

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI ZEYTİN KLONLARINDA
RAPD MARKERLERİ KULLANILARAK
GENETİK İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rahşan İLİKÇİ

Balıkesir, Temmuz- 2003

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI ZEYTİN KLONLARINDA
RAPD MARKERLERİ KULLANILARAK
GENETİK İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rahşan İLİKÇİ

Tez Danışmanı : Yard. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Sınav Tarihi : 11.7.2003

Jüri Üyeleri : Prof.. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Yard. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (Danışman-BAÜ)

Yard. Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2003

ÖZET

BAZI ZEYTİN KLONLARINDA RAPD MARKERLERİ KULLANILARAK GENETİK İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Rahşan İLİKÇİ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Balıkesir, 2003

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) temelde Akdeniz bölgesinde bulunan kültüre alınmış bir bitkidir. Edremit, zeyincilik ve zeytinyağı üretimi açısından Türkiye'de en önemli bölgelerden birisidir. Bölgede sayısız kültüre alınmış zeytin klonları bulunmakta ve bunların büyük çoğunluğunun morfolojik olarak ayırımı yapılamamaktadır. Bu yüzden, moleküler markerların kullanımı özellikle zeytin klonlarının ayırt edilmesi ve genetik ilişkilerinin belirlenmesi açısından gereklidir.

Bu çalışmada, Edremit Zeytincilik Fidan Üretim Merkezinden elde edilen zeytin klonları arasındaki genetik ilişki RAPD-PCR tekniği kullanılarak incelenmiştir. RAPD markerleri bitki türleri ve diğer organizmalar arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede kullanılan bir tekniktir. Fakat bitkilerden yüksek saflıkta DNA izolasyonu, farklı bitkilerin yüksek düzeyde polisakkarit ve polifenolik bileşikler içerdikleri için zordur. Bu yüzden, farklı yöntemler kullanılarak RAPD-PCR için uygun olabilecek modifiye DNA izolasyon yöntemi geliştirildi. En iyi reaksiyon koşullarını belirlemek amacıyla RAPD-PCR reaksiyonları optimize edildi. Farklı zeytin klonlarının modifiye prosedürle elde edilen DNA'ları ve 9 farklı 10 bazlık primer kullanılarak RAPD-PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Jel elektroforezi sonucunda elde edilen amfiliye edilen bantlar arasında var ve yok olan bantlar değerlendirildi. Zeytin klonları arasında genetik ilişkinin belirlenmesi içinde ayrıca Pairwise Distance analiz de yapıldı ve UPGMA algoritması kullanılarak bir fenogram oluşturuldu.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Olea europaea*, Türkiye, Zeytin, RAPD, genetik çeşitlilik.

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY FROM SOME OLIVE CULTIVAR USING RAPD MARKERS

Rahşan İLİKÇİ

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(MSc. Thesis / Supervisor: Dr. Feray Köçkar)

Balikesir- Turkey, 2003

Olive tree (*Olea europaea* L.) is a cultivated plant mainly localized in Mediterranean region. Edremit is one of the most important regions in Turkey for the production of olive and oil olive oils. There are numerous cultivars in the region, which most of them cannot be identified by phenotypic markers. Therefore, the use of the molecular markers is required for identification and genetic relationship for the olive clones.

In this study, genetic relationships of six olive clones obtained from Edremit Olive Germplasm Center were investigated using RAPD markers. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR is a technique that can distinguish the genetic relationship amongst plant species and other organisms. However, isolation of high quality DNA from plant is difficult due to high level of polysaccharides and other substances that can interfere particularly RAPD-PCR reactions. Therefore, the genomic DNA suitable for RAPD-PCR reaction was optimized using different methods. The RAPD-PCR reaction parameters were optimized in order to obtain the best reaction conditions. The genomic DNA of different olive clones obtained from a modified procedure were subjected to RAPD PCR reaction using nine 10-mer primers. The absence and presence of the bands have been determined amongst the amplified patterns obtained from agarose gel electrophoresis. Pairwise Distance analysis have been also performed in order to evaluate the genetic relationship between olive clones and dendrogram has been obtained using UPGMA algorithms.

KEY WORDS: *Olea Europaea*, Turkey, Olive, RAPD, genetic diversity.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	i
ABSTRACT, KEY WORDS	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SEMBOL LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1 GİRİŞ	1
1.1 Zeytin	1
1.1.1 Zeytinciliğin Dünya ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri	2
1.1.2 Balıkesir İlinde Zeytin Alanlarının Yayılışı	2
1.2 Moleküler Sistemik	6
1.2.1 Genetik Markerler	6
1.2.1.1 Morfolojik Markerler	8
1.2.1.2 Sitogenetik Markerler	8
1.2.1.3 Protein Markerler	9
1.2.1.4 DNA Markerleri	10
1.2.1.5 RFLP Markerleri	11
1.2.1.6 Mini ve Mikrosatellit DNA markerleri	11
1.2.1.7 STS ve EST Markerleri	12
1.2.1.8 SSCP Markerleri	12
1.2.1.9 AFLP Markörleri	13
1.2.1.10 RAPD Markerleri	13
1.2.1.10.1 RAPD Marker Sisteminin Karakteristikleri	17
1.2.1.10.2 RAPD Marker Sistemlerinin Uygulama Alanları	18
1.3 Zeytinde Yapılan Moleküler Sistemik Çalışmaları	19
1.4 Çalışmada Kullanılan Zeytin Klonlarının Özellikleri	20
1.5 Çalışmanın Perspektifi	21
2 MATERYAL VE YÖNTEM	22

2.1 Materyal	22
2.1.1 Kimyasallar	22
2.1.2 Solusyonlar	22
2.1.2.1 Della Porta Yöntemine Göre Yapılan gDNA İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar	22
2.1.2.2 CTAB Metoduna Göre Yapılan gDNA İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar	22
2.1.2.3 Modifiye Edilmiş Metoda Göre Yapılan gDNA İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar	24
2.1.2.4 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Solusyonlar	24
2.1.2.5 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler	25
2.1.3 Bitki Materyali	26
2.1.4 Kullanılan Makine Teçhizat	26
2.2 YÖNTEM	27
2.2.1 Cam malzeme ve Plastik malzemenin hazırlanması	27
2.2.2 Genomik DNA(gDNA) İzolasyonu	27
2.2.2.1 Della Porta Yöntemine Göre Zeytinden gDNA İzolasyonu	27
2.2.2.2 CTAB Yöntemine Göre Zeytinden DNA İzolasyonu	28
2.2.2.3 Modifiye Edilmiş Yönteme Göre Zeytinden gDNA İzolasyonu	28
2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi	29
2.2.4 DNA Miktar tayin	30
2.2.5 Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu	30
2.2.6 Etanol Presipitasyonu	30
2.2.7 RAPD-PCR	31
3 BULGULAR	32
3.1 DNA İzolasyonunun Optimizasyonu	32
3.2 RAPD-PCR Koşullarının Optimizasyonu	34
3.3 Zeytin Klonlarına ait RAPD Profilleri	35
4 TARTIŞMA ve SONUÇ	52
5 KAYNAKLAR	59

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
AP-PCR	Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction
AFLP	Amplyfied Fragment Lenght Polymorphism (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
bp	Baz Çifti
cDNA	Komplementer DNA
CTAB	Hehzatetrimetil amonyum bromid
dak.	dakika
dH2O	Distile su
ddH2O	Double distile su
dNTP	Deoksiribinükleosid trifosfat
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EST	Ekspre Edilen Dizi Etiketleri
EtBr	Etidyum Bromür
gDNA	Genomik Deoksiribonükleik asit
IOOC	Uluslararası zeytin yağı konseyi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

RFLP	Restriksiyon parça uzunluk poimorfizmi
SDS	Sodyum dedosil sülfat
SSCP	Tek Zincir Konformasyonel Değişimi
SSR	Basit Dizi Tekrarı
STS	Dizi Etiketlenmiş Bölgeler
Taq DNA Pol.	Thermophilus aquaticus DNA Polimeraz
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
U	Ünite
UV	Ultra Viyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil

Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Dünya’da Zeytin Alanlarının Yayılışı	3
Şekil 1.2	Türkiye’de Zeytin Alanlarının Yayılışı	4
Şekil 1.3	Genetik Markörler Eldesinde Tarihsel Gelişim	9
Şekil 1.4	Standart PCR Reaksiyonu	15
Şekil 1.5	RAPD-PCR Reaksiyonu	16
Şekil 1.6	RAPD Reaksiyon1 ve Reaksiyon 2 Ürünlerin agaroz jel analizi	17
Şekil 3.1	Üç farklı prosedür ile taze zeytin yapraklarında elde edilen genomik DNA’ların agaroz jel analizi	37
Şekil 3.2	Modifiye edilen prosedür ile taze zeytin yapraklarından elde edilen bazı genomik DNA örnekleri	38
Şekil3.3	UB3 zeytin DNA’sı ile farklı primerlerin verdiği RAPD profili	39
Şekil 3.4	UB3 zeytin DNA’sı ile OPA 01 primeri kullanılarak farklı MgCl konsantrasyonları ile RAPD-PCR Parametrelerinin optimizasyonu	40
Şekil 3.5	UB3 zeytinine ait farklı DNA konsantrasyonları ile RAPD-PCR parametrelerinin optimizasyonu	41
Şekil 3.6	Farklı primer konsantrasyonları ile RAPD-PCR parametrelerinin optimizasyonu	42
Şekil 3.7	OPA 01 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	43
Şekil 3.8	OPA 12 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	44
Şekil 3.9	OPB12 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	45
Şekil 3.10	OPC 01 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	46
Şekil 3.11	OPB 08 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	47
Şekil 3.12	OPD 01 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	48
Şekil 3.13	A 17 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	49
Şekil 3.14	FSJ 02 Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	50
Şekil 3.15	WINK Primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili	51
Şekil 4	Altı farklı zeytin klonu arasındaki genetik ilişkiyi gösteren	

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

<u>Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1	Dünya zeytin üretim alanı, zeytin ve zeytin yağı üretimi(1998)	5
Çizelge 1.2	Edremit yöresindeki kültüre alınan farklı zeytin klonlarına ait olan Değerler	21
Çizelge 2.1	Della Porta'ya göre yapılan gDNA İzolasyonu Metodunda Kullanılan solusyonlar ve içerikleri	22
Çizelge 2.2	CTAB Metoduna göre yapılan gDNA İzolasyonunda kullanılan solusyonları ve içerikleri	23
Çizelge 2.3	Modifiye edilmiş metoda göre yapılan gDNA izolasyonunda Kullanılan solusyonlar ve içerikler	24
Çizelge 2.4	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Solusyonlar ve İçerikleri	24
Çizelge 2.5	RAPD-PCR Reaksiyonunda kullanılan Primerle ve Tm Değerleri	25
Çizelge 2.6	Çalışmada Kullanılan Gereçler ve Modelleri	26
Çizelge 4	Klonlar arasındaki genetik farklılığı gösteren PAIRWISE DISTANCE Analizi	56

ÖNSÖZ

Çalışmalarım esnasında değer biçilmez rehberliği, bilimsel kritik tartışmalar ve akılcı tavsiyeleri ve her konudaki desteği için Sayın Hocam Yard. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a derin teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi Müdürü Prof. Dr. Oktay Arslan'a çalışmam için laboratuvar imkanı sağladığı için teşekkür ederim. Ayrıca bu merkezde çalışan Ferit KARANFİL'e ve diğer arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin data analizlerindeki yardımlarından dolayı Yard. Doç. Dr. İslam GÜNDÜZ'e, çalışmam sırasında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Serap ÖZ AYDIN'a, teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya örnek temin eden Edremit Zeytincilik İstasyonu Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Sonuçta, en içten dilekleriyle bana destek olan annem Gülseren ILIKÇI'ya, bana olan sarsılmayan güveniyle abim Tuncay'a ve çalışmalarımın her anında akıl almaz varlığıyla güç aldığım ve bu çalışmamı adadığım babam İlhan ILIKÇI'ya en derin şükranlarımı sunuyorum.

Balıkesir, 2003-06-29

Rahşan ILIKÇI

BABAM'A



1 GİRİŞ

1.1 Zeytin

Zeytin, dünyanın en sağlıklı ve doğal bitkisel yağ kaynaklarından biri olması nedeniyle önemli bir ağaçtır. Zeytinin tarihi günümüzden yaklaşık 9000 yıl öncesine dayanmaktadır. Tarihi süreç esnasında kaçınılmaz olarak pek çok uygarlık yazıtları ve kutsal kitaplarda yerini almıştır. Bu kapsamda, beyaz bir güvercinin Nuh'un gemisine tufan sonrası canlılık belirtisi olarak, ağzında zeytin dalı ile dönmesi nedeniyle zeytin dalı yüzyıllardır barışın simgesi olarak göze çarpmaktadır.

Zeytin, *Oleaceae* familyasının *Oleae* cinsinin *Olea europae L.* türü içerisinde ele alınmaktadır. Bu ağacın anavatanı, Güneydoğu Anadolu Bölgesini de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya'dır. Yayılışı iki koldan olmuştur: (1) Mısır üzerinden Tunus ve Fas'a (2) Anadolu boyunca Ege Adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya'dır. Akdeniz iklim koşulları, zeytin için ideal şartları oluşturmaktadır. Bu nedenle Akdeniz bitkisi olarak ta isimlendirilmektedir [1].

Zeytin ağacı, yapraklarını dökmeyen, 5 yaşından önce meyve vermeyen, 6-10 yaşları arasında ekonomik değeri olan ürün vermeye başlayan bir bitkidir. Tam olgunluğa yaklaşık 80-100 yaşlarında erişmekte ve çapalama, gübreleme, budama, Zarahlılarla mücadele gibi yoğun kültürel bakım istemektedir. Zeytin, 150-200 yıl meyve üretebilen uzun ömürlü bir bitkidir. Ağaçtaki vejetatif ve generatif faaliyetlerin azalması ve sonuçta ürünün ekonomik açıdan düştüğü devreye gerileme dönemi denilmektedir [2].

Zeytin tanesi, taş çekirdekli, etli bir meyve olup, şekli oval, rengi ise siyaha çalar yeşildir. Hasat edildiğinde kullanılma olanağı yoktur; fakat sonrasında salamura yapılarak sofralık zeytin olarak tüketilebildiği gibi yağının çıkarılmasıyla da zeytinyağı elde edilmektedir. Yağı çıkarılacak zeytinler ocak ayında siyahlaştığı zaman toplanır ve çekirdeği parçalamayacak kadar sıkılarak yağ elde edilir.

Zeytin yaprağının tıbbi açıdan tansiyon düşürücü olarak önemi vardır. Zeytin zamkı koku yapımında, odunu kaplamacılıkta, zeytini sabun üretiminde, küspesi gübre olarak değerlendirilmektedir.

Zeytin ağacı meyvesi, gıda maddesi olarak beslenmede önemli bir yer tutar. Hem sofralık hem de yağ üretiminde kullanılması, onu vazgeçilmezler listesine eklememize olanak tanır. Akdeniz ülkelerinde de milyonlarca insana geçim kaynağı olmasıyla da ayrı bir kapsamda değerlendirmemizi sağlar.

