114288

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Şekil Listesi.....	IV
Çizelge Listesi.....	V
Teşekkür	VI
Özet	VII
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	5
3. MATERYAL VE METOD	9
3.1. Materyal.....	9
3.2. Metod.....	9
3.2.1. Buğdayların Yetiştirilmesi.....	9
3.2.2. DNA Analizi	10
3.2.2.1. DNA Analizinde Kullanılan Çözeltiler	11
3.2.2.2. DNA Analizinde Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları	12
3.2.2.3. DNA'ların Elde Edilmesi.....	12
3.2.2.4. DNA Konsantrasyon Tayini	13
3.2.2.5. DNA' ların Seyreltilmesi	14
3.2.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	15
3.2.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi	19
3.2.2.8. Ethidium Bromide ile Boyama.....	20
3.2.2.9. Fotoğraf Çekimi.....	20
4. BULGULAR	21
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	30
6. KAYNAKLAR	32
7. ÖZGEÇMİŞ	34

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.2.2.1.: RAPD metodu şematik gösterimi.....	10
Şekil 3.2.2.6.1.: PCR çoğaltım döngüleri.....	15
Şekil 3.2.2.6.2.: PCR sıcaklık döngüleri	16
Şekil 3.2.7.1.: λDNA Hin III/ Eco RI	19
Şekil 4.1.: OPA-02 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri.....	21
Şekil 4.2.: OPA-04 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri.....	22
Şekil 4.3.: OPA-06 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri.....	23
Şekil 4.4.: OPB-03 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri.....	24
Şekil 4.5.: OPB-04 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri.....	25
Şekil 4.6.: OPB-05 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri.....	26



Çizelge 1.1.: Dünya tahıl üretim miktarları.....	1
Çizelge 1.2.: Türkiye tahıl üretim miktarları	2
Çizelge 3.1.1.: Materyal olarak kullanılan buğday çeşitleri	9
Çizelge 3.2.2.4.: Çeşitlerden elde edilen DNA'ların OD ölçüm sonuçları ve miktarları	14
Çizelge 3.2.2.6.1.: PCR reaksiyonu için gerekli kimyasallar ve miktarları	17
Çizelge 3.2.2.6.2.: PCR işleminde kullanılan primerler ve baz dizilişleri	18
Çizelge 3.2.2.6.3.: Uygulanan PCR amplifikasyon programı	18
Çizelge 4.1.: Çeşitlerin uygulanan OPA-02 primeri ile verdikleri bant sayıları.....	21
Çizelge 4.2.: Çeşitlerin uygulanan OPA-04 primeri ile verdikleri bant sayıları	22
Çizelge 4.3.: Çeşitlerin uygulanan OPA-06 primeri ile verdikleri bant sayıları	23
Çizelge 4.4.: Çeşitlerin uygulanan OPB-03 primeri ile verdikleri bant sayıları	24
Çizelge 4.5.: Çeşitlerin uygulanan OPB-04 primeri ile verdikleri bant sayıları	25
Çizelge 4.6.: Çeşitlerin uygulanan OPB-05 primeri ile verdikleri bant sayıları	26
Çizelge 4.7.: Genotiplere ait DNA bakımından benzerlik ve farklılık oranları.....	27
Çizelge 4.8.: Çeşitlerin uygulanan tüm primerler ile verdikleri bant sayıları.....	28
Çizelge 4.9.: Ege 88 çeşidi Cluster sonucu.....	28
Çizelge 4.10.: Yavaros çeşidi Cluster sonucu.....	29
Çizelge 4.11.: Gediz 75 çeşidi Cluster sonucu.....	29
Çizelge 4.12.: Tüm çeşitlerin birlikte Cluster sonucu.....	30

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım esnasında, değerli bilgileri ile beni yönlendirip, destekleyen Prof. Dr. Süer YÜCE, Doç.Dr. Güldehan BİLGEN ve Yrd.Doç.Dr. Selim UZUNOĞLU'na laboratuvar çalıőmalarımdaki yardımlarından dolayı Uzman Refika AKÇALI CAN'a ve eğitim ve öğretim hayatım boyunca beni her zaman destekleyip hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme teşekkür ederim.

ÖZET

“ *T. dicoccoides* ile *T. durum* buğdayları melezlerinde ebeveyn ve F₄ neslinde RAPD yöntemiyle genotip belirlenmesi”

Hazırlayan : Burcu ARSLAN

Danışman : Prof. Dr. Süer YÜCE

Enstitü : C.B.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Buğday insan beslenmesinde önemli bir bileşendir. Bundan dolayı buğdayın kalite ve kantitesini arttırmak için birçok ıslah çalışması yapılmaktadır.

Bugün genotipik yapıların gözlemini mümkün kılan çeşitli moleküler markörler kullanımdadır. Bu araştırmada, buğday türlerinden, *Triticum durum* ve *Triticum dicoccoides* ekonomik, beslenme ve yüksek protein içeriği açısından önemleri nedeniyle kullanıldı ve bu türlerin hibritleri RAPD markırları kullanılarak analiz edildi.

Yirmi RAPD primerinin ön analiz sonuçlarına dayalı olarak önemli bantlar veren 6 primer (OPA-02, OPA-04, OPA-06, OPB-03, OPB-04, OPB-05) genetik polimorfizmi ve genotipleri belirlemek için seçilip kullanıldı. Elektroforetik bantlar Kluster yöntemine göre (Jump) analiz edildi. Türler arasındaki genotip uzaklıklar dendogramlarla belirlendi.

Sonuçta *Triticum dicoccoides*'in diğer kültür ebeveynleri ve melez döllerinden ayrı bir grup oluşturduğu gözlemlendi. Bu veriler gelecek ıslah çalışmaları için bir temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler : RADP (Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA), PCR (Polimreaz Zincir Reaksiyonu), *Triticum dicoccoides*, *Triticum durum*

ABSTRACT

“ Genotype identification in the *Triticum dicoccoides* and *Triticum durum* parents and F₄ generations by using RAPD markers. “

Pre. : Burcu ARSLAN

Advisor: Prof. Dr. Ser YÜCE

Institute : C.B.U. Institute of Natural and Applied Sciences, Master of Science Thesis.

Wheat is an important element of the human diet. For this reason, in order to increase the quality and the quantity of the wheat, many breeding studies are being carried out. Today, the various molecular markers that enables the observation of the genotype structures are in use.

In this research, the wheat species (*Triticum durum* and *Triticum dicoccoides*) were used because of their economical and dietary importance and high protein content respectively. Their hybrid offsprings were analyzed by using RAPD markers.

Six primers providing significant bands (OPA-02, OPA-04, OPA-06, OPB-03, OPB-04, OPB-05) were selected and used in RAPD analysis to determine the genetic polymorphism and identifying the genotypes, based on preliminary results of 20 RAPD primers. The electrophoretic data were analyzed by cluster method (Jump). Genotype distances among the species were revealed by dendograms.

In conclusions, it was determined that *T.diccocoides* formed another group different from the cluster parents and hybrid offsprings. This data forms a basis for the future breeding studies.

Key word: RAPD, PCR, *Triticum dicoccoides*, *Triticum durum*

1.GİRİŞ

Dünya nüfusunun yaklaşık %35'inin temel besini olan buğday, tüm dünyada besinlerden alınan kalorinin %20'sini sağlamaktadır (Çölkesen, 1995). Besin olarak kullanımı, ekmek, makarna yapımından bulgur, irmik yapımına kadar çok geniş bir alanı kapsar. Kültür bitkileri arasında danesinin uygun beslenme değeri, taşınma, saklanma, işlenmesindeki kolaylık ve bitkisinin geniş adaptasyon sınırları nedeniyle, dünyada ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada yer alan tahıl ürünüdür (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Dünya Tahıl Üretim Miktarları (Anonim, 2001)

Tahıl Ürünü		1995	1996	1997	1998	1999	2000
Buğday	Alan(Ha)	219.837.962	230.897.992	228.039.343	219.625.630	211.964.973	212.206.487
	ÜretimMt Ton	550.597.072	584.838.677	613.341.708	592.342.030	584.697.385	580.014.595
	VerimHG/Ha	25.046	25.329	26.896	26.971	27.585	27.333
Arpa	Alan(Ha)	69.133.530	66.019.401	64.163.134	56.700.689	52.962.133	55.472.207
	ÜretimMt Ton	140.946.016	155.334.699	154.648.596	137.594.089	127.180.604	132.896.783
	VerimHG/Ha	20.388	23.529	24.102	24.267	24.013	23.957
Çavdar	Alan(Ha)	10.523.305	11.105.537	10.918.059	10.182.666	9.490.905	9.758.92
	ÜretimMt Ton	22.781.611	22.941.674	25.020.406	20.819.829	19.968.895	19.971.448
	VerimHG/Ha	21.649	20.658	22.917	20.446	21.040	20.465
Yulaf	Alan(Ha)	17.375.302	16.798.928	16.207.293	13.407.218	12.911.740	12.815.176
	ÜretimMt Ton	28.598.106	30.912.962	31.860.952	26.319.704	24.505.475	25.994.503
	VerimHG/Ha	16.459	18.402	19.658	19.631	18.979	20.284
Mısır	Alan(Ha)	136.383.164	141.004.915	142.370.099	138.627.306	138.910.114	138.510.155
	ÜretimMt Ton	516.578.545	588.572.084	586.409.621	614.354.923	605.203.834	589.355.356
	VerimHG/Ha	37.877	41.741	41.189	44.317	43.568	42.550
Pirinç	Alan(Ha)	149.472.408	150.664.618	152.261.210	151.998.271	157.175.931	154.996.427
	ÜretimMt Ton	547.086.131	569.732.575	580.840.921	578.768.853	606.656.025	597.154.664
	VerimHG/Ha	36.601	37.815	38.148	38.077	38.597	38.527

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de gerek ekim alanı gerekse üretim bakımından buğdayın önemi büyüktür (Çizelge 1.2.). Bu nedenle buğday üretiminde az bir üretim artışı bile yüksek değer artışlarına neden olmaktadır. Hızla artan Dünya nüfusunun beslenme ihtiyacını

karşılmak için bitki genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak uygulanan bitki ıslahı yöntemleri ile hastalıklara dayanıklı, verim gücü ve kalitesi yüksek yeni çeşitler elde edilmeye çalışılmaktadır.

Çizelge 1.2. Türkiye Tahıl Üretim Miktarları (Anonim, 2001)

Tahıl Ürünü		1995	1996	1997	1998	1999	2000
Buğday	Alan(ha)	9 400 000	9 350 000	9 340 000	9 400 000	9 400 000	21 000 000
	ÜretimMt Ton	18 000 000	18 500 000	18 650 000	21 000 000	18 000 000	*
	VerimHG/Ha	1 915	1 979	1 997	2 234	1 919	*
Arpa	Alan(Ha)	3 525 000	3 650 000	3 650 000	3 750 000	3 650 000	8 000 000
	ÜretimMt Ton	7 500 000	8 000 000	8 200 000	9 000 000	7 700 000	*
	VerimHG/Ha	2 128	2 192	2 216	2 400	2 101	*
Çavdar	Alan(Ha)	146 000	148 000	147 000	133 000	140 000	260 000
	ÜretimMt Ton	240 000	245 000	235 000	232 000	230 000	*
	VerimHG/Ha	1 644	1 655	1 599	1 744	1 664	*
Yulaf	Alan(Ha)	148 000	161 500	158 000	158 500	154 000	314 000
	ÜretimMt Ton	250 000	275 000	280 000	310 000	290 000	*
	VerimHG/Ha	1 689	1 703	1 772	1 956	1 883	*
Mısır	Alan(Ha)	515 000	550 000	545 000	550 000	518 000	2 300 000
	ÜretimMt Ton	1 900 000	2 000 000	2 080 000	2 300 000	2 297 000	*
	VerimHG/Ha	3 689	3 636	3 817	4 182	4 434	*
Pirinç	Alan(Ha)	50 000	54 850	55 000	60 000	65 000	*
	ÜretimMt Ton	150 000	168 000	165 000	189 000	204 000	*
	VerimHG/Ha	3 000	3 063	3 000	3 150	3 138	*

*Bilgilere ulaşlamamıştır.

Türkiye'de buğday ıslahı ilk etapta yerli çeşitlerin sistematik olarak toplanması ve doğal koşullar altında seleksiyonu ile başlamıştır. Böylece 111/3, Sivas, 230/39, Kunduru, Karakılıç gibi Türk tarımına uzun yıllar hizmet veren çeşitler geliştirilmiştir. 1960'lı yılların ortalarında yurdumuza kısa saplı, gübreye toleranslı üstün verimli Meksika buğdayları getirilmiş ve buğday veriminde önemli bir artış kaydedilmiştir. Bu buğdayların pas hastalıklarına duyarlı olmaları nedeniyle bir süre sonra çoğu üretimden kalkmıştır. Bundan sonra Türkiye'de buğday ıslahı çalışmaları multidisipliner karakterde "Ülkesel Buğday Projesi" kapsamında yürütülmeye başlanmıştır. Diğer taraftan Meksika'da CIMMYT (Centro International de Mejoramiento de

Maizy Trigo; International Maize and Wheat Improvement Center; Uluslararası Mısır ve Buğday Araştırma Merkezi) organizasyonu ile koordineli çalışmalar programlanmış ve bu kuruluştan önemli ölçüde germplazm temini edilerek ıslah çalışmaları zenginleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonucu örneğin Cumhuriyet-75, Gerek-79, Ata-81, İzmir-85, Menemen-88, Dicle-74, Gediz-75, Ege-88 v.d. gibi yabancı buğday çeşitleri ile boy ölçüşebilecek önemli çeşitler tescil ettirilerek tarımına geçilmiştir (Demir ve ark. 1991).

Günümüzde ıslah çalışmalarında ürün miktarında artış yanında, kaliteye de önem verilmektedir. Yüksek protein içerikli yabancı buğdayların, protein ıslahı açısından önemli bir potansiyel içerdikleri bilinmektedir (Turgut ve ark. 1984). Bu nedenle; *T. dicoccoides* ile bazı durum buğday çeşitleri arasında gerçekleştirilen melezlerde tanede protein oranı bakımından genotipik değişkenliği belirleyerek bu melezlerde daha yüksek protein oranına sahip hatları seçebilme olanakları sürekli olarak araştırılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda *T. durum* X *T. dicoccoides* melezlerinde tanede daha yüksek protein ve diğer arzu edilen özellikler bakımından yapılacak seçimlerin bu gibi özellikleri tanımlayan genlerin bitkinin veriminde herhangi bir kayıp olmadan döllere geçebileceği bildirilmiştir (Tosun ve Altınbaş 1999).

Protein miktarının artırılması gibi kantitatif karakterler üzerine yapılan ıslah çalışmalarında, fenotipin gözlenmesi yetersiz kaldığından, bugün genotipik yapıyı gözlemeyi sağlayan çeşitli moleküler markörler kullanılmaktadır. Bitki ıslahında bu markörlerden kalitatif ve kantitatif karakterlere göre yapılan seleksiyonda, genetik ve bağlantı (linkage) haritalamalarında, çeşit tanımlanmasında, F₁ hibrid tohumluklarının kontrolünde, genotipler arasındaki genetik uzaklıkların ve çeşitliliğin belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Demir ve ark. 1999).

Moleküler markörler, enzimlerin veya DNA'nın analiz edilmesiyle elde edilirler. Yaygın olarak kullanılanları; izoenzimler, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi) ve PCR (Polimeraz Chain Reaction)'a dayalı geliştirilmiş çok sayıda RAPD (Random Amplified Polymorfik DNA; rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorfizm), DAF (DNA Amplification Fingerprinting) v.d.gibi moleküler markörlerdir (Staub ve ark. 1996).

Izoenzimler; moleküler yapısı fark göstermesine karşın aynı işlevi üslenmiş olan enzimlerdir. Izoenzim analizleri, DNA markörlerine nazaran daha kolay ve ucuzdur. Ancak açınım gösteren lokus sayısının izoenzimlerde kısıtlı olması araştırmacıları RFLP ve RAPD tekniklerine yönlendirmiştir (Üstün ve ark. 1996).

RFLP; DNA'nın yaklaşık her yüz baz çiftindeki nükleotid dizisi bireylerde değişiklik gösterir (DNA polimorfizmi). Sonuç olarak, DNA üzerinde bulunan bir restriksiyon enzimi tanıma dizini, diğerinde bulunmayabilir. Bu durumda, restriksiyon fragman büyüklükleri bu bölge için farklıdır (Lüleci ve ark. 2000). Bu özellikten yararlanılarak farklı veya aynı tür içerisindeki bitkilerde açınım gösteren genotiplere ait DNA'lar teşhis edilmektedir.

Genotipler arasındaki genetik uzaklıkların ve çeşitliliğin belirlenmesinde RFLP tekniği, maliyetinin yüksek olması, yöntemin uzun süre alması RAPD' ye göre daha fazla miktarda DNA' ya ve teknik deneyime gereksinim duyması ve radyoaktif madde kullanımı gibi dezavantajları nedeniyle daha az kullanılmakta olup, yeni bir teknik olan RAPD tekniği bugün en sık kullanılan tekniklerden biri haline gelmiştir (Gallego ve Martinez. 1996).

RAPD tekniği; genomik DNA'nın rastgele seçilmiş primer kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılması ve amplifiye olan DNA bantlarının elektroforez işlemiyle ayrıştırılıp değerlendirilmesi işlemlerini içerir ve elektroforez sonucunda elde edilen bant desenleri çeşitlere özgü olması nedeniyle genotiplerin tanımlanmasında kullanılır.

RAPD metodu ile çeşitli buğday genotiplerinin tanımlanması, genetik farklılıklarının belirlenmesi, agronomik özelliklere sahip türlerin etiketlenmesi ve yanlış sınıflandırılmış germplazm koleksiyonlarının yeniden düzenlenmesi ile ilgili bir çok çalışma yapılmış ve RAPD'nin güvenilir, kısa zamanda uygulanabilen, ekonomik bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Fahima ve ark. 1999, Cao ve ark. 1999, McDonald ve ark. 1997, Çobanoğlu ve ark. 1994).

Bu çalışma çerçevesinde, ekonomik ve beslenme açısından son derece önemli olan durum buğdayları ile, yüksek protein içeriğine sahip *Triticum dicoccoides'* in ve bunların melez döllerinin genetik yapısı RAPD markörleri aracılığı ile analiz edilerek bu konuda yapılacak ıslah çalışmalarına temel veriler elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Fahima ve ark., (1999) RAPD metodu ile İsrail ve Türkiye'deki 11 populasyon içinden seçilen *T. dicoccoides*' in ve buğdayın tetraploid progenitörünün 110 genotipini incelemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan 10 adet primer, 48 tanesi polimorfik ve 11 tanesi de monomorfik 59 adet değerlendirilebilir RAPD bandı ortaya koymuştur. Çalışma sonunda RAPD analizinin Türkiye ve İsrail'deki farklı ekojeolojik bölgelerden sağlanan *T. dicocoides*' in genotiplerinin özelliklerini ve farklılıklarını ortaya çıkarmada başarılı ve etkili olduğu görülmüş ve RAPD ye dayandırılan diskriminant analizleri ile genotiplerin %95,5'inin orijin bölgelerinin doğru olarak sınıflandırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak RAPD'nin türlerin ayrımı, doğru ataların saptanması ve *T. dicoccoides*' in genetik farklılıklarının tanımlanması için kullanışlı olduğu bildirilmiştir.

D'Ovidio ve ark., (1990) çalışmalarında 6 makarnalık buğday varyetesi, 4 tetraploid, 7 diploid *Triticum* ve *Aegilops* alt türlerini materyal olarak kullanmışlar ve bu buğday genotiplerine gama gliadin geninin uç sekansına ait 19 ve 20 baz uzunluğundaki 2 oligonükleotidi primer olarak kullanarak PCR işlemini gerçekleştirmişlerdir. PCR ürünlerinin elektroforetik analizleri sonucu araştırılan genotipler arasındaki ve içindeki spesifik genetik polimorfizmi ortaya çıkaran 750-1000 kb'lık bantlar elde etmişlerdir. Düşük mobiliteye sahip bir bant sayesinde genotipler başlıca 2 gruba ayrıldığı ve *Aegilops longissima* ve *A. squarrosa*' nın bant deseni ile *Triticum boeoticum* ile *T. urartu*' nun bant desenlerinin benzer bulunduğu bildirilmiştir.

Cao ve ark. (1999) germplazm koleksiyonlarında yanlış sınıflandırılmış varyetelere rastlamışlar, RAPD analizinin yanlış sınıflandırılan bu *Triticum* varyetelerinin yeniden sınıflandırılmasında kullanılıp kullanılmayacağını saptamaya çalışmışlardır. Bu amaçla morfolojik karakterlere dayandırılarak sınıflandırılması yapılmış ancak sınıflandırılmasından şüphe duyulan 12 varyete RAPD ve sitolojik analizler kullanılarak incelenmiştir. RAPD profilleri sonuçlarına göre yapılan istatistiksel hesaplamalarla elde edilen dendrogram; 5 adet *dicoccum*-benzeri, 1 adet *timophevii*-benzeri, 6 adet *monococcum*-benzeri varyeteyi sırasıyla *Triticum dicoccum*, *T. timophevii* ve *T. monococcum* ile gruplamıştır. Bu sonuçlar sitolojik analizlerle de doğrulanmıştır. Çalışmanın sonucunda RAPD analizi germplazmı sınıflandırmak ve *Triticum*' daki bazı türlerin farklılıklarını ortaya koymak için kullanılabilir olduğu bildirilmiştir.

Myburg ve ark., (1997) RAPD analizi ile yeni *D.noxia* afidine dirençli buğday çeşitlerinin geliştirilmesini amaçlayan programlarda kullanılmakta olan beş adet Güney Afrika ve beş adet yabancı afide dirençli (*Diuraphis noxia*) Rus buğday çeşidini incelemişlerdir. Yirmi dokuz oligonükleotid primer kullanılarak çeşitlerin farklılığını ortaya koyan RAPD band profili çıkarılmaya çalışılmış ve sonuç olarak yapılan istatistiksel hesaplamalar kullanılan çeşitlerin bilinen genetik ilişkileri ve pedigrileri ile uyumlu olan bir dendrogram elde edildiği bildirilmiştir.

McDonald ve ark., (1997) RAPD nin tohum üretimi, tohum test programları gibi biyoteknolojik araştırmalarda genetik farklılıkların belirlenmesinde kullanışlı bir metod olduğunu belirtmişler, mısır (*Zea mays*), pamuk (*Gossypium hirsutum*), soya fasülyesi (*Glycine max*), buğday (*Triticum aestivum*), kırmızı yonca (*Trifolium pratense*) kuru tohumlarında DNA izolasyonu ve hemen ardından RAPD amplifikasyonu yöntemlerinin prosedürlerini belirlemişlerdir. Ancak başarıyla DNA izolasyonunu yaptıkları yerfıstığından başarılı bir RAPD amplifikasyonu gerçekleştirmemişlerdir. Çalışmanın sonucunda RAPD tekniğinin ucuz, basit, hızlı, büyümekte olan bitki dokusuna gereksinimi olmayan ve çok sayıda tahıla uygulanabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Castagna ve ark., (1997) Ermenistan, Lübnan, İnan, Irak ve Türkiye'den sağlanan 49 *Triticum urartu* varyetesinin RFLP ve RAPD markör analizleri ile genetik çeşitliliğini araştırmışlar ve bu iki veri setini karşılaştırmışlardır. Yirmi sekiz RFLP klonu ve 29 RAPD primeri sırasıyla 451 ve 155 polimorfik bant vermişlerdir. Ermenistan' dan örneklenen 3 genotip coğrafik farklılık az olmasına rağmen diğer genotiplerden farklı bir grup oluşturmuştur. Araştırma sonucunda türüi ilişkilerin gösterilmesinde RFLP markörleri RAPD markörleri ile elde edilen değerler ve genetik benzerlik değerleri birbirlerine benzer olarak bulunmuş, türlerarası kıyaslamalarda ise benzer olmadığı bildirilmiştir. Poliploid buğdaylar ile daha yakın ilişkileri bulunan genotip identifikasyonunun mümkün olmadığı gözlenmiştir.

Farooq ve ark., (1994) yaptıkları çalışmada geniş çaprazlamalar sonucu elde edilmiş 10 tuza dayanıklı buğday introgresiyon hatlarının, 2 ekmeçlik buğday kültürvarı, 1 durum buğday kültürvarı ve buğday introgesiyon hatlarında tuza dayanıklılık kaynağı olarak kullanılan *Aegilops cylindrica*' nın PCR tekniği kullanılarak polimorfizm değerlerini incelemişlerdir. Amplifikasyon değerlerine dayanılarak, (A) bütün buğday hatları ile reaksiyon veren primerler, (B) hiçbiri ile reaksiyon vermeyenler, (C) oğu buğday hattıyla reaksiyon veren primerler, (D) bazı buğday hatlarıyla reaksiyon veren primerler, olarak kullanılan primerler 4 kategoriye ayrılmıştır. Kullanılan 18 reaktif primerden 11 tanesi bütün test materyallerinde polimorfizmi belirlemiştir. Sonuç olarak araştırmacılar polimorfizm değerlerini %1.2 den 22 ye değerşen değerlerde düşük olarak belirlemiş ve tuza toleranslı hatlardan 6 tanesi verdikleri polimorfik bantlara dayandırılarak identifiye edilmiştir.

Barriga ve ark., (1994) yaptıkları çalışmada genetik markör olarak kullanılan RAPD metodunu 3 buğday varyetesinde uygulayarak, DNA, Mg⁺², polimeraz konsantrasyonu ve uzama ve polimerizasyon zamanı gibi koşulların RAPD bant oluşumunu etkilediğini bildirmişler, bu koşulları optimize ederek protokol geliştirmişlerdir.