1.1.1 Zeytinciliğin Dünya ve Türkiye Ekonomisindeki Yeri

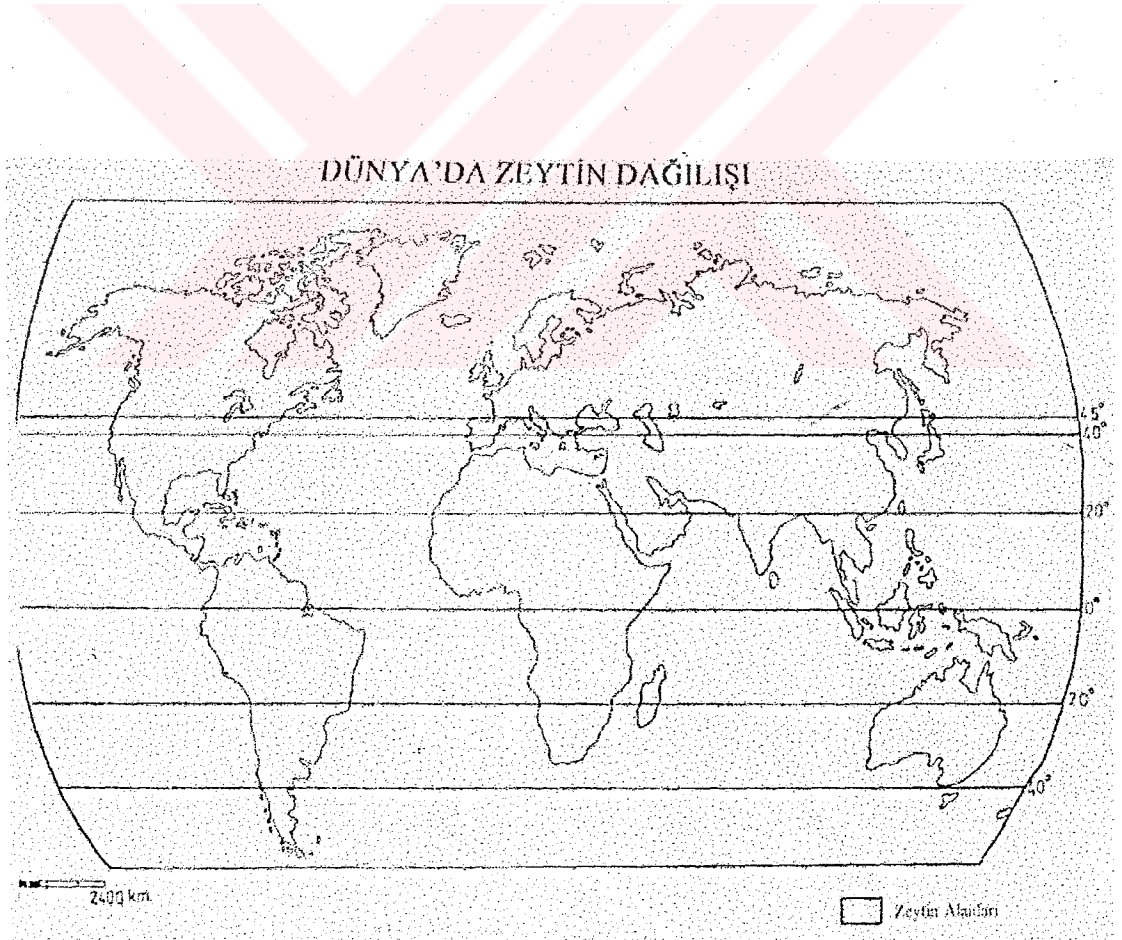
Zeytincilik, hem tarımdaki mevcut konumundan hem de alternatifli değerlendirilebilirliği nedeniyle sanayiye hammadde katkısından dolayı zeytin tarımı yapılabilen ülkelerin ekonomilerinde önemli bir yer tutmaktadır. Zeytin yetiştiriciliğinin ekonomik ve sosyal önemi nedeni ile zeytinyağı üzerinde milletler arası bir müdahale anlaşması yapılması sağlanmış ve 1959 yılında Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (IOOC) kurulmuş; Türkiye ise bu organizasyona 1963 yılında katılmıştır [3]. Dünyada zeytin ağacı varlığının ve zeytin üretiminin % 97'si Akdeniz bölgesindedir (Şekil 1.1). Zeytin üreticisi ülkelerin 1998 yılı zeytin ve zeytin yağı üretimine ait değerler Çizelge 1'de verilmektedir. Bu veriler incelendiğinde, dünya zeytinyağı piyasasının İtalya'nın, sofralık zeytinin ise İspanya ve Yunanistan'ın elinde olduğu görülmektedir. Türkiye toplam zeytin üretiminin % 74'ünü yağlığa, % 26'sını sofralık zeytine ayırmaktadır. Genellikle Türkiye, zeytin ağaç varlığı, alanı, zeytinyağı ve sofralık zeytin üretiminde İspanya, İtalya ve Yunanistan ile birlikte ilk dört sırayı paylaşmaktadır [1]

1.1.2 Balıkesir İlinde Zeytin Alanlarının Yayılışı

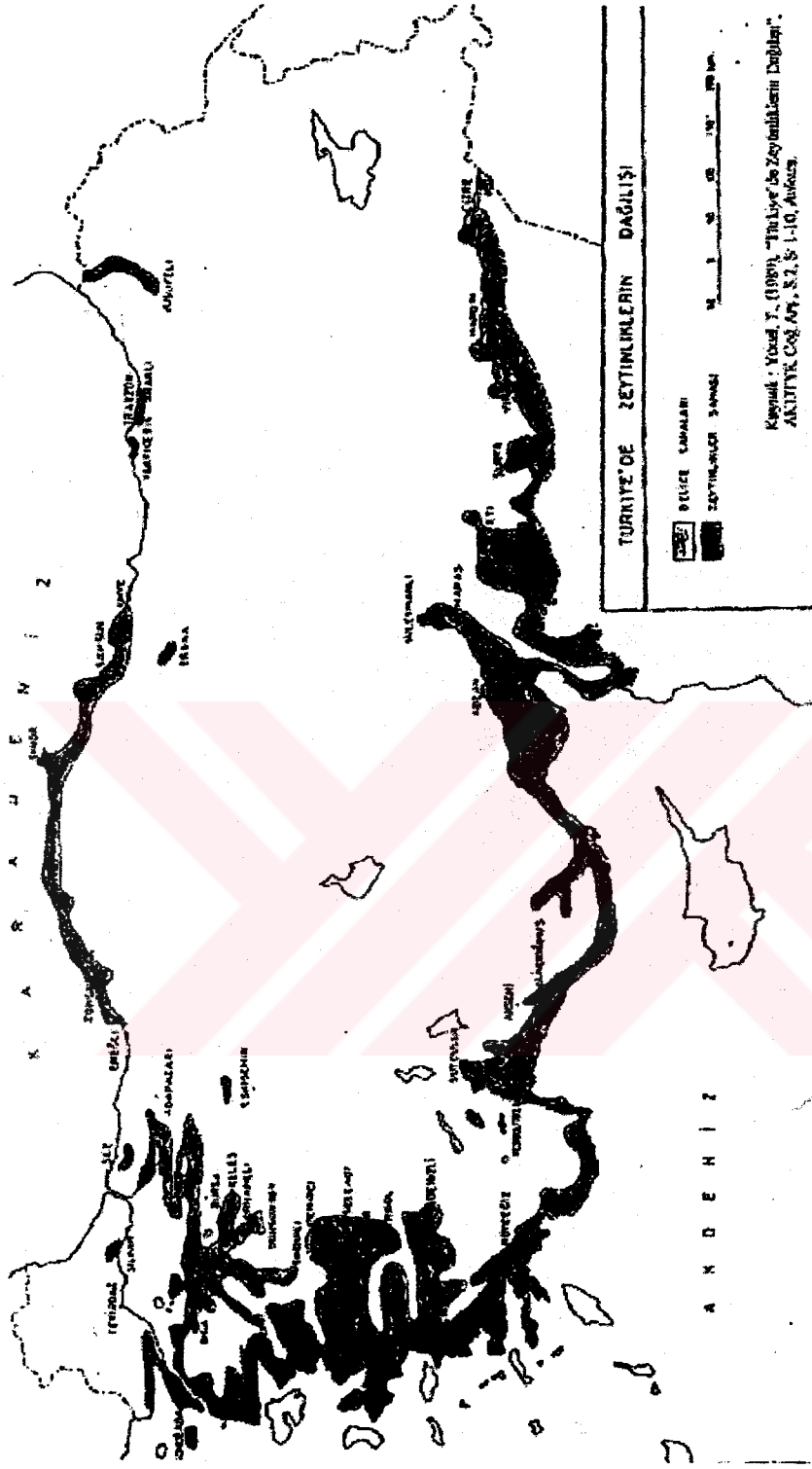
Zeytin ağacı, Akdeniz iklimini karakterize eden bir bitki olduğuna göre dünyada zeytin ağacının dağılışı ile Akdeniz ikliminin görüldüğü alanlar arasında bir orantı vardır. Türkiye de zeytin yetişen alanların dağılışına bakıldığında ülkemizin kıyı kesimlerinde yoğunlaştığını görmek mümkündür. Özellikle Akdeniz, Ege ve Marmara Denizi kıyılarında yoğun zeytin alanları mevcuttur (Şekil 1.2). Marmara

bölgesinde zeytinin en fazla kapladığı il Balıkesir'dir. Balıkesir ilinin önemli bir kısım arazisi ve bu arazi üzerinde bulunan Ayvalık, Burhaniye, Edremit, Havran ve Gömeç ilçeleri Ege Bölgesinde yer almaktadır. Marmara Bölgesinde mevcut zeytin ağaçlarının yarıya yakını Balıkesir ilinde bulunmaktadır. Balıkesir ilinin toplam 83,876 hektar olan dikili alanlarının % 60'ı zeytin alanlarına ayrılmış durumdadır. Bu alan üzerinde ise 10,090,750 adet meyve veren yaşta; 225,020 adet meyve vermeyen yaşta olmak üzere toplam 10,315,770 adet zeytin ağacı bulunmaktadır [2].

Balıkesir ilinde yer alan zeytin ağaçları idari alan olarak 8 ilçeye dağılmış durumdadır. Edremit ilçesi 3,000,000 adet zeytin ağacı barındırması ile ilk sıradadır. Edremit ilçesi zeytin ağaçlarının % 29'una sahiptir. Edremit ilçesini %19,8 oranla Burhaniye; %12,2 oranla Gömeç; %8,9 oranla Erdek; %8,7 oranla Havran ilçesi; %2,8 oranla Bandırma ilçesi takip etmektedir [2].



Şekil 1.1 Dünya'da zeytin alanlarının dağılışı [2].