Bahraei, (1996) Türkiye, Irak ve Lübnan' daki 6 populyasyondan 44 *Triticum boeoticum* diploid genotipi ve Türkiye'deki 4 populyasyondan 40 *T.urartu* diploid genotipinin RAPD markırları kullanarak genetik farklılığını belirlemiştir. Polimorfizmi belirlemede 20 primer kullanılmıştır, OPA-02 ve OPA-15 primerleri her iki türün farklı populyasyonları içindeki ve

arasındaki varyasyonu belirlemişlerdir ve *T. boeoticum* popülasyonu içindeki polimorfizm yüksek bulunmuştur. Nei'nin genetik uzaklık hesabı sonucunda *T. urartu*'nun *T. boeoticum* popülasyonundan daha fazla benzerlik gösterdiği görülmüştür. Çevre koşulları veya coğrafik lokasyon ile genetik farklılık arasında korelasyon bulunamamıştır.

Liu ve ark., (1999) RAPD analizi ile 20 buğday (*Triticum aestivum*) hattını incelemişlerdir. Çalışmada 10 nükleotid uzunluğundaki 6 primer kullanılmışlar ve 54 fragment elde etmişler ve farklı karakterdeki ebeveynlerin ve bu ebeveynlerden elde edilen hibridlerin veriminin tahmin edilmesinde potansiyel güçleri araştırılmıştır. Deney sonuçları 20 buğday hattını 4 gruba bölmüştür. Grup I başaktaki tane sayısının fazlalığı ile, Grup II ağır tane ile, Grup III kısa sap ve birim alandaki başak sayısının fazlalığı ile, Grup IV Grup III'e benzemesi rağmen daha fazla ürün verme ile karakterize edilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak, RAPD markörlerine dayalı olarak, değişik performanslı buğday hatlarının ayırtedilmesi ve yeni üstün melezlerin eldesinde ön tahmin değeri olan ebeveynlerin sınıflandırılmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Malkawi ve ark., (1998) *Triticum durum* ve *T. diccocooides* türlerinden 10 ar örneğin aralarındaki genetik farklılık ve polimorfizm değerlerini RAPD analizi ile belirlemeye çalışmışlardır. Her iki türün yapraklarından DNA izolasyonu yapılmış ve 10 nükleotid uzunluğundaki 23 primer RAPD analizinde kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda 8 primerin her iki tür içinde ve arasında yüksek polimorfizmi belirleyen fragmentler verdiği belirtilmiştir.

Anwar ve ark., (1998) çalışmalarında türlerin ve yerel çeşitlerin doğru, güvenilir, hızlı ve ucuz maliyetle birbirinden ayırt edilmesi ve tanımlanmasının bitki ıslahı açısından, özellikle teorik ve uygulamalı bitki araştırmaları açısından çok önemli olduğunu bildirmişler, Pakistan'ın farklı zirai-ekolojik bölgelerinden kökenlenmiş 30 buğday varyetesinin RAPD genetik markörü yardımıyla genetik farklılıklarını belirlemeye çalışmışlardır. Sonuç olarak elde edilen 35 bant üzerinde yapılan istatistiksel çalışmalar, aynı bölgeden elde edilen varyetelerin özel bir grupta toplanmadığını ve bu varyeteler arasındaki farklılıkların varyetelerin orijinlendiği bölgeye bağlı olmadığını bildirmişlerdir.

Ülkemizde de RAPD metodu birçok araştırmada kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler markörler yardımıyla bitki ve hayvan genotiplerinin tanımlanmaları, farklı primerler ile genler arasındaki ilişkilerin saptanmaları ve bu sayede de ıslah sürelerinin kısaltılması, daha verimli ve kaliteli, hastalık, zararlılara ve ekstrem şartlara dayanıklı yeni genotiplerin elde edilmeleri çalışmaları başlamıştır.

Albayrak ve ark., (1999) Türkiye' den orijinlenen yabancı arpa hatlarının aralarındaki varyasyon miktarlarını RAPD tekniğini kullanarak, 23 hat arasındaki polimorfizm oranını istatistiksel olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar belirlenen sonuçların ileride ticari önemi olan özellikleri içeren yabancı arpa hatlarının seçiminde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Çobanoğlu ve ark., (1994) yaptıkları araştırmada Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Gen Bankası'nda uzun süreden beri muhafazası yapılan ve Türkiye kökenli *Hordeum murinum*, *H. bulbosum* ve *H. vulgare spontaneum*'a ait 23 yabancı arpa hattı ile Zafer-160 varyetesi (kontrol varyetesi olarak seçilerek) arasındaki çeşitlilik moleküler düzeyde araştırılmış, materyallerin DNA tanısı ve polimorfizm oranı hesaplanmıştır. Çalışmada 20 nükleotid uzunluğundaki OPA-01 primeri kullanılarak RAPD işlemi sonucu elde edilen amplifikasyon bölgelerinin değerlendirilmesi ile genomik farklılıklar ortaya konularak, polimorfizm oranı hesaplanmıştır. Sonuç olarak RAPD metodunun hızlı, güvenilir, kullanışlı ve ekonomik bir metod olduğu ifade edilmiştir.

Gözükırmızı ve ark., (1995) kışlık altı sıralı arpada (zafer çeşidi) doku kültürü ortamında ortaya çıkan kromozom varyasyonlarını incelemişler ve gen mutasyonlarının RAPD metodu ile araştırılabileceğini göstermişlerdir. Çalışmalarında 10-20 baz dizilişli primerler kullanmışlardır. Ayrıca RAPD metodu yardımı ile yurdumuz orijinli yabancı arpa hatlarının polimorfizmini saptamışlar RAPD markörleri ile çinko mukavemeti arasındaki interaksiyon ve üstün genotiplerin erken dönemde seleksiyonu çalışmalarını sürdürdüklerini belirtmişlerdir.

Albayrak ve ark., (1995) 10 baz dizilişli 2 primer (OPC-09 ve OPC-02) ile ökaryotik organizmalardan 3 farklı türe ait 5 örneğin (*Schizosaccaromyces pombe* 972 h yabancı maya tipi, Zafer arpa çeşidi, 50400 kayıt numaralı yabancı arpa hattı, Eser ve Canitez nohut varyeteleri) RAPD yöntemi ile DNA parmak izlerini elde etmişlerdir. OPC-09 primeri canitez isimli nohut varyetesi hariç diğer tüm organizmalarda bant verirken, OPC-02 primeri sadece Eser isimli nohut varyetesinde bant verdiğini gözlemişlerdir.

Arı ve ark., (1994) RAPD işlemi için Kaya, Quatum, Tokak, Yerçil ve Cumhuriyet kültür varyeteleri ile yabancı bir arpa hattı (X populasyonu) ve bunların melezlerine ait F₁ tohumlarını materyal olarak seçmişler ve 10 bazlık 20 primer kullanmışlardır. Araştırmanın sonucunda, OPC-06, OPC-09, OPC-15, OPC-16 ve OPC-19 primerlerinin bazı ebeveyn ve F₁ generasyonunda polimorfik bantlar verdiğini, RAPD markörlerinin kısa zamanda uygulanabilen, hızlı ve ucuz bir metod olarak melezlemelerin doğruluğunun saptanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Demir ve ark., (1999) 10 makarnalık buğday çeşidinin, 10 arpa çeşidinin, 10 hibrid ayçiçeğinin ve 10 Japon bıldırcının RAPD metodu ile genetik benzerlik ve farklılıklarını çalışılmış, genotipler arasındaki genetik uzaklıkların belirlenmesinin, ıslah programlarının başarısını arttırmada rol oynayacağı bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışmanın materyalini oluşturan genotiplerden; melezlerde ebeveyn olarak kullanılan buğday çeşitleri Ege-88 ve Gediz-75, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilip tescil ettirilmiş iki makarnalık çeşittir. Diğer ticari çeşit ise Meksika'da bulunan Uluslararası Mısır ve Buğday Araştırma Merkezi (CIMMYT)' den sağlanan Yavaros genotipidir. Ortak ebeveyn olarak melezlerde yer alan yabancı tetraploid buğday (*T.dicoccoides* Korn.) Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesindeki Gen Bankasından temin edilmiş ve 1995 yılında, sözü edilen üç ticari makarnalık buğday çeşidi ile ayrı ayrı melezlenmiştir. Dördüncü döl nesli (F₄) çalışmaya materyal olarak dahil edilmiştir.

Çizelge 3.1.1. Materyal olarak kullanılan buğday çeşitleri

Sıra No	Buğday Çeşitleri
1	Ege-88 (Ebeveyn)
2	Yavaros (Ebeveyn)
3	Gediz-75 (Ebeveyn)
4	Ege-88 X <i>T.dicoccoides</i> (F ₄ Nesil)
5	Yavaros X <i>T.dicoccoides</i> (F ₄ Nesil)
6	Gediz-75 X <i>T.dicoccoides</i> (F ₄ Nesil)
7	<i>T.dicoccoides</i> (Ebeveyn)

3.2. Metod:

3.2.1. Buğdayların Yetiştirilmesi

Ebeveynlerden *T.dicoccoides* sera koşullarında Mitscherlich saksılarında, diğer örnekler ise 1999-2000 yılı deneme planına göre tarla koşullarında yetiştirme tekniğine uygun önlemler alınarak yetiştirilmişlerdir.

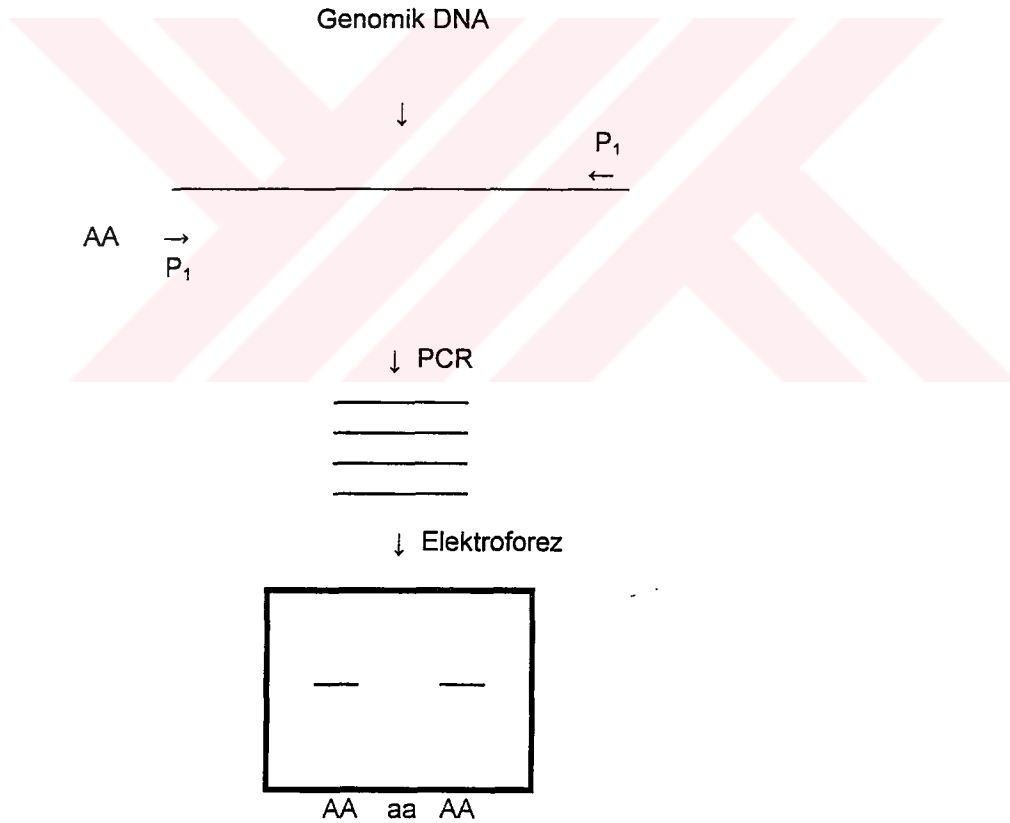
3.2.2. DNA Analizi

Çalışmada DNA analizi için RAPD metodu kullanılmıştır.

RAPD, polimorfizm gösteren DNA'ların rastgele seçilmiş anti sense primerler kullanılarak çoğaltılması işlemini içerir. Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) bağlı olarak 1990 yılında geliştirilmiştir (Williams ve ark. 1990).

RAPD metodunun uygulanmasında aşağıdaki aşamalar takip edilir; (Şekil 3.2.2.1)

- 1- İncelenecek materyalin DNA'sının izolasyonu.
- 2- PCR yöntemi ile rastgele primerler kullanılarak örnek DNA'nın çoğaltılması (amplifikasyon).
- 3- Amplifiye edilmiş DNA'ların agaroz jel elektroforezinde koşturulması.
- 4- Oluşan bantların gözlenebilmesi için DNA'nın Ethidium Bromide ile boyanarak U.V. ışık altında fotoğraflarının çekilmesi.



Şekil 3.2.2.1 RAPD metodu şematik gösterimi (Staub, 1996)

3.2.2.1 DNA Analizinde Kullanılan Çözeltiler

DNA izolasyon tamponu (Doyle and Doyle)

Tris HCL, pH: 8.0	100Mm
EDTA	20Mm
NaCl	1,4M
CTAB	%2
Na ₂ S ₂ O ₅	%1
β-mercaptoethanol	% 0.2

CIA

Kloroform : Isoamilalkol (24:1)

Yıkama solüsyonu

Ethanol (%70'lik)	90 ml
H ₂ O	10 ml
Amonyum asetat (10M)	100 µl

TE tamponu

Tris	10 mM, pH: 8,0
EDTA	1mM, pH: 8,0

50XTAE

242 gr Tris base
57,1 ml Glisialasetikasit
100 ml 0.5 M EDTA, pH: 8,0
1 lt H₂O'da çözündürülür

Markör boya

%100 Glycerol	7 ml
50XTAE	200 µl
%20 SDS	100 µl
0,5M EDTA	400 µl
H ₂ O	2,3 ml
Bromfenolblue	2,5 mg

Ethidium Bromide

10 mg Ethidium Bromide
1 ml H₂O'da çözündürülür

3.2.2.2. DNA Analizinde Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları

Çalışma Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü bünyesinde bulunan Uygulamalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Kullanılan laboratuvar ekipmanları;

Thermocycler	Appligene oncor, Crocodile III
Agaroz jel elektroforezi	FisherBiotech Electrophoresis Systems, FB-LSU-1
PH-metre	WTW Ph Meter, PH 520
Santrifüjler	Herolab MicroGen 13 D Nüve NF 815
U.V. lamba	Hoefler Mighty Bright
Spektrofotometre	Varian 100

3.2.2.3. DNA'ların Elde Edilmesi

DNA'nın izolasyonu; hücre duvarının parçalanması ve DNA-protein kompleksinin çözülmesi aşamalarından meydana gelir.

DNA' nın elde edilmesinde Doyle ve Doyle (1990)'da belirtilen yöntem kullanılmıştır.

On-onbeş cm uzunluğundaki buğday genç fidelerinden, her bir çeşitten toplam 2 gr olacak şekilde toplanan taze yapraklar, meydana gelebilecek herhangi bir degradasyonu önlemek için alimünyum folyoya sarılarak, sıvı azot içinde laboratuvara getirilmiştir.

İlk aşama hücre zarının mekaniksel ve fiziksel olarak parçalanması işlemi içerir bu nedenle yapraklar, içerisine sıvı azot konmuş havanda ezilerek toz haline getirilmiştir ve önceden 60°C'deki su banyosuna yerleştirilmiş 6,5ml DNA izolasyon tamponu içeren 15ml'lik falcon tüplere konarak, tüpler tekrar su banyosuna yerleştirilmiştir. Bu işlem sürerken tüpler 10 dakikada bir yavaşça çalkalanmıştır. Son tüpte su banyosuna yerleştirildikten sonra, tüpler su banyosunda 20 dk bekletilmiştir. Bu aşamada hücre duvarının sıvı azotla dondurup-çözme işlemi yapılarak fiziksel, DNA izolasyon tamponunda bulunan EDTA, NaCl, CTAB gibi kimyasal maddelerle de kimyasal olarak zayıflatılıp parçalanması amaçlanmaktadır.

İkinci aşamada tüplere 6,5ml CIA (kloroformizoamilalkol) eklenerek, tüpler 5 dk. hafifçe çalkalandıktan sonra 3000 rpm' de 20 dk. santrifüjlenmiştir. Amaç CTAB-protein/polisakkarid komplekslerini uzaklaştırmasıdır. Bu işlemlerden sonra tüplerde, en üstte süpernatantta çözülmüş halde DNA, ortada hücrel proteinlerden oluşan beyaz katman ve en altta kloroform olmak üzere üç katman gözlenmiştir.

Üçüncü aşama olarak en üstteki DNA içeren süpernatant başka boş falcon tüplere aktarılmış, bu yeni tüpe, aktarılan süpernatant kadar soğuk isopropanol eklenmiştir. İsoopropanol eklendikten sonra tüpler çok hafif bir şekilde ters yüz edilmiştir. İsoopropanol DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrılmasını sağlar.

Dördüncü aşama olarak gözle görülür hale gelen DNA'lar steril bir cam çubukla dikkatli bir şekilde alınarak, kağıt havlu üzerinde 10 dakika kurumaya bırakılmıştır.

Beşinci aşamada DNA'lar havlu üzerinden içerisine 1000 µl. yıkama solüsyonu bulunan eppendorf tüplere aktarılmıştır, burada kısa bir süre yıkandıktan sonra yıkama solüsyonu hemen dökülmüş ependroft tüplerin ağzı açık şekilde DNA'lar oda sıcaklığında kısa bir süre (2 dakika) kurumaya bırakılmıştır.

Son aşama olarak kuruyan DNA'ların üzerine 500 µl TE tamponu konup tüpe parmakla yavaş yavaş vurularak çökelti süspansiyon haline getirilmiştir. DNA'lar TE tamponu içinde çözüldükten sonra -20° C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.2.4. DNA Konsantrasyon Tayini

Örneklerdeki DNA miktarını tayin etmek için spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarlarının ölçüsüdür. Buna göre, DNA'nın miktarı ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilecek değerlerden belirlenebilir. 1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml, tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. 260 ve 280nm'lerdeki ölçüm değerlerinin birbirine oranı (OD_{260}/OD_{280}) nükleik asidin saflığı hakkında bir tahmin yapmamıza olanak verir. Saf DNA ve RNA örneklerinin OD_{260}/OD_{280} oranları sırasıyla 1.8 ve 2.0'dir. Eğer protein ya da fenol kontaminasyonu varsa, OD_{260}/OD_{280} oranı yukarıdaki değerlerden çok daha az, buna karşılık RNA kontaminasyonu varsa, OD_{260}/OD_{280} oranı bu değerlerden daha yüksek olacaktır(Olgun ve Topal. 1999).

İzole edilen çift iplikli DNA'nın, miktarının belirlenmesinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260\text{nm'deki OD} \times \text{sulandırma oranı} \times \text{katsayısı (50)}$$

Çizelge 3.2.2.4. Çeşitlerden elde edilen DNA'ların OD ölçüm sonuçları ve miktarları

Buğday Çeşitleri	260nm	280nm	Oran	Total DNA ($\mu\text{g/ml}$)
Ege-88	0,7948	0,3976	1,9992	3974
Yavaros	0,6146	0,3000	2,0488	3073
Gediz-75	0,9878	0,4934	2,0021	4938
Ege-88 X <i>T.dicoccoides</i>	0,6536	0,3201	2,0414	3267
Yavaros X <i>T.dicoccoides</i>	1,1942	0,5928	2,0144	5970
Gediz-75 X <i>T.dicoccoides</i>	0,9446	0,4654	2,0297	4722
<i>T.dicoccoides</i>	0,4795	0,2263	2,1185	2397

3.2.2.5. DNA ların Seyreltilmesi

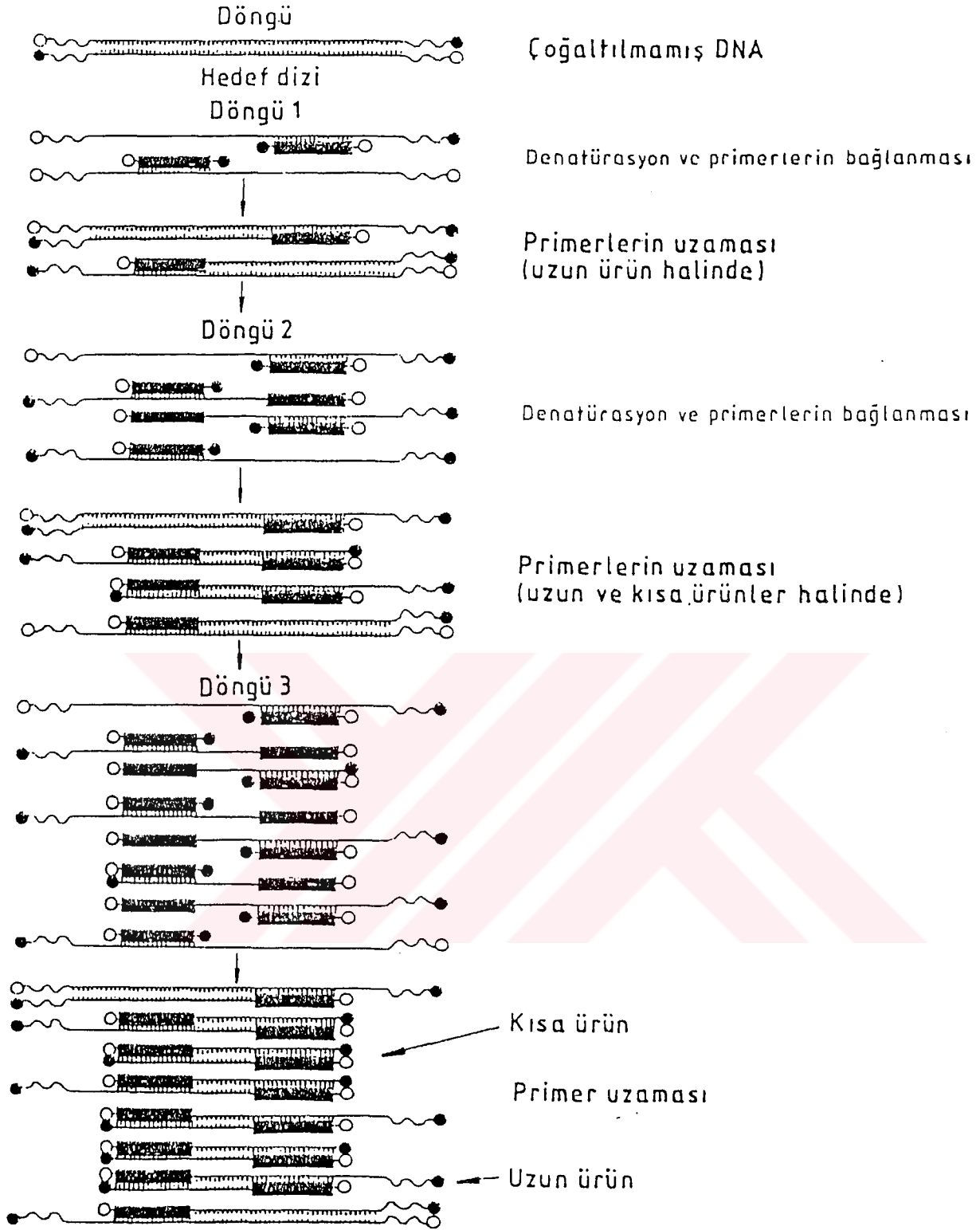
OD sonuçlarından hesaplanan DNA miktarlarına göre PCR analizi için μl 'de 5ng olacak şekilde DNA'lar seyreltilmiştir.

3.2.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

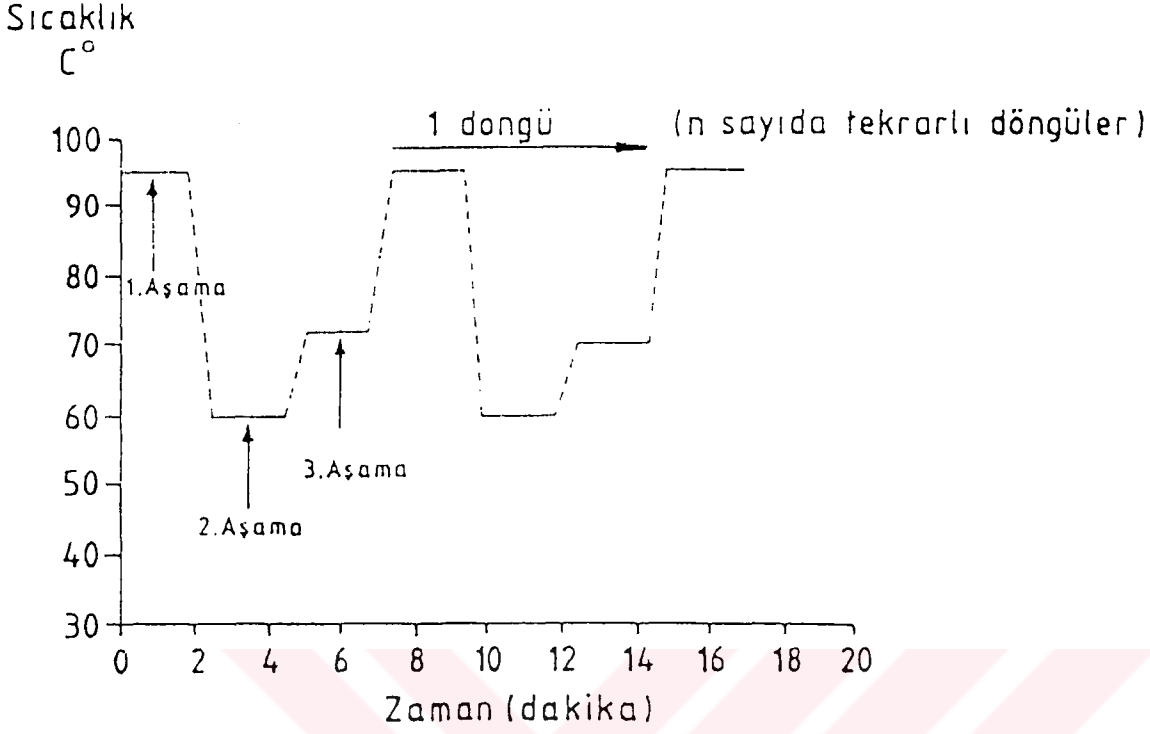
PCR; bir DNA molekülünde hedef dizlere oligonükleotid primerlerinin bağlanması ve DNA'nın polimerizasyonu esasına dayanır. Cetus firması araştırmacı Kary MULLIS tarafından 1980'li yılların ortalarında bulunmasının ardından, Saiki ve ark.'larınca 1985'te PCR tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntem ile, bir DNA fragmanı tek bir orjinal kopyadan milyonlarca kez çoğaltılabilir. PCR'nin temel basamakları şunlardır; (Şekil 3.2.2.6.1)

- 1- Kalıp DNA molekülünün çift sarmalının ayrılması için ısı ile denaturasyonu,
- 2- Oligonükleotid primer çiftinin tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle bağlanması (annealing),
- 3- DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz veya benzerleri), uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzaması ile kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezlenmesi (extension).