Şekil 1.2 Türkiye'de zeytin alanlarının dağılışı

Çizelge 1.1 Dünya zeytin üretim alanı, zeytin ve zeytinyağı üretimi (1998 yılı) [1]

Ülke	Üretim Alanı		Üretim Miktarı		Zeytinyağı Üretimi	
	Ha	%	Ton	%	Ton	%
İspanya	2.100.000	27,8	3.564.400	28,4	718.100	31,3
Tunus	1.200.000	15,9	1.000.000	8,0	170.000	7,4
İtalya	1.139.684	15,1	2.232.000	17,8	450.000	19,6
Yunanistan	728.735	9,7	1.879.430	15,0	430.000	18,8
TÜRKİYE	567.000	7,5	1.300.000	10,4	190.000	8,3
Suriye	465.000	6,2	763.186	6,1	110.000	4,8
Fas	420.000	5,6	450.000	3,6	70.000	3,1
Portekiz	320.000	4,2	287.000	2,3	40.000	1,7
Cezayir	160.000	2,1	124.060	1,0	46.000	2,0
Ürdün	70.824	0,9	75.000	0,6	14.100	0,6
Batı Şeria	70.000	0,9	130.000	1,0	12.904	0,6
Libya	56.000	0,7	58.000	0,5	10.400	0,5
Lübnan	48.000	0,6	98.000	0,8	6.500	0,3
Arnavutluk	45.000	0,6	40.000	0,3	2.500	0,1
Arjantin	27.703	0,4	91.940	0,7	11.500	0,5
Mısır	25.000	0,3	200.000	1,6		0,0
Hırvatistan	20.000	0,3	10.405	0,1	1.572	0,1
Fransa	14.000	0,2	13.500	0,1	2.000	0,1
İsrail	13.000	0,2	18.700	0,1	23	0,0
A.B.D.	13.000	0,2	86.180	0,7	490	0,0
DÜNYA	7.543.992	100	12.534.563	100	2.292.037	100

1.2 Moleküler Sistematik

Mendel prensipleri, yıllardır hem basit hem de kompleks özelliklerin analizi ve populasyonlarda genetik varyasyonun analizinde başarıyla uygulanmaktadır. Son zamanlara kadar, uygulanan işlemler ve genetik sistemlerinin karakterizasyonu fenotipik karakterlere bağlıydı. Fenotipik analizde amaçlanan, fenotiplerden elde edilen genotipleri belirlemektir. Ancak bu analizin kalitesi düşük penetrans gibi faktörlerle düşebilir. Bireylerin değişken çevre koşullarında bulunması genotipin fenotipte ortaya çıkma oranını değiştirecektir. Bu süreçteki en önemli adımlardan biri, farklı biyokimyasal ve moleküler markerlerin kullanılmasıdır [4]. Son yıllarda, bu problemler, farklı DNA tabanlı marker sistemlerinin geliştirilmesiyle en aza indirgenerek doğrudan genotiplerin belirlenebilmesi mümkün hale gelmiş ve böylece moleküler sistematik denilen bilim dalının ortaya çıkması tetiklenmiştir

1.2.1 Genetik Markerler

Çalışılan populasyonda polimorfik olan özellik ya da karakterler genetik markerler olarak bilinir. Polimorfizm ise bir lokusta belirlenebilen kalıtsal varyasyon olarak tanımlanır. Genetik marker, bir polimorfik marker olmalıdır; fakat bir polimorfik marker çevresel faktörler nedeniyle her zaman genetik marker olmayabilir. Bu nedenle, genetik bir markerin kabul edilmesindeki kriter; marker lokusu, bir test populasyonundaki bireyler arasındaki deneysel olarak belirlenebilen varyasyonu göstermeli ve bu özellik döllerde üretilebilir olmalıdır. Bu varyasyon belirlenir ve test populasyonundaki bütün bireylerin genotipleri bulunur. Genetik markerler kullanılarak yapılan genom analizi, çok iyi yapılandırılmış genetik modellere dayandırılmalıdır. Eğer bir markerin genetiği yeterince açık değilse, o zaman analiz yanlış olabilir. Bununla birlikte, markerle ilişkilenen analizler, tekrarlanabilir olmalıdır. Farklı marker tipleri, farklı polimorfizmleri tanımlayabilir. Bir markerin genetik yorumu, genomun dizisinin kompleksliğine ve markerle belirlenen varyasyonun çeşidine son derece bağlılık göstermektedir [5].

Genom analizlerinde genel olarak dört tip marker sistemi kullanılmaktadır: (1) Morfolojik markerler, (2) Protein-tabanlı markerler, (3) Sitogenetik markerler (4) DNA-tabanlı markerler.

Başlangıçta, Mendel ve Morgan gibi genetikçiler, morfolojik markerler kullandılar. Allozim, izozim markerleri, 1960 ve 1970'li yıllarda rekombinant DNA teknolojisi öncesinde oldukça popülerdi. İzozim markerleri, bilinen enzim aktiviteleriyle ilgili markerler düşünüldüğünde bir genin farklı allelleri ile ilişkilidir. Rekombinant DNA teknolojisi'sinin 1980'lerde gelişmesi ile RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) marker yöntemi keşfedildi. 1980'lerin ortalarında DNA marker teknolojisi PCR teknolojisinin geliştirilmesi ile bağlantılı olarak gelişti. Bugün kullanılan DNA markerlerinin çoğu PCR tabanlı markerlerdir. Bugün pek çok organizmada tür içi ilişkilerin belirlenmesi, zirai amaçlı ıslah çalışmaları, genotiplerin belirlenmesi gibi çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 1.3).

DNA tabanlı markerleri belirlemede en büyük adımlardan biri, 1980 yılında, DNA molekülünde restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP) bölgeleri ortaya çıkarılmasıdır [6]. Prensip, morfolojik markerler ve izozimler DNA markerleri kadar kullanışlıdır; fakat pratikte DNA markerleri diğerleri ile karşılaştırıldığında çok sayıdadır.

DNA markerlerinden elde edilen bilgi adli tıpta, ebeveyn testi, genetik hastalıklardan sorumlu genlerin belirlenmesi, organizmalar arasındaki evlasyonel ilişkilerin belirlenmesi gibi çeşitli amaçlar doğrultusunda yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA markerlerinin en yaygın kullanım alanı, basit ya da kompleks özellikleri etkileyen kromozom gen lokalizasyonunu belirlemek için kullanılan gen haritalarının belirlenmesini oluşturmaktadır [7,8]. Bu açıdan bakıldığında, DNA markerleri, 1900'lerin başından beri kullanılan genetik markerlerden temelde farklılık göstermese de, çok sayıda bulunmaları yönünde farklılık göstermektedirler.

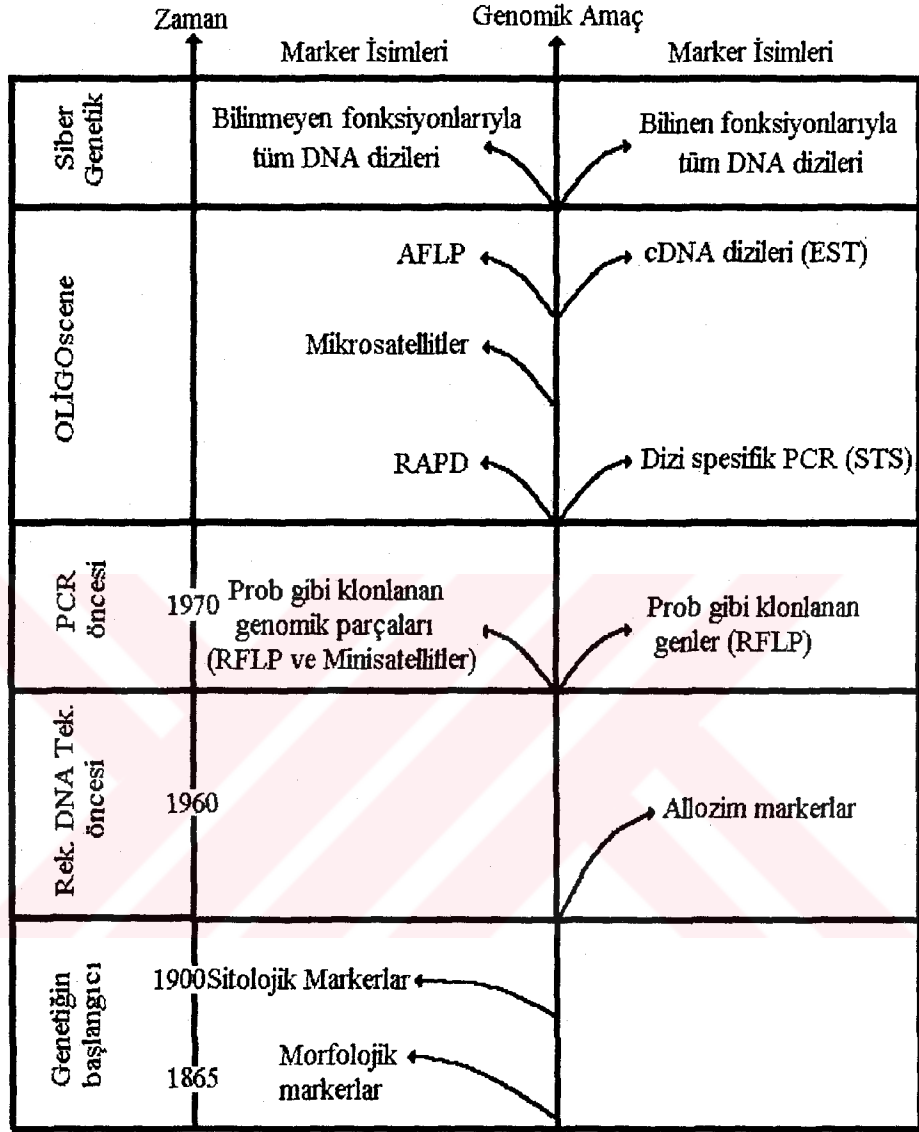
Moleküler biyolojinin gelişmesiyle zirai bitkileri de içeren yüksek yapılı organizmaların hızlı ve detaylı genetik analizleri için uygun araçlar gündeme gelmiştir. Bitki yetiştiricileri, farklı koşullar altında ve farklı türlerde yetiştirme programlarını geliştirmek için çözümler bulmaktadırlar [9,10]. İlgilenilen genlerin markerlerinin elde edilmesiyle, genler arasındaki rekombinasyon belirlenir. Zirai bitkiler, büyük genoma sahiptirler. Bunların çok küçük fraksiyonları iki birey arasında farklı olsa bile, çok sayıda DNA markerinin olması bunu çözümler. Kontrol çaprazlaması sonucunda üretilen deneysel bir populasyon için; allel sayısı ve allellerin popülasyondaki sıklığı belirlenir.