Bu belirtilen üç aşama tekrar tekrar uygulanır. Ard arda uygulanan üç aşama bir döngüyü oluşturur. Her döngü sonucu DNA fragmenti miktarı üssel olarak artar. (Şekil 3.2.2.6.2)



Şekil 3.2.2.6.1. PCR çoğaltım döngüleri (AR1, 1999)



Şekil 3.2.2.6.2. PCR sıcaklık döngüleri (Arı, 1999)

Denatürasyonda amplifiye edilecek DNA'nın iki iplikçığı arasındaki hidrojen bağları 94°C'de birbirinden ayrılır. Bu aşamayı annealing adı verilen primerlerin komplementer oldukları bölgeye bağlandıkları aşama izler. Primerler 10-40 nükleotidlik kısa DNA parçalarıdır ve isteğe göre uygun diziler şeklinde sentez edilebilmektedir. Annealing aşaması 35-70°C arasında değişebilen sıcaklıklarda yapılabilir. Son aşama 72-78°C arasında Taq polimerazın primerlerin 3' uçlarına deoksiribonükleotidleri ekleyerek yeni komplementer kolların sentezlendiği extension aşamasıdır. Her döngüde, önceki döngü sonrası oluşmuş tüm DNA' lar kalıp olarak iş görür. Bu şekilde her döngüde DNA iki katına çıkar. Teorik olarak PCR ile DNA'nın çoğaltılması 2^n formülüne göre olur ve otomasyon ile, 30 devri birkaç saatte tamamlamak ve çok fazla miktarda kopya üretmek mümkündür.

PCR işleminde DNA'lar, taq polimeraz, primer ve dNTP karışımı sürekli buz içinde tutulmuştur. Böylece olabilecek herhangi bir degradasyon önlenmeye çalışılmıştır. Pipetleme sırasında steril eldiven kullanılmıştır, aksi takdirde vücutsal enzimler (örneğin nükleazlar) template DNA'ya bulaşabilir veya mikrobiyal kontaminasyon olabilir. Lateks eldivenler mümkün olduğunca sık değiştirilmiş ve çalışmalardan hemen önce kutularından alınmışlardır. Kullanılacak pipet uçları, bidestile su, gerekli cam malzemeler çalışmalardan önce otoklavlanmıştır.

Her bir tüpte toplam hacim 15µl olacak şekilde; 25ng genomik DNA, her bir dNTP'den 100µM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)(Boeh M), 15ng primer (Operon Technologies, Alameda, ABD), 1XTaq DNA polimeraz tamponu (100mM Tris-HCL, PH 8.3, 500mM KCL, 15mM MgCl₂ ve% 0.01 jelatin),1ünite Taq DNA polimeraz enzimi (Sigma) ile PCR işlemine geçilmiştir.

Çizelge 3.2.2.6.1. PCR reaksiyonu için gerekli kimyasallar ve miktarları

Maddeler	Miktarları
Örneklere ait DNA	5 µl
Buffer(MgCl ₂ içeren)	1,5 µl
dNTP karışımı	1,2 µl
Primer	1 µl
H ₂ O	7,1 µl
Taq DNA polimeraz enzimi	0,2 µl
Toplam hacim	14 µl

PCR işlemi için 10 baz çifti uzunluğunda Operon Teknolojisi'ne (Alameda, ABD) ait 20 farklı primer kullanılmıştır (Çizelge 3.2.2.6.2.). Derin dondurucuda saklanan primerler, kullanılmadan önce 15-20 dakika bekletilerek çözülmeleri beklenmiştir.

Pipetleme işleminden sonra tüpler mikrosantifüjde 30 sn'ye santrifüjlenmiştir.

Ardından tüpler, polimeraz enziminin aktive kaybına uğramasını engellemek için zaman kaybetmeden termocycler'ın reaksiyon yuvalarına yerleştirilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu esnasındaki sıcaklık uygulamaları ve süreleri çizelge 3.2.2.6.3.'de belirtilen program uyarınca gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2.2.6.2. PCR İşleminde kullanılan primerler ve baz dizilişleri

Primerin ismi	Baz dizilişi
OPA-02	5' TGCCGAGCTG 3'
OPA-04	5' AATCGGGCTG 3'
OPA-06	5' GGTCCCTGAC 3'
OPA-07	5' GAAACGGGTG 3'
OPA-08	5' GTGACGTAGG 3'
OPA-09	5' GGGTAACGCC 3'
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'
OPB-01	5' GTTTCGCTCC 3'
OPB-03	5' CATCCCCCTG 3'
OPB-04	5' GGA CTGGAGT 3'
OPB-05	5' TGCGCCCTTC 3'
OPB-06	5' TGCTCTGCCC 3'
OPC-15	5' GACGATCCAG 3'
OPQ-02	5' TCTGTGGGTC 3'
OPQ-11	5' TCTCCGCAAC 3'
OPR-04	5' CCCGTAGCAC 3'
OPR-05	5' GACCTAGTGG 3'
OPR-06	5' GTCTACGGCA 3'
OPR-07	5' ACTGGCCTGA 3'
OPT-16	5' GGTGAACGCT 3'

Çizelge 3.2.2.6.3. Uygulanan PCR amplifikasyon programı

1. 94°C	30 saniye	} 35 Döngü
2. 94°C	25 saniye	
3. 35°C	45 saniye	
4. 72°C	1 dakika	
5. 72°C	5 dakika	
6. 4°C	∞	

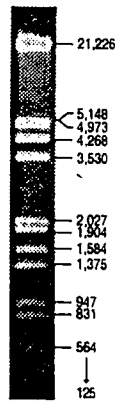
3.2.2.7. Agaroz Jel Elektrofrez

PCR işleminde amplifiye olmuş DNA'lar agaroz jel elektrofrezinde koşturulmuşlardır.

Elektrofrez tekniği bir elektriksel alanda, çözülmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızda hareket (göç) etmeleri prensibine dayanır.

DNA molekülleri yapısında bulunan fosfat grubu nedeniyle negatif elektrik yüklüdürler ve bir elektriksel alanda bulduklarında, pozitif kutuba doğru hareket ederler. Agaroz jel elektrofrezinde mekaniksel etkiyi engellemek amacıyla bir kırmızı alg türü olan *Agar Agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarit kullanılır. Agaroz sıcak TAE içinde çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur

Uygulanan elektrofrez işleminde %1,5'lik agarose jel hazırlanmıştır. Elektrot tampon çözeltisi olarak 50XTAE stok solüsyonu kullanılmıştır. Jel için 500' ml lik erlenmayere 3.75gr. agaroz tartılarak ve üzerine 250 ml 1XTAE tamponu ilave edilmiştir. Buharlaşmayla oluşacak sıvı kaybını önlemek amacıyla erlenmayerin ağzı peçeteye kapatılarak, agaroz çözeltisi mikrodalga fırında iki dakika ısıtılmıştır. Erlenmayerin ısısı el yakmayacak sıcaklığa düştükten sonra agaroz çözeltisi jel kabına yavaşça ve içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde yavaşça dökülmüştür. Ardından elektrofrez işleminde örneklerin yükleneceği cepleri oluşturulması için tarak yerleştirilmiş ve jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak çıkartılmıştır. Elektrofrez işlemine geçilmesi için elektrofrez kabına hazırlanan agaroz jel yerleştirilmiş, kap elektrot tampon çözeltisi olarak kullanılacak 50XTAE ile doldurulmuştur. DNA'ların jelde ilerlemesini gözleyebilmek için DNA'lara 2 µl markör boya (bromfenol blue) ilave edilmiş ve DNA örnekleri ceplere yüklenmiştir. DNA bantlarının büyüklüğünü bilmek amacıyla moleküler cetvel olarak kullanılan standart markör λDNA Hind III / Eco RI 'den 3 µl alınarak jelin ilk cebine yükleme yapıldıktan sonra, elektrofrez işlemi 100 V'da markör boya jelin son 0,5 cm.sine gelinceye kadar sürdürülmüştür.



Şekil 3.2.2.7.1. λDNA Hind III / Eco R I

3.2.2.8. Ethidium Bromide ile Boyama

Elektroforez işleminden sonra agaroz jelde DNA'nın görünür hale getirilip değerlendirilmesi için jel, U.V. ışık altında fluoresans özelliği gösteren ethidium bromide ile boyanmıştır. Bu boya DNA'nın bazları arasına interkalasyon yapabilen düzlemsel yapılı halkasal bir grup içerir ve DNA tarafından toplanan 254nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı, boya moleküllerine aktarır. DNA'ya bağlı boyanın kendisi de, 302 ile 366nm arasındaki ışınları absorplar. Çevreye yayılan enerji, görünür ışık bölgesindeki (590nm dalga boyunda) kırmızı-turuncu ışıktır. Ethidium bromide stok çözeltisi konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış, jel 10µl/ml Ethidium bromür içeren su içinde 30 dakika boyunca çalkalanmıştır, ardından fazla boyayı uzaklaştırmak için jel 15 dakika saf suda yıkanmıştır.

3.2.2.9. Fotoğraf Çekimi

Son olarak, jelde oluşan bantlar U.V. ışık altında gözlenmiş ve polaroid 667 film kullanılan fotoğraf makinasıyla jelin fotoğrafı çekilmiştir

3.2.2.10. Bantların Değerlendirilmesi

Bantlardan çeşitler arasındaki, genetik yakınlığın ve polimorfizm, monomorfizm oranlarının hesaplanmasında yararlanılmıştır.

UV ışık altında incelenen jelde çeşitlerin bant desenlerine bakılarak, bantların olup olmamasına göre, (olanların var "1"; olmayanların yok "0" olarak) veri haline getirilen bantlar Jump istatistik bilgisayar programı ile değerlendirilerek, çeşitlere ait dendogramlar elde edilmiştir.

Çeşitler arasındaki polimorfizm ve monomorfizm oranları Nei ve Li (1979)'a göre aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır.

$$F=2 M_{xy}/M_x+M_y$$

F: benzerlik oranı

M_{xy} : İki çeşit arasındaki ortak bant sayısı

M_x : Birinci çeşidin toplam bant sayısı

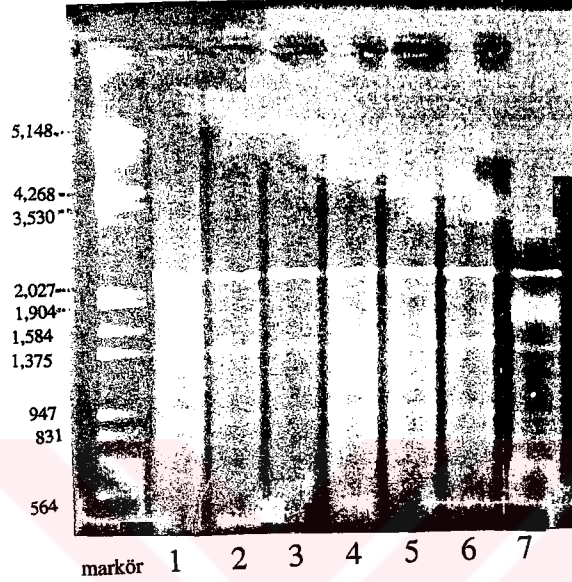
M_y : İkinci çeşidin toplam bant sayısı

1-F: Polimorfizm oranı

4. BULGULAR

Araştırmada 10 baz uzunluğunda 20 farklı primer kullanılmış bunlardan 6 primerde bantlar değerlendirilebilir olarak gözlenmiştir.

OPA-02 primeri kullanılarak ortaya çıkan RAPD sonuçları Şekil 4.1'de görülmektedir.



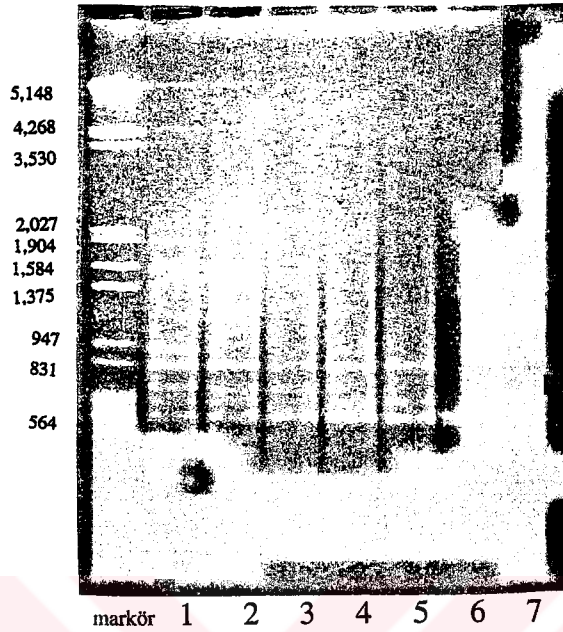
Şekil 4.1. OPA-02 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri S: Standart markör, 1: Ege 88, 2: Yavaros, 3: Gediz 75, 4: Ege 88 X *T. dicoccoides*, 5: Yavaros X *T. dicoccoides*, 6: Gediz 75 X *T. dicoccoides*, 7: *T. dicoccoides*

Çizelge 4.1. Çeşitleri uygulanan OPA-02 primeri ile verdikleri bant sayısı

	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X <i>T. dicoccoides</i>	Yavaros X <i>T. dicoccoides</i>	Gediz 75 X <i>T. dicoccoides</i>	<i>T. dicoccoides</i>
OPA-02	6	5	5	5	5	5	5

OPA-02 primeri ile Ege 88 çeşitinde 6 bant, Yavaros, Gediz 75 eşitlerinde ve Ege 88 X *T. dicoccoides*, Yavaros X *T. dicoccoides*, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezlerinde 5 bant gözlenmiştir. Aynı sayıda bant veren Yavaros, Gediz 75 eşitleri ve Ege 88 X *T. dicoccoides*, Yavaros X *T. dicoccoides*, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezlerinin bant desenlerinin aynı olduğu gözlenmiştir.

OPA-04 primerinin kullanılması ile genotiplerin oluşturduğu bant desenleri Şekil 4.2.'de görülmektedir.



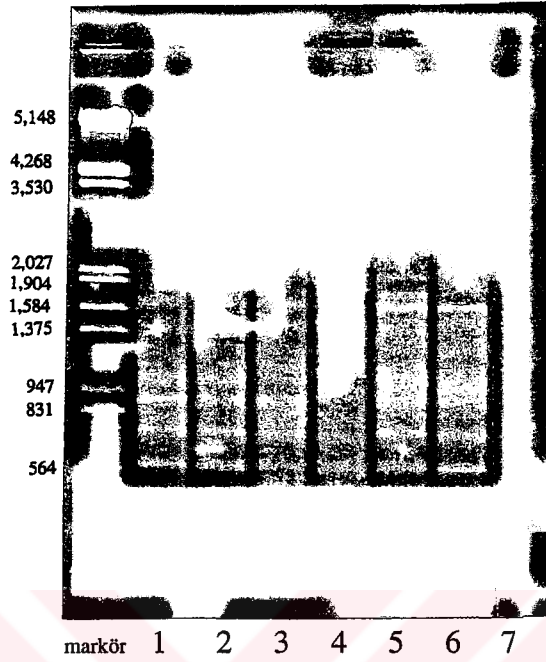
Şekil 4.2. OPA-04 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri S: Standart markör, 1: Ege 88, 2: Yavaros, 3: Gediz 75, 4: Ege 88 X *T. dicoccoides*, 5: Yavaros X *T. dicoccoides*, 6: Gediz 75 X *T. dicoccoides*, 7: *T. dicoccoides*

Çizelge 4.2. Çeşitleri uygulanan OPA-04 primeri ile verdikleri bant sayısı

	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X <i>T. dicoccoides</i>	Yavaros X <i>T. dicoccoides</i>	Gediz 75 X <i>T. dicoccoides</i>	<i>T. dicoccoides</i>
OPA-04	11	6	4	3	3	4	0

Çalışmada kullanılan 6 primerden en fazla sayıda bant deseni veren primer olan OPA-04 primeri ile Ege 88 çeşidinde 11, Yavaros çeşidinde 6, Gediz 75 çeşidi ve Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezinde 4, Ege 88 X *T. dicoccoides*, Yavaros X *T. dicoccoides* melezlerinde 3 bant gözlenmiştir. Aynı sayıda bant veren Ege 88 X *T. dicoccoides*, Yavaros X *T. dicoccoides* melezlerinin bant desenleri de aynı bulunmuştur. Bant sayıları aynı olan diğer çeşit ve melezlerin ise bant desenlerinin birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir.

OPA-06 primerinin kullanılması ile genotiplerin oluşturduğu bant desenleri Şekil 4.3.'de görülmektedir.



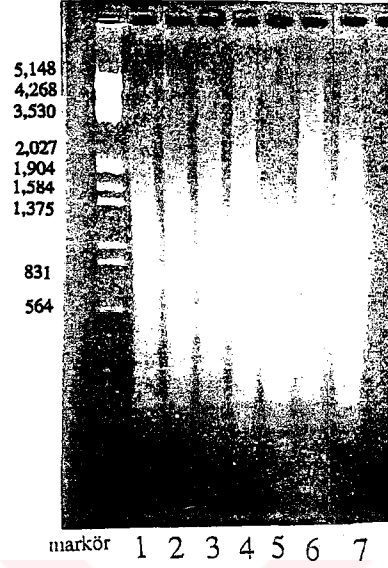
Şekil 4.3. OPA-06 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri S: Standart markör, 1: Ege 88, 2: Yavaros, 3: Gediz 75, 4: Ege 88 X *T. dicoccoides*, 5: Yavaros X *T.dicoccoides*, 6: Gediz 75 X *T. dicoccoides*, 7: *T. dicoccoides*

Çizelge 4.3. Çeşitleri uygulanan OPA-06 primeri ile verdikleri bant sayısı

	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X <i>T.dicoccoides</i>	Yavaros X <i>T.dicoccoides</i>	Gediz 75 X <i>T.dicoccoides</i>	<i>T.dicoccoides</i>
OPA-06	5	6	5	3	7	5	0

OPA-06 primeri ile Yavaros X *T. dicoccoides* melezi 7, Yavaros çeşidi 6, Ege 88, Gediz 75 çeşitleri ve Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezleri 5, Ege 88 X *T. dicoccoides* melezi 3 bant vermiştir. Aynı sayıda bant veren Ege 88 , Gediz 75 çeşitleri, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezleri aynı bant desenleri verirken, diğer çeşit ve melezlerin ise bant desenlerinin birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir.

OPB-03 primerinin kullanılması ile genotiplerin oluşturduğu bant desenleri Şekil 4.4.'de görülmektedir.



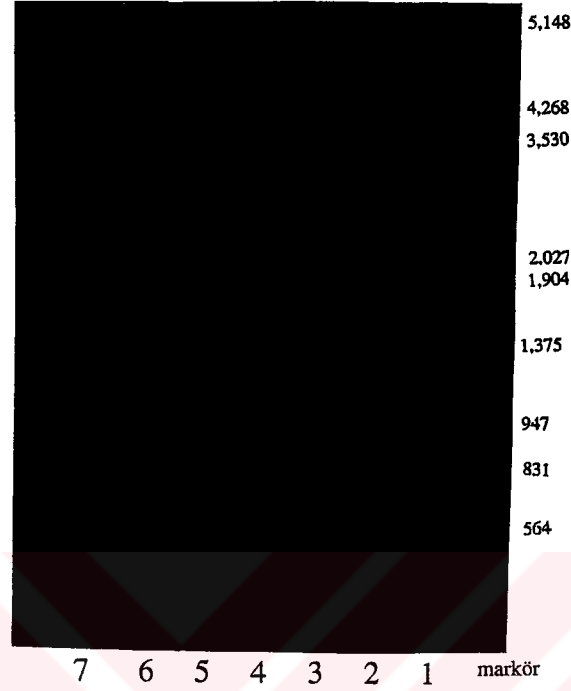
Şekil 4.4. OPB-03 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri S: Standart markör, 1: Ege 88, 2: Yavaros, 3: Gediz 75, 4: Ege 88 X *T. dicoccoides*, 5: Yavaros X *T. dicoccoides*, 6: Gediz 75 X *T. dicoccoides*, 7: *T. dicoccoides*

Çizelge 4.4. Çeşitleri uygulanan OPB-03 primeri ile verdikleri bant sayısı

	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X <i>T. dicoccoides</i>	Yavaros X <i>T. dicoccoides</i>	Gediz 75 X <i>T. dicoccoides</i>	<i>T. dicoccoides</i>
OPB-03	7	7	7	7	9	9	9

OPB-03 primeri ile Yavaros X *T. dicoccoides*, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezleri ve *T. dicoccoides* çeşidi 9, Yavaros, Gediz 75 çeşitleri ve Ege 88 X *T. dicoccoides* melezleri 7 bant vermişlerdir. Aynı sayıda bant veren Yavaros X *T. dicoccoides*, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezleri ile *T. dicoccoides* çeşidinin birbirlerine benzer ve ayrıca Yavaros, Gediz 75 çeşitleri ile Ege 88 X *T. dicoccoides* melezinin de birbirlerine benzer bant desenleri verdikleri, Yavaros X *T. dicoccoides* melezinin ise diğer çeşitlerden farklı bant deseni verdiği gözlenmiştir.

OPB-04 primerinin kullanılması ile genotiplerin oluşturduğu bant desenleri Şekil 4.5.'de görülmektedir.



Şekil 4.5. OPB-04 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri S: Standart markör, 1: Ege 88, 2: Yavaros, 3: Gediz 75, 4: Ege 88 X *T. dicoccoides*, 5: Yavaros X *T. dicoccoides*, 6: Gediz 75 X *T. dicoccoides*, 7: *T. dicoccoides*

Çizelge 4.5. Çeşitleri uygulanan OPB-04 primeri ile verdikleri bant sayısı

	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X <i>T. dicoccoides</i>	Yavaros X <i>T. dicoccoides</i>	Gediz 75 X <i>T. dicoccoides</i>	<i>T. dicoccoides</i>
OPB-04	3	3	6	6	3	6	6

OPB-04 primeri ile Gediz 75 , *T. dicoccoides* çeşitleri ile Ege 88 X *T. dicoccoides*, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezlerinin benzer 6 bant deseni, Ege 88, Yavaros çeşitleri ile Yavaros X *T. dicoccoides* melezinin de benzer 3 bant deseni verdiği gözlenmiştir.

OPB-05 primerinin kullanılması ile genotiplerin oluşturduğu bant desenleri Şekil 4.6.'da görülmektedir.



Şekil 4.6. OPB-05 primeri kullanılarak elde edilen RAPD profilleri S: Standart markör, 1: Ege 88, 2: Yavaros, 3: Gediz 75, 4: Ege 88 X *T. dicoccoides*, 5: Yavaros X *T. dicoccoides*, 6: Gediz 75 X *T. dicoccoides*, 7: *T. dicoccoides*

Çizelge 4.6. Çeşitleri uygulanan OPB-05 primeri ile verdikleri bant sayısı

	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X <i>T. dicoccoides</i>	Yavaros X <i>T. dicoccoides</i>	Gediz 75 X <i>T. dicoccoides</i>	<i>T. dicoccoides</i>
OPB-05	4	5	6	5	5	5	4

OPB-05 primeri ile Yavaros, Gediz 75 çeşitlerinde, Ege 88 X *T. dicoccoides*, Yavaros X *T. dicoccoides*, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezlerinde 6 bant, Ege 88, *T. dicoccoides* çeşitlerinde 4 bant gözlenmiştir. Bunlardan aynı sayıda bant deseni veren Yavaros çeşidi, Ege 88 X *T. dicoccoides*, Yavaros X *T. dicoccoides*, Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezlerinin bant desenlerinin de aynı olduğu gözlenmiştir. Aynı sayıda bant veren Gediz 75 çeşidinin ise bant deseninin farklı olduğu gözlenmiştir. Dörder desen veren Ege 88 ve *T. dicoccoides* çeşitlerinin bant desenlerinin farklı olduğu gözlenmiştir.

RAPD analizi sonucunda değerlendirmeye alınan 6 primer toplam 48 adet bant vermiştir. Bu bantlardan 31 adedi polimorfik, 17 adedi monomorfik bantlardır.

Ortalamalar alınarak değerlendirildiğinde; ortalama polimorfik bant sayısı 5,16, ortalama monomorfik bant sayısı 2,83 olarak hesaplanmıştır.