1.2.1.1 Morfolojik Markerler

Başlangıçta, haritalama çalışmaları, şekil, renk, büyüklük ya da yükseklik gibi Mendel kalıtımında farklılık gösteren özellikler üzerine odaklanmıştır. Sonuç olarak morfolojik özellikler, genlerle kontrol edilirler. Bu durumda morfolojik karakterler (fenotipler), spesifik genler için güvenilir göstergelerdir. Morfolojik markerler en kolay elde edilebilen veriler olması nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sayede pek çok hayvan ve bitki türünün ayırt edilmesindeki öneme sahiptir. Morfolojik markerler olarak tespit edilen varyasyonların kaynağı genomda ortaya çıkan mutasyonlardır [5].

1.2.1.2 Sitogenetik Markerler

Kromozom düzeyde karşılaştırmalı analiz, tür içinde ya da çok yakın akraba türler arasında genomun evrimsel sürecini çalışmak için kullanılmaktadır. Kromozom bant teknikleri ve kromozom spesifik boyama teknikleri kromozomlardaki varyasyonun belirlenmesi için büyük bir mesafe elde edilmesini sağlamıştır. Mitotik kromozomlarda elde edilen bu bantların çoğu, büyük tekrarlı dizilerle bağlantılıdır. Örneğin, kültüre alınan poliploid buğdayın genom orijini C-bant tekniği kullanılarak çalışıldı [11]. Bununla birlikte bant örneklerinin tür içindeki markerlerdeki faydası sınırlıdır çünkü bant varyasyonu düşüktür.



Şekil 1.3 Genetik Markerler eldesinde tarihsel gelişim [5].

1.2.1.3 Protein Markerler

Proteinler, genlerin ekspresyonu sonucu ortaya çıkan ürünlerdir. Genlerin farklı allelleri, proteinlerde farklı amino asit kompozisyonu, büyüklük ya da modifikasyonlarla sonuçlanabilir. Yüksek ya da büyüklükteki farklılıklar, jel elektroforezi ile kolaylıkla belirlenebilirler ve genetik markerler olarak

kullanılabilirler. Tanımlanabilir protein varyasyonunun çoğu, protein kodlayan yapısal gende ya da regülatör dizideki allelik dizi varyasyonudur. Alternatif olarak bazı protein varyasyonları ise translasyon sonrası modifikasyonlar sonucunda ortaya çıkar ve genetik markerler olarak kullanımları kullanışlı değildir. Protein markerlerinin en yaygın olarak kullanılan tipi, izozim markerleridir. İzozimler, elektroforetik göçte farklılık gösteren enzimlerin alternatif formlarıdır, fakat aynı enzim aktivitesine sahiptirler. İzozimlerin farklı formları, poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenebilir [5]. DNA markerleri keşfedilmeden önce, izozimler yaygın olarak mısır, buğday, arpa ve diğer pek çok bitki türünde kullanılmaktaydı [12] ve hala DNA markerleri ile karşılaştırmalı analizler olarak kullanılmaktadır.

1.2.1.4 DNA Markerleri

DNA markerü, bir tür içinde dizi polimorfizmi gösteren tipik olarak küçük DNA bölgesidir. DNA'nın küçük bir bölgesindeki varyasyonu belirlemek için iki yaklaşım vardır [5].

(1) Polimorfik parça, nükleik asit hibridizasyonu ile belirlenebilir. Hibridizasyonda, aynı ya da yakın akraba türden saflaştırılan aynı lokustaki başka bir fragment kullanılarak yapılmaktadır. Önceden bilinen parça, ilgilenilen parça ile homoloji gösteren DNA dizileri eşleşir ve etiketlenir sonra komplementer baz çiftleri ile ilgilenilen parçanın belirlenmesi için bir prob gibi kullanılır Bu yöntem RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) markerlerinin temelini oluşturmaktadır. Bu yöntemde, DNA polimorfizmin belirlenmesinde hibridizasyon yanında jel elektroforezide kullanılmaktadır.

(2) Bu amaçla Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) [13,14] kullanılarak polimorfik diziler belirlenebilir. Bu yöntem, hedef DNA parçasını çoğaltmak için DNA dizisi bilinen iki primer kullanılır (Şekil.1.4). İlk defa 1986 yılında keşfedilen bu yöntem, hem DNA hem de RNA analizinde kullanılan yeni tekniklerin hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamıştır [15]. Son yıllarda PCR, moleküler biyolojide rutin olarak kullanılan en önemli teknik haline gelmiştir. PCR tabanlı yöntemlerin en büyük avantajları, hızlı, ucuz ve az miktarda DNA gerektirmesidir. PCR, ya

dominant ya da kodominant veriler verir. Mikrosatellitler, STS (Dizi etiketli bölgeler), EST (Ekspre edilen dizi etiketleri) vb. yöntemler dizi spesifik PCR'a dayandırılmış genetik markerler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tesadüfi seçilmiş primerler, aynı zamanda tesadüfi polimorfik DNA çoğaltmak için kullanılmaktadır. RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) ve AFLP (Çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi), bu tip markerlere örnek teşkil etmektedir [5].

1.2.1.5 RFLP Markerleri

DNA temelli marker sistemlerinin kullanılması, ilk defa 1970'li yılların ortalarında RFLP marker sistemlerinin gelişmesiyle mümkün oldu [16]. RFLP markerleri, genetiği çalışılan organizmaların tümünde genetik analizlerde kullanılmaktadır. Allelik DNA dizileri arasındaki farklılıktan doğan RFLP, Southern blot hibridizasyonlarında restriksiyon endonükleazların kesimiyle ortaya çıkmaktadır. Çünkü RFLP markerlerinin çoğu kodominanttır (heterozigotlar, homozigotlardan ayırdedilebilirler). RFLP, verilen bir lokusta tüm genetik bilgiyi verir. Onlar tipik olarak nötraldirler ve çoğu genomda en azından daha önce kullanılan izozim markerleriyle karşılaştırıldığında oldukça çokturlar. Bu marker sistemlerinin dezavantajları arasında, klonlanan ya da izole edilen DNA dizilerinin işaretlenmesine yönelik çalışmalarda kullanımı oldukça zahmetlidir [4].

1.2.1.6 Mini ve Mikrosatellit DNA Markerleri

“Minisatellitler, uzunlukları genomda 9-100 bp arasında değişen aynı zamanda VNTR olarak da bilinen kısa-tekrarlı dizilerdir. Tekrarların sayısı her bireyde farklılık gösterir. VNTR (Değişken ardışık dizi tekrarları), ya hibridizasyon ya da PCR yöntemleri kullanılarak belirlenebilirler.

Mikrosatellitler, büyüklükleri 1-6 bp arasında değişen tandem tekrarlı DNA dizileridir. Mikrosatellit, SSR (Basit dizi tekrarı) olarak da isimlendirilmektedir. Mikrosatellitler için tekrarların sayısı genellikle 100'den azdır. Mikrosatellit varyasyonu, tekrarların sayısındaki farklılıklara bağlıdır. Varyasyon, tekrarlanan dizilerini çoğaltmak ve jel üzerinde görüntülemek suretiyle belirlenebilir.

Mikrosatellitler, pek çok bitki ve hayvanda yüksek varyasyon gösterir. Bu dizilerin en yaygın formları di-nükleotid tekrarlarıdır. Mikrosatellitlerin aynı zamanda tri- ve tetra-nükleotid tekrarları da bulunmaktadır. Farklı bitki ve hayvan türleri, genomlarında mikrosatellit varyasyonunun farklı dağılımlarını göstermektedir. Bu özellikleri sebebiyle genetik marker olarak kullanılmaktadırlar. Şimdiye kadar bitki türlerinde sınırlı sayıda mikrosatellit markerü bulunmuştur [5, s.70-73].

1.2.1.7 STS ve EST Markerleri

Dizisi etiketlenmiş bölgeler (STS), [17] ilk olarak belirlenmiştir. STS, genellikle 300bp uzunluğunda genomda tek olarak bulunan dizilerdir. İlk olarak STS dizileri, insan genom projesinde kromozomların fiziksel haritalanmasında aynı klonların bu bölgelerden üst üste çakışması sonucunda bulunmuştur. Bu yüzden STS ilk önce fiziksel haritalamada büyük parçaları birleştirmek için kullanılmıştır. Polimorfik STS markerleri, bitkilerde genom analizleri için yaygın olarak kullanılmaktadır [18].

Ekspres edilmiş dizi etiketleri (EST), cDNA (Komplamenter DNA) klonlarından türemiş STS'lerin bir alt çeşididir. EST'lerde STS'lerde aynı amaç doğrultusunda kullanılmaktadır. EST'ler ekspres edilen genlerden türevlenmiş olmalarından dolayı daha avantajlıdır. Bu yüzden genetik marker olarak, fonksiyonel genlere ait parçalar oldukları için fonksiyonel olmayan DNA bölgelerine tesadüfi bağlanan marker tekniklerine göre daha kullanışlıdır. Bu yüzden, tekrar sayısı fazla olan çok büyük genoma sahip organizmalar için oldukça avantajlıdır. Bu teknikler çoğunlukla kodominant marker üretmektedir. Otomasyona uygunlukları, kolay, ucuz ve hızlı olmaları avantaj sağlamaktadır [5].

1.2.1.8 SSCP Markerleri

“Eğer tek bir nükleotid değişimini içeren mutasyonları belirlenmesi isteniyorsa diğer yöntemler düşük kararlılık gösterirler. Bu sebeple 1000 bp'den daha fazla büyüklükteki tüm parçanın nükleotid dizisindeki değişiklikleri belirleyen

bir yöntem geliştirildi. Bu yöntem, tek zincir konformasyonel polimorfizm (SSCP) olarak isimlendirilmektedir. SSCP, tek nükleoid değişimi bile belirlemektedir. Denatüre olmayan poliakrilamid jelde tek-zincir DNA'nın hareketi hem büyüklük hem de dizi karakteristiğine bağlıdır. DNA dizisindeki değişiklikler, konformasyonel değişimlere sebep olur ve elektroforetik harekette değişikliklerin ortaya çıkması ile sonuçlanır. SSCP iki şekilde uygulanır. (1) DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir ve konformasyonuna göre ayrılması için jelde yürütülür. Jel, Southern Blot yapılır ve spesifik fragment hibridizasyon için prob olarak kullanılır. (2) Konformasyonel jelde yürütülen spesifik parça PCR ile çoğaltılır” [5, s.74].

1.2.1.9 AFLP Markerleri

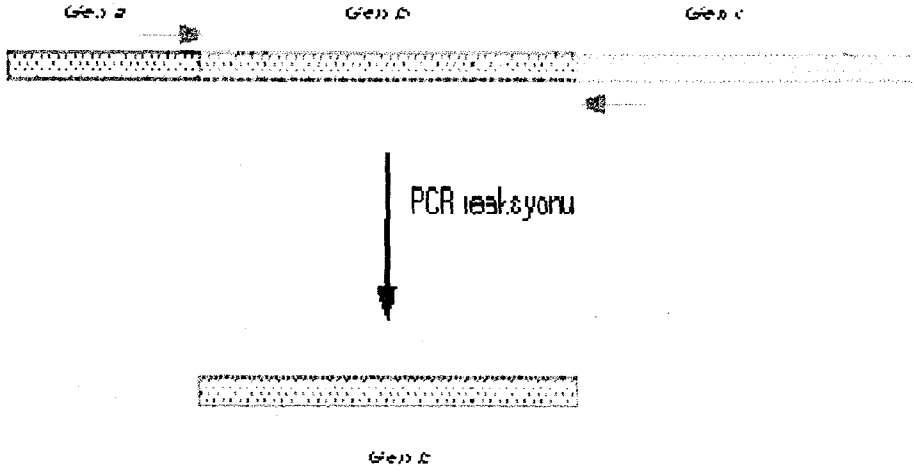
AFLP tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntem, restriksiyon enzim kesimiyle meydana gelen DNA parçalarının bir setini çoğaltmak için PCR kullanılır. Parça uzunluk polimorfizmi, RFLP markerlerinde yapıldığı gibi standart enzim kesimlerinden sonuçlanmaktadır. Genomik DNA, seyrek ve sık kesim (*EcoRI* ve *MseI* vb.) yapan iki restriksiyon enzimiyle kesilir. Adaptörler, spesifik restriksiyon bölgelerinde genomik DNA'nın uçlarına bağlanırlar. Farklı restriksiyon enzimlerinin herbiri için adaptörler ayrılır. Bu DNA, PCR reaksiyonu için kalıp oluşturur. Farklı primerler, farklı parçaları çoğaltmak amaçlı kullanılırlar. Primer adaptör diziyeye, restriksiyon bölgeye, seçici nükleotidlere spesifik olmalıdır. Primerlerden biri uç işaretlidir ve sadece işaretli çoğaltılmış parçalar görüntülenir. PCR ürünleri denatüre poliakrilamid jelde gözlenir. AFLP bantları genellikle dominant markerler gibidir; fakat uzunluk polimorfizmleri genellikle kodominant markerler gibidir [19].

1.2.1.10 RAPD Markerleri

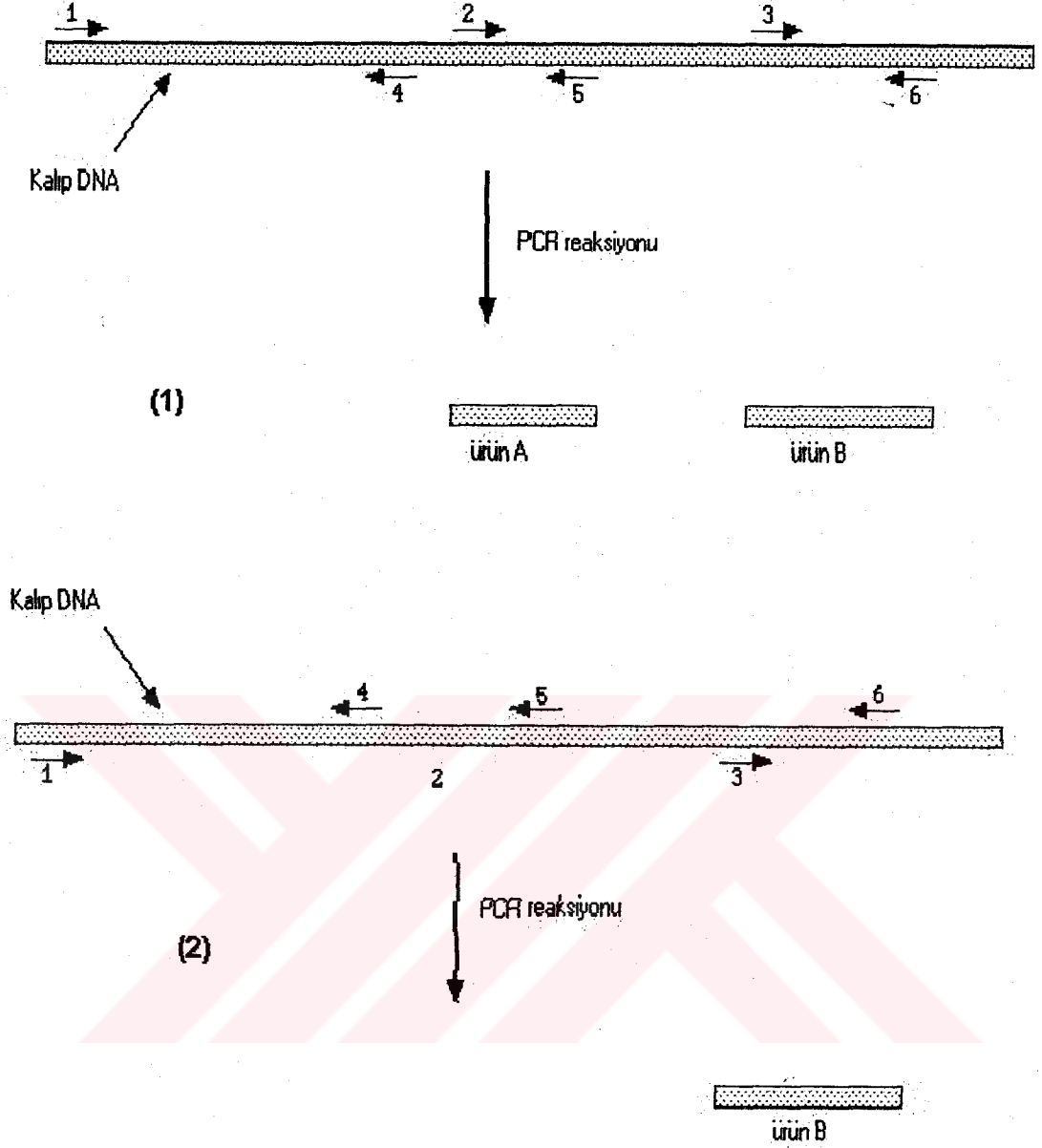
RAPD analizleri, ilk defa Williams ve ark. 1990 tarafından orijinal olarak tanımlandı [20]. RAPD amplifikasyon prosedürü, esnek koşullar altında, rastgele bir primerle başlatılan genomik bir kalıbın analizine dayalı PCR reaksiyonudur [20,21]. Amplifikasyonu gerçekleştikten sonra farklı ürünler meydana gelir (Şekil 1.5). Bu ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrılır ve EtBr boyaması ile U.V ilüminatörde