Primerler değerlendirildiğinde; en fazla polimorfik bant veren primer OPA-04, en az polimorfik bant veren primer OPA-02; en fazla monomorfik bant veren primer OPB-03, en az monomorfik bant veren primerlerin ise OPB-04 ve OPB-05 olduğu gözlenmiştir.

Bant desenlerinde yararlanılarak Nei ve Li (1979) a göre hesaplanan polimorfizm ve monomorfizm oranları Çizelge 4.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7. Genotiplere ait DNA bakımından benzerlik ve farklılık oranları

Çeşitler	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X T. dicoccoides	Yavaros X T. dicoccoides	Gediz 75 X T. dicoccoides
Yavaros	B= 0,92 F= 0,07					
Gediz 75	B= 0,84 F= 0,17	B= 0,90 F= 0,10				
Ege 88X T. dicoccoides	B= 0,79 F= 0,21	B= 0,83 F= 0,17	B= 0,92 F= 0,08			
Yavaros X T. dicoccoides	B= 0,83 F= 0,17	B= 0,89 F= 0,12	B= 0,85 F= 0,15	B= 0,84 F= 0,15		
Gediz75 X T. dicoccoides	B= 0,78 F= 0,21	B= 0,80 F= 0,20	B= 0,81 F= 0,19	B= 0,82 F= 0,17	B= 0,74 F= 0,26	
T. dicoccoides	B= 0,68 F= 0,32	B= 0,56 F= 0,43	B= 0,61 F= 0,39	B= 0,60 F= 0,40	B= 0,52 F= 0,48	B= 0,62 F= 0,38

B= Benzerlik F= Farklılık

Araştırmada kullanılan çeşitlerin sonuç veren primerlerle, verdikleri bant sayıları (Çizelge 4.8.).

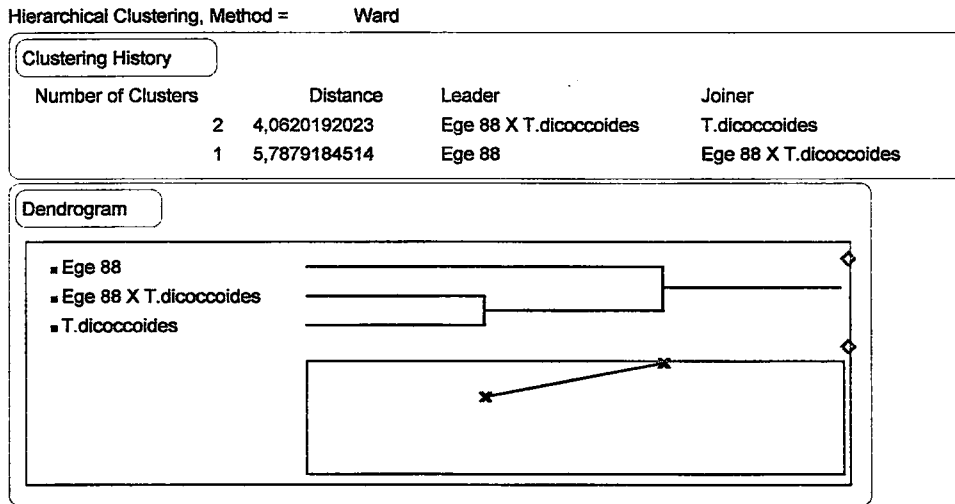
Çizelge 4.8. Çeşitlerin uygulanan primerlerle verdikleri bant sayıları

	Ege 88	Yavaros	Gediz 75	Ege 88 X T.dicoccoides	Yavaros X T.dicoccoides	Gediz 75 X T.dicoccoides	T.dicoccoides
OPA-02	6	5	5	5	5	5	5
OPA-04	11	6	4	3	3	4	0
OPA-06	5	6	5	3	7	5	0
OPB-03	7	7	7	7	9	9	9
OPB-04	3	3	6	6	3	6	6
OPB-05	4	5	6	5	5	5	4

Çeşitlerin oluşturdukları bant desenlerine bakılarak bantların olup olmasına göre, olanların "1", olmayanların "0" olarak değerlendirildiği Jump istatistik bilgisayar programında değerlendirilmeleri yapılarak, aralarındaki genetik ilişkileri açıklayan dendrogramlar elde edilmiştir. Daha açıklayıcı olacağı düşüncesi ile ebeveyn ve dölleri arasındaki genetik ilişkileri açıklayan dendrogramlar her ebeveyn ve döl için ayrı ayrı verilmiştir.

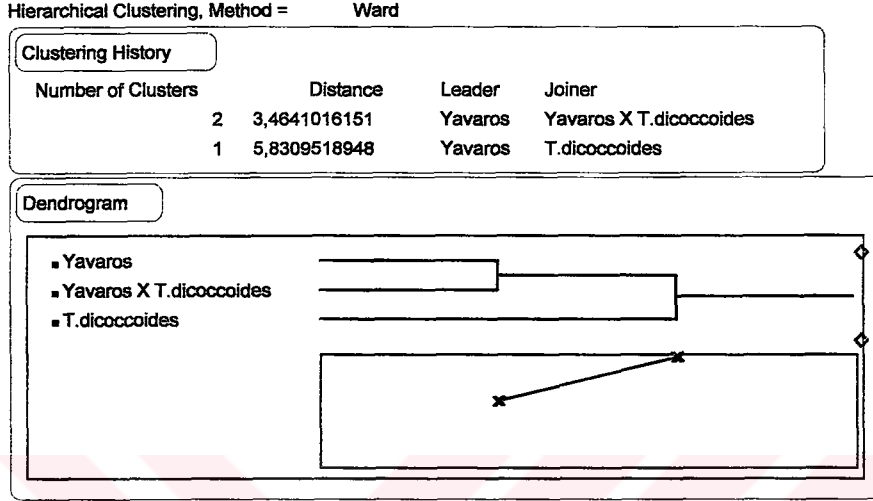
Ege 88 Çeşidi Cluster Sonucu: Ege 88 X *T. dicoccoides* melezlemede melez döl (F_4) ve *T. dicoccoides* ebeveyni genetik olarak yakın grubu oluşturmuştur (Çizelge 4.9.).

Çizelge 4.9. Ege 88 Çeşidi Cluster Sonucu



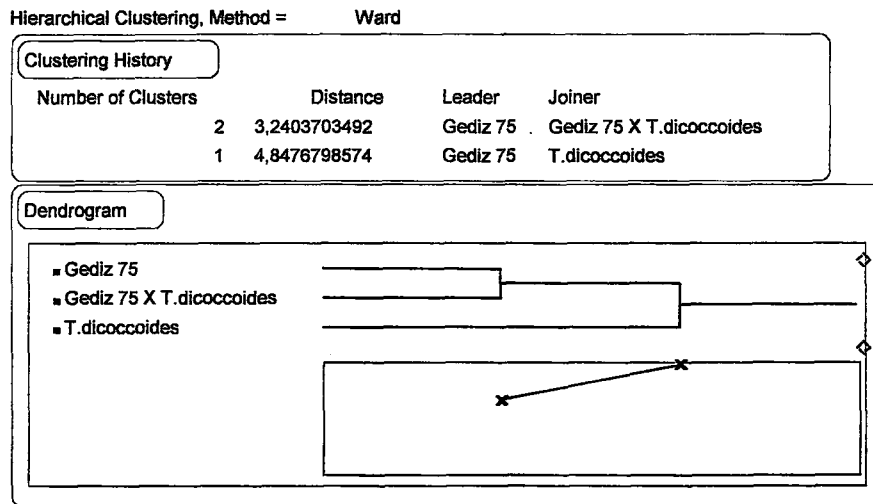
Yavaros eşidi Cluster Sonucu: Yavaros X *T. dicoccoides* melezlemedeki Yavaros ve F₄ dölgenerasyonu aynı grup içinde yer almış, *T. dicoccoides* ebeveyni ile ise ikinci derece genetik yakınlık göstermiştir (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. Yavaros eşidi Cluster sonucu



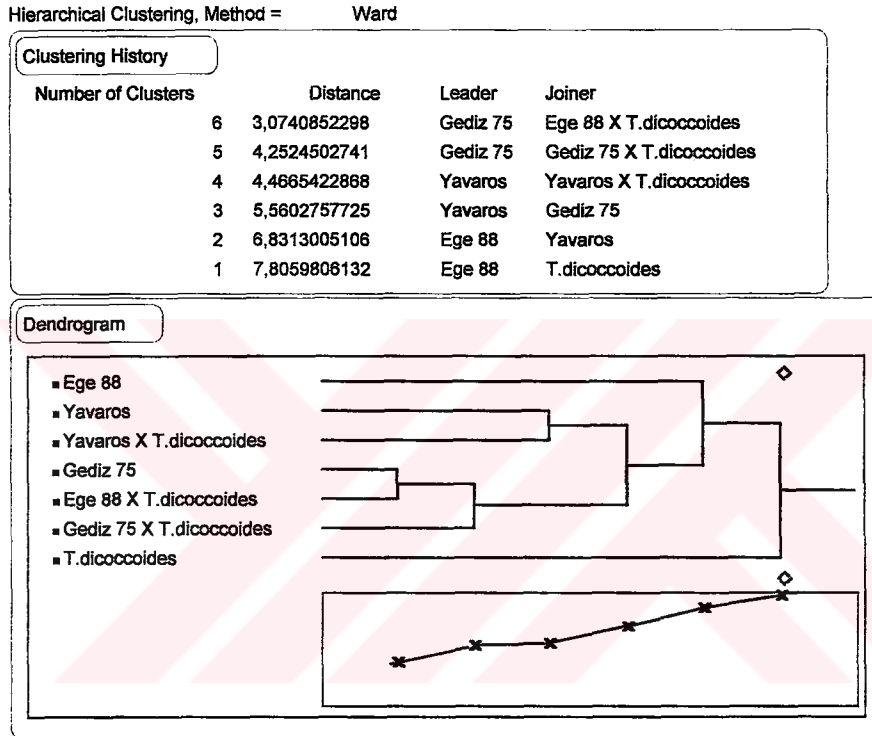
Gediz 75 Cluster Sonucu: Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezlemesi sonucu oluşturulan dendrogramda Gediz 75 ve F₄ generasyonu aynı grup içinde yer almış, *T. dicoccoides* ebeveyni ise ikinci derecede genetik yakınlık göstermiştir. Bu sonuç Yavaros X *T. dicoccoides* melezi ile ebeveynleri arasındaki sonucuna benzerdir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. Gediz 75 eşidi Cluster sonucu



Tüm Çeşitlerin Birlikte Cluster Sonucu: Tüm çeşitlerin birlikte değerlendirildiği Cluster sonucunda *T. dicoccoides* çeşidi tüm çeşit ve melezlerden en uzak, Ege 88 çeşidinin ise ikinci derece uzak olduğu gözlenmiştir. Yavaros çeşidi ile Yavaros X *T. dicoccoides* melezi gine yakın bir grup oluşturmuştur. Gediz 75 çeşidi ile Ege 88 X *T. dicoccoides* melezi aynı grup içinde yer almıştır. Gediz 75 X *T. dicoccoides* melezinin bu gruba katıldığı görülmektedir (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.12. Tüm çeşitlerin birlikte Cluster sonucu



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *T. dicoccoides* ile durum buğday melez döllerinin ve ebeveynlerin genetik yapısı RAPD markörleri aracılığı ile analiz edilmiştir. RAPD analizi sonucunda değerlendirilebilir bantlar veren 6 primer genetik polimorfizmi saptamada ve genotiplerin tanımlanmasında başarılı ve etkin olmuştur. Elde edilen bant desenlerinden yararlanılarak oluşturulan dendrogramlar ile incelenen makarnalık buğday çeşitlerinin *T. dicoccoides*' in genetik uzaklıkları belirlenmiştir.

Kullanılan 22 farklı primerden 6 tanesi; OPA-02, OPA-04, OPA-06, OPB-03, OPB-04, OPB-05 değerlendirilebilir toplam 48 adet bant vermişlerdir ve bu bantlardan 31 adedi polimorfik, 17 adedi monomorfik bantlardır. Bu bantlardan en çok bant veren primer OPB-03, en az bant veren primerlerin ise OPA-04 ve OPA-06 olduğu, en fazla polimorfik bant veren primer OPA-04, en az polimorfik bant veren primer OPA-02; en fazla monomorfik bant veren primer OPB-03, en az monomorfik bant veren primerlerin ise OPB-04 ve OPB-05 olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ortalamalar alınarak değerlendirildiğinde, ortalama polimorfik bant sayısı 5,16; ortalama monomorfik bant sayısı 2,83 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre Ege 88, Yavaros, Gediz 75 çeşitleri arasında genetik benzerlikler yüksek değerler göstermiştir (Yavaros - Ege 88: 0,92, Yavaros - Gediz 75: 0,90, Gediz 75 - Ege 88: 0,84). Bu çeşitler köken olarak CIMMYT kuruluşu ile işbirliği çerçevesinde temin edilen Meksika kökenli materyalden geliştirilmiş olan çeşitlerdir, bu nedenle teorik olarak benzer sekansları içermeleri beklenebilir. Nitekim Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi en yüksek genetik benzerlikler kültür ebeveyn genotiplerini kapsamaktadır.