ürün gözlenir (Şekil 1.6). Genomdaki bir bölgeden elde edilen her bir ürün, primerle kısmen homoloji gösteren çoğaltılmış iki kısa DNA segmenti içerir. Bu segmentler, DNA zincirlerine ters olmalıdır ve DNA amplifikasyonuna izin verecek şekilde birbirine yeterince yakın olmalıdır. Kısa primerlerin kullanımı, (genellikle 10 nükleotid büyüklüğünde) esnek koşullarda kalıba bağlanmalarıyla organizmaların büyük bölümünde etkili olur ve sonuçta bu primerlerle çok sayıda ürün çoğaltılır. Primerin DNA dizisi ve kalıp arasında mükemmel bir eşleşme olursa, primer DNA sentezini başlatır. Bu protokol, amplifikasyon için kullanılan primerin uzunluğuna, primerin GC içeriğine, primer dizisindeki tek bir nükleotid yer değişimlerine duyarlıdır [20].

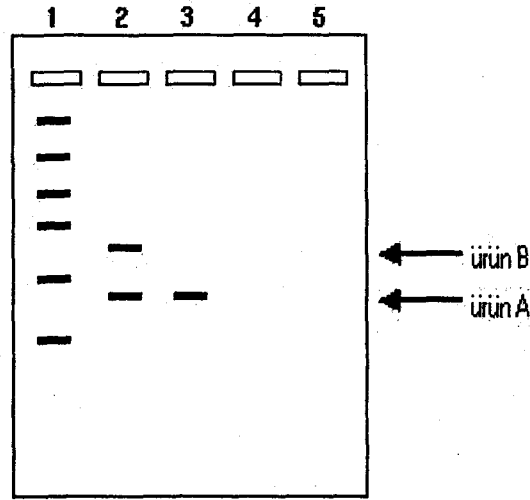
RAPD protokolü sonucunda elde edilecek sonuç üzerinde pek çok farklı parametreler etkilidir [20]. En önemli iki etken, kalıp DNA'nın kalitesi ve miktarıdır. Çünkü farklı organizmalar ve DNA izolasyon yöntemleri, farklı safılıkta ve kalitede DNA üretilmesine sebep olur. Bu protokolün her bir aşamasında kullanılan DNA miktarının optimize edilmesi gerekir. RAPD reaksiyonunda çok az miktardaki DNA kullanımı tekrarlanabilirliği olamayan bant örneklerinin oluşmasına sebep olur; tekrar deneylerinde ise bazı bantlar beklenmedik bir şekilde görülür ve reaksiyon karışıklık yaratır. Diğer taraftan çok sayıda DNA kullanımı ise simir görüntüsü ya da tanımlanamayan bantlarla sonuçlanır. Diğer değişkenler, Mg iyonu konsantrasyonu [22-24]; primer konsantrasyonu [20,25]; DNA polimeraz konsantrasyonu ve tipi [23]; bağlanma sıcaklığı [26]; erime ve bağlanma sıcaklıkları arasındaki geçiş [27]; ve denaturasyon, bağlanma, uzama zamanları [28] olarak araştırmalar sonucunda bulunmuştur. Yukarıda bahsedilen parametreler, bant örneklerinin yeniden üretilebilir olması için uygun bir dizide olmalıdır. Çünkü bu parametreler birbirine bağlıdır. Bu yüzden farklı olabilen amplifikasyon protokolleri geliştirilmiştir bunda, özgüllüğü ve koşulların tekrar edilebilirliği amaçlamaktadır [4].



Şekil 1.4 Standart PCR reaksiyonu: Şekildeki DNA parçası üç gen içermektedir. Çoğaltılması hedeflenen parça B genidir. Gen B'nin heriki ucuna bağlanabilecek iki primer hazırlanır. Sadece B geni çoğaltılır ve daha sonra yapılacak olan analizler için saflaştırılabilir [19].



Şekil 1.5 RAPD-PCR Reaksiyonu: (1) Oklar, aynı diziye sahip bir primerin çoklu kopyalarını göstermektedir. Okların yönü, aynı zamanda meydana gelecek DNA sentezinin de yönünü belirlemektedir. Sayılar, DNA kalıbındaki primerlerin bağlanacağı bölgeleri göstermektedir. Primerler, kalıbının alt zinciri üzerinde 1,2 ve 3 ve üst zincirinde 4,5 ve 6 bölgelerinden bağlanırlar. Bu örnekte, sadece iki RAPD PCR ürünü meydana gelmektedir. Ürün A, 2 ve 5 pozisyonlarında bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılması ile elde edilir. Ürün B, 3 ve 5 pozisyonlarında bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılması ile elde edilir. (2) Bu şekilde, primer ikinci bölgeye bağlanabilecek büyüklükte değildir. Sonuçta, ürün A elde edilemez. Sadece ürün B elde edilir. [19].



Hat 1. Moleküler Ağırlık Markeri
 Hat2. RAPD Reaksiyonu 1
 Hat3. RAPD Reaksiyonu 2

Şekil 1.6 RAPD Reaksiyon 1 ve reaksiyon 2 ürünlerinin agaroz jel analizi [19].

1.2.1.10.1 RAPD Marker Sisteminin Karakteristikleri:

DNA dizilerinin biri ya da ikisi açısından ortaya çıkan farklılıklar, özgün RAPD bantlarının varlığı ya da yokluğu durumunda polimorfizm gösterir. Böylelikle tanımlanan genetik varyasyon, dominant genetik markerler gibi davranır. Bunun aksine, amplifike olan DNA dizilerindeki delesyonlar ya da insersiyonların varlığı, kodominant bir şekilde davranan genetik varyantlarda sonuçlanır. Heterozigotlar, her iki homozigotlardan ayırt edilmektedir. Bununla birlikte, RAPD protokolünde ortaya çıkan polimorfizmin büyük çoğunluğu, dominanttır. Bu özellik, RAPD markerlerini genellikle kodominant veri veren RFLP markerlerinden ayırt eder [4].

Çeşitli çalışmalarda, ya türler içinde [29] ya da farklı türler arasında [30] genetik akrabalıkları belirlemede kullanılan RFLP ve RAPD markerleri karşılaştırılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda bir tür içindeki genetik akrabalıkların tanımlanması için RAPD ve RFLP birbiri arasında eşdeğer bir kararlılık seviyesi bulundu [30]. Farklı bir çalışmada ise RAPD ve RFLP markerlerinin genotipleme

maliyetlerinin karşılaştırılması yapıldı [31]. Küçük örnekler içeren çalışmalar için RAPD daha masraflı bulunmasına karşılık daha geniş büyüklükteki örnekler için RFLP göre daha avantajlıdır. Bazı çalışmalarda ise RAPD ve izozim markerleri karşılaştırılmaktadır. İzozimler tarafından tanımlanamayan birbirine çok yakın soylar arasındaki akrabalığı RAPD ile daha doğru bir şekilde tanımlamak mümkün olmaktadır.