Melez döller ise ebeveynler ve diğer melez döller ile ortalama olarak 0,82 düzeyinde bir benzerlik göstermektedir. Buna karşın, genetik köken olarak en uzak genetik yapı içeren *T. dicoccoides* ise, kültür ebeveynleri ve melez döller ile 0,52-0,68 arasında varyasyon gösteren düşük bir benzerlik göstermektedir.

Diğer taraftan Cluster analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde de *T. dicoccoides* diğer kültür ebeveynleri ve melez döllerinden ayrı bir grup oluşturmuştur (Çizelge 4.6.).

Cluster analizinde beklenmedik bir bulgu Ege 88 X *T. dicoccoides* ile ilgili Clusterda izlenmektedir. Ege 88 X *T. dicoccoides* F₄ dölü Gediz 75 ile yakın bir genetik grup oluşturmuştur. Yukarıda belirtildiği gibi Ege 88 ve Gediz 75 Meksika kökenli genetik benzer çeşitler olduğundan ortak bir DNA fragmentinin F₄ dölünde yer almış olması ve PCR işleminde tesadüf olarak bu fragmentin amplifiye edilmiş olması mümkündür. Böyle bir durum Ege 88 X *T. dicoccoides* dölünün Gediz 75 çeşidi ile aynı grup içinde değerlendirilmesine neden olmuş olabilir.

Autogam türler, ıslah çeşitleri ve kendilenmiş hatlar homojendir. Saf hatların bireyleri ise büyük ölçüde identik sekanslar içerir ve aynı bant desenini verirler. Büyük ölçüde repetitif sekanslar içeren ise çoğunlukla zengin bir polimorfizm gösterirler. Örneğin arpa genomunun

Allogam bitkilerde de geniş bir DNA polimorfizmi görmek mümkündür. Örneğin mısır bitkisinde, yabancı döllenmiş bir tür olmasının yanında genomunda transpozon içermesi nedeniyle özellikle yüksek bir polimorfizm görülür, ancak örneğin, domates, soya gibi birçok autogam bitki (kendi kendine dölenen) türlerinde olduğu gibi buğdayda da düşük düzeyde polimorfizme rastlanmaktadır (Linnert 1997).

Bütün bu nedenlerle buğdayda polimorfizmin ayrıntılanması ve belirlenmesi için daha çok sayıda primer kullanılması gerektiği söylenebilir.

Bu çalışma çerçevesinde kullanılan primerler Ege 88 X *T.dicoccoides* melezi ile ilgili değerlendirmelerde yetersiz kalmış olabilir. Diğer taraftan elde edilen genetik benzerlikler ve Cluster analizi sonuçları çalışmada kullanılan materyal ile ilgili ve ıslah çalışmalarında değerlendirilebilecek sonuçlar vermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma çerçevesinde ele alınan ebeveynler ve melez döller ile ilgili genetik analizler, RAPD markörleri aracılığıyla yapılmış, genetik benzerlikler ve Cluster analizleri bazında genotipler ile ilgili genetik bilgiler irdelenmiştir. Melez döller açısından ele alınan F₄ döl generasyonu, önemli ölçüde durulmuş hat niteliğinde olduğundan ebeveynler ile ilgili kıyaslamalarda çok belirgin farklılıklar göstermemiştir. Ancak Ege 88 x *T. dicoccoides* melez dölünde olduğu gibi bazı durumlarda *T. dicoccoides* ebeveyninin genetik etkisi F₄ döl generasyonunda belirgin olarak izlenebilmiştir (Çizelge 4.9.).

6. KAYNAKLAR

1. Abalı, E.E., Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Kurs Notu: Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, (BilGen), Genetik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (MBG 2000), Bilkent, Ankara, 2000.
2. Albayrak, G., Gözükırmızı, N., RAPD analysis of genetic variation in barley, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23(6): 627-630, 1999.
3. Albayrak, G., Karaer, S., Topohan, G., Gemici, B., Can, Ö. Ve Gözükırmızı, N., RAPD markörleri ile DNA parmak izi çıkartılması, Workshop, "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı", 17-19 Nisan 1995, Gebze-Kocaeli, 157-162, 1995.
4. Anonim, T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, <http://www.tarim.gov.tr/istatistikler>, 2001.
5. Anwar, R., Khan, M.A., Masood, S., Tahir, M., Jaradat, A.A., Diversity in Pakistani wheat germplasm as revealed by RAPD analysis, *Triticeae III. Proceedings of the Third International Triticeae Symposium, Aleppo, Syria*, 171-174; 8, 1998.
6. Arı, Ş., Bilgen, G., Çobanoğlu, G., Gürel, F. ve Gözükırmızı, N., Arpa melezlerinin moleküler markır yöntemleri ile tanımlanması, *Tarla Bitkileri Kongresi, İzmir*, 2:88-92, 1994.
7. Arı, Ş., DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, In: Temizkan, G. ve Arda N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma Uygulama Merkezi (BİYOGEN) Yayın No:1.Bölüm5; 57-67, 1999.
8. Olgun, A., Topal A., DNA'nın Analizi, In: Temizkan, G. ve Arda N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma Uygulama Merkezi (BİYOGEN) Yayın No:1.Bölüm5; 33-35, 1999.
9. Bahraei, S., The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in genetic diversity studies of *Triticum boeoticum* and *T. urartu*, *Seed and Plant*, 12: 1, 31-43(Pe), 5 (En); 15, 1996.
10. Barriga, B.P., Slebe, T.JC., Mansilla, S.J., Genetic analysis with RAPD markers in wheat, *Agro Sur.*, 22: 2, 133-142; 12, 1994.
11. Brahm,L., Identifizierung Molekularer Marker für die Resistenz der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara halstedii*) als Basis für eine markergestützte Selektion. Diss. Giessen. S.95, 1997.
12. Cao, W., Scoles,G., Hucl, P., Chibbar, R.N., The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions, *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (3-4): 602-607, 1999.
13. Castagna, R., Gnocchi, S., Perenzin, M., Heun, M., Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers, *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 3-4, 424-430; 42, 1997.

14. Çobanoğlu, G., Gürel, F., Arı, Ş., Arıcan, E., Gözükırmızı, N., Arpa germplazmasının moleküler düzeyde tanımlanması, Tarla Bitkileri Kongresi, 2:93-98, İzmir, 1994.
15. Çölkesen, M., Harran ovasında buğday tarımı ve sorunları üzerine yapılan araştırma ve gözlemler, Harran Üni., Zir. Fak. Der., 1 (1): 117-131, 1995.
16. D'Ovidio, R., Tanzarella, O.A., Porceddu, E., Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat through amplification by polymerase chain reaction, *Plant Molecular Biology*, 15:169-171, 1990.
17. Demir, İ., Yüce, S., Bilgen, G., Tanyolaç, B., Oğuz, İ., Bazı genotiplerin tanımlanmasında DNA parmak izleri üzerinde araştırmalar, DPT Proje No:97 DPT 06, İzmir, 1999.
18. Demir, İ., Yüce, S., Tüten, Ç., Friedt, W., Tendenzen der Weizenzüchtung in der Türkei. Deutsch-Türkisches Symp. 249-260, İzmir, 1989.
19. Doyle, J.J. and Doyle, J.L., Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12: 465-472, 1990.
20. Fahima, T., Sun, G.L., Behavar, A., Krugman, T., Beiles, A., Nevo, E., RAPD polimorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel, *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (3-4): 434-447, 1999.
21. Farooq, S., Shah, T.M., Askari, E., Zaidi, A.A., Arif, M., Iqbal, N., Identification of different wheat genotypes through polymorphism based on random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Pakistan Journal of Botany*. 26: 2, 373-382; 23, 1994.
22. Gallego, F.J., Martinez, I., Molecular typing of rose cultivars using RAPDs, *Journal of Horticultural Science*, 71(6):901-908, 1996.
23. Gözükırmızı, N., Arı, Ş., Gürel, F., Çobanoğlu, G., Rüstemova, P., Bilgen, G., Can, Ö. ve Ekiz, H., *Hordeum* (arpa)'da genetik stabilite, Germplazm örneklerinde polimorfizm ve genetik haritalama için RAPD yöntemi ile parmak izi çalışmaları ve arpa ıslahına etikileri, Workshop, "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı", Gebze-Kocaeli, 146-156, 1995.
24. Keeton, W.T., Gould, J.L. and Gould, C.G., Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), In: *Genel Biyoloji, Çeviri Editörleri; Demirsoy, A. and Türkan, İ., sayfa:268, Palme Yayıncılık, Ankara, 1999.*
25. Laurie, D.A., Snape, J.W., Gale, M.D., DNA marker techniques for genetik analysis in barley. In: *FURLEY: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology in Agriculture 5; 115-132, 1999.*
26. Linnert, G., DNA Marker in der Pflanzenzüchtung. In: *Odenbach, W., Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. S. 334-347, 1997.*
27. Liu, Z.Q., Pei, Y., Pu, Z.J., Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum* L, *Plant-Breeding*. 118: 2, 119-123; 31, 1999.

28. Lüleci, G., Sakızlı, M. Ve Alper, Ö., DNA Amplifikasyonu (Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR), In: Renkli Genetik Atlası, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., 72-73, İstanbul, 2000.
29. Malkawi H.I., Ajlouni, M.M., Jaradat, A.A., Jaradat, A.A., Analysis of genetic diversity of wild emmer and durum wheats by RAPDs, Triticeae III. Proceedings of the Third International Triticeae Symposium, 165-170; 20, Aleppo, Syria, 1998.
30. McDonald, M.B., Elliot, L.J., Sweeney, P.M., Ellis, R.H. (ed.), Black, M. (ed.), Murdoch, A.J. (ed.), Hong, T.D., DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses, Basic and applied aspects of seed biology. Proceedings of the Fifth International Workshop on Seeds, held at Reading, UK on 10-15 September 1995. 747-753; Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture No. 30; 19 ref., 1997.
31. Myburg, A.A., Botha, A.M., Wingfield, B.D., Wilding, W.J.M., Identification and genetic distance analysis of wheat cultivars using RADP fingerprinting, Cereal-Research-Communications, 25: 4, 875-882; 23, 1997.
32. Staub, J.B., Serquen F.C., Gupta M., Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding, Hort Science, 31(5): 729-740, 1996.
33. Tosun, M., Altınbaş M., Makarnalık buğday (*T. durum* Desf.) ile yabani tetraploid buğday (*T.dicoccoides* Korn.) melezlerinde tanede protein oranı için genotipik varyabilite ve heterosis, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 36:1-2-3, 1999.
34. Turgut, İ., Yüce S., R. Marquarel, Protein Contents and Aminoacid Pattern of Turkish Wild Wheats. Plant Research and Dev., 19.7-13, 1984.
35. Üstün, A., Smith, Rex L., Gülümser, A., Moleküler markörler ve bitki ıslahında kullanımları, O.M.Ü.Z.F. Dergisi, 11(2):249-263, 1996.
36. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Limak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990 DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Research 18, 6531-6535, 1990.

BURCU ARSLAN

Doğum yeri ve tarihi : Elazığ, 21.02.1977

Adres : Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Muradiye-MANİSA

Telefon : İş: (236) 241 21 51 - Cep: (533) 366 35 02

Fax : (236) 241 21 58

Eğitim:

Suphi Koyuncuoğlu Lisesi, 1993, İzmir

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1997, İzmir

Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı,
1997-, Manisa

Araştırma Çalışmaları:

1998 yılı Aralık-Eylül ayları arasında Mount Sinai Tıp Merkezi Kardiyovasküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında, hücre kültürü , hayvan hücrelerinden DNA izolasyonu, northern ve southern blotting, DNA elektroforezi, P-selectin/ICAM-1 ELISAS, plazmid izolasyonu teknikleri üzerine çalıştı.

1999-2001 yılları arasında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Biyoloji Uygulama Laboratuvarında, bitkiden DNA izolasyonu, PCR teknikleri üzerine çalıştı.

1998-2001 Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans dersleri olan genetik, fizyoloji, hücre biyolojisi, entomoloji laboratuvarlarında ve moleküler biyoloji, biyoistatistik, proje araştırma deneme yöntemleri derslerinde asistan olarak görev aldı.

Katıldığı Kurs, Sempozyum ve Kongreler :

Kursun adı	Kursu veren kurum	Süresi
Moleküler Biyoloji Ve Genetik Tekniklerin Yaşam Bilimlerindeki Uygulamaları Pratik Kursu	Bilkent Üniversitesi	5-tam gün Haziran 2000
Gen Teknolojisi Uygulamaları sempozyumu	Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama Ve Araştırma Merkezi	5- tam gün Mayıs 2000
Bilimsel Araştırma Projelerinin Planlanması, Hazırlanması ve Desteklenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	1- tam gün Ocak 2001
XV.Ulusal Biyoloji Kongresi	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	5- tam gün Eylül 2000