RAPD sisteminin diğer bir karakteristiği ise oluşan amplifikasyon ürünlerinin yoğunluğu ve sayısı, reaksiyon koşullarındaki en küçük değişikliklerde bile farklılıklar gösterebilir [32]. Tutarlı ürün elde etme sürecinde karşılaşılan bu problem, RAPD reaksiyon koşullarının dikkatli bir şekilde standardizasyonunu gerektirir [4].

1.2.1.10.2 RAPD Marker Sistemlerinin Uygulama Alanları

RAPD marker sistemi ilk olarak 1990 yıllarında iki farklı araştırmacı grup tarafından tanımlandı [20,21]. AP-PCR da olarak adlandırılan bu sistemin getirdiği pek çok avantaj nedeniyle, çok sayıda grup çalışmalarında bu marker sistemini kullanmaya başladı. RAPD markerleri (RAPD), genom yapısıyla ilgili araştırmalarda ve çeşitli taksonomik ve evlasyonel çalışmalarda; genotip belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda ekoloji ve populasyon biyolojisinde yaygın kullanım alanı bulmaktadır [4].

RAPD teknolojisi, hem prokaryotik hem de ökaryotik çok sayıdaki tür için DNA parmak izlerini belirlemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu parmak izleri, bireylerin ayrımı, prenatal tanı, klinik tanı, soy belirleme, ebeveyn belirleme testi, adli tıp ve epidemiyolojileri gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Botanikte, pek çok türde bilgi verici sistemlere gereksinim duyulduğu için, genetik varyasyon çalışmalarında olanak tanır. Kakao [33], kırmızı yabanmersini [34], kereviz [35], çay [36], ve gül [37] gibi türlerde RAPD kullanılarak genetik farklılıklara araştırılmaktadır. Bu teknoloji, bitkilerde oldukça geniş kullanım alanı bulmaktadır.

RAPD markerleri, aynı zamanda pek çok farklı türde genetik haritaların yapılmasında kullanılmaktadır. Bu uygulama alanında bitkilerle ilgili çalışmalarda kullanılmıştır. Üzüm [38] bitkisinde genetik harita oluşturuldu. Bu haritalar, ya projenin amacı ya da kantitatif özelliğe ilişkin lokusların belirlenmesini amaçlayan çalışmaların ek bir çalışması olarak yapılmaktadır. Özellikle ağaç yetiştiriciliğinde, RAPD markerlerini kullanımı yerini almıştır [4].

Sonuçta RAPD markerlerinin kullanımı, pek çok türde yapılan genetik çalışmalara olanak tanımaktadır. DNA dizileri ya da klon bantlarının analizi ile ilgili daha önce bilgi yoktu, RAPD sistemi ise bunu yapmak için kolay ve ucuz bir teknik olması sebebiyle önemli bir tekniktir [4].

1.3 Zeytinde Yapılan Moleküler Sistemik Çalışmaları

Özellikle ekonomik öneme sahip meyve veren ağaçlarda genetik çeşitliliği belirlemek genetik araştırmalar için önemli araştırma konularından biri olmuştur. Hem yabani hem de kültüre alınan formlar arasındaki genetik çeşitliliğin karakterizasyonu, onlar arasındaki benzerlikleri çalışmak ve kültürlerin orijinlerini belirlemek için gereklidir.

Zeytin ağacı, Akdeniz Medeniyetinin tarihsel süreci ile yakından ilişkilidir ve en azından 9000 yıllık bir geçmişi vardır. Yakın geçmişe kadar bitkiler arasındaki ilişki morfolojik özelliklere bakılarak yapıyordu. Son zamanlarda, zeytin varyasyonu, genom organizasyonu, sofralık zeytin ve zeytinyağı verimini etkileyen genetik temeller üzerine araştırmalar yapıldı. Günümüzde zeytin ağaçları arasındaki genetik varyasyonu detaylı olarak incelemek mümkün hale gelmiştir. Bu amaçla farklı tipte DNA-tabanlı moleküler marker tipleri (RFLP, RAPD, AFLP, SSR) kullanılmaktadır [39,40]. Zeytin ağaçlarındaki varyasyon geleneksel olarak morfolojik ve fenolojik karakter üzerinde saptandı. Bu amaçla bazı İtalyan zeytin genotipleri morfolojik karaktere göre son yıllarda değerlendirilmiştir [41]. Moleküler markerler, zeytin varyeteleri arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek ve basit ya da kompleks özellikleri etkileyen lokus haritalamasında ve belirlenmesinde (QTL) kullanılmıştır [42]. İzozim ve DNA bazlı analizler son yıllarda farklı Akdeniz

ülkelerindeki zeytin varyeteleri arasındaki genotipleri belirlemede ve sınıflandırmada kullanılmıştır [43-52]. Akdeniz Bölgesinden toplanan yabani ve kültüre alınan zeytin genotipleri arasındaki genetik ilişki, AFLP [53] ve RAPD ve mitokondriyal RFLP [54] kullanılarak belirlendi. Ayrıca zeytinde SSR markerleri ile ilgili çalışmalar yapıldı [54-57]. Kültüre alınan zeytin ve yabani zeytin arasındaki genetik ilişki izozimler [58] ve RAPD [54,59] kullanılarak yapıldı. Besnard G. ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada RAPD markerleri ve mitokondriyal RFLP markerleri kullanılarak kültüre alınan bir grup yabani zeytin ile doğal populasyonlar arasındaki genetik ilişki saptandı [59]. *Olea* genusunun yapısına ilişkin moleküler yaklaşımlar ve diğer *Oleaceae* familyalarıyla olan akrabalıkları Besnard G. ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada, ribozomal RNA, RFLP ve RAPD varyasyonları, *Oleaceae* genera için ait olduğu taxada incelendi. *Olea* genusunun taksonomik pozisyonu ve komponentleri belirlendi [60]. Başka bir çalışmada ise, Doğu ve Batı Akdenizdeki feral zeytin ve yabani zeytin arasındaki morfolojik olarak belirlenemeyen genetik farklılık mitokondriyal DNA varyasyonu ve RAPD kullanılarak açığa çıkarıldı. [61]. Zeytin ağacındaki genetik varyasyonu belirlemek için yapılan çalışmalar, genellikle İtalya, Yunanistan ve İspanya yöresindeki zeytinleri kapsamakta olup, Türkiye'deki kültüre alınan zeytin klonlarındaki genetik ilişki tespitine yönelik bilgilerimize göre rapor edilmiş bir çalışma ne yazık ki mevcut değildir.

1.4 Çalışmada Kullanılan Zeytin Klonlarının Özellikleri

Bu çalışmada kullanılan zeytin soylarına ait genel özellikler, Luma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla belirlenmiştir [62]. Türkiye'nin en önemli yağlık zeytin üretim bölgesi olan Edremit Körfez Bölgesi'nde beş yıl süren çalışma ile verimi yüksek, periyodisiteye eğilimi az, yağ oranı yüksek olan, iri taneli ve küçük çekirdekli değerli tipleri bulmaya çalışmışlardır. Daha sonra beş yıl süren gözlem ve laboratuvar çalışmaları sonucunda üstün özelliklere sahip ağaçlar tespit edilmiştir [62]. Bu ağaçlar, önce toplam puan açısından sıralanmış ve sonra da yüzde yağ verimi, tane iriliği ile et/çekirdek oranı bakımından ayrı ayrı sıralamaya koymuşlar. Sonuçta toplam puan açısından en yüksek puanları alan UB-3, 0108, UB-1, UB-8,

UB10 klonları, tane iriliği ile et/çekirdek oranı bakımından 0308 klonu bizim çalışmamızda genetik kaynak olarak kullanılacaktır. Bu klonlara ait değerler Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2 Edremit yöresindeki kültüre alınan farklı zeytin klonlarına ait olan değerler [62].

Klon Adı	Periyodisite Katsayısı	% Yağ	Kg'da dane sayısı	Et/Çekirdek	Verim	Toplam Puan
UB-3	0.194	25.45	327	3.37	2.75	7500
0108	0.381	27.00	340	3.46	2.40	7125
UB-1	0.219	21.07	412	3.21	2.75	6875
UB-8	0.173	21.11	397	2.97	2.50	6750
UB-10	0.141	23.29	405	2.96	2.50	6750
0308	0.732	19.70	313	4.19	1.40	4375

1.5 Çalışmanın Perspektifi

Bu çalışma, Balıkesir ili Edremit yöresinde yetişen, ekonomik değeri olan zeytinyağı üretiminde kullanılan bazı zeytin klonları arasındaki genetik ilişkileri belirlemek amacıyla yapılmıştır.

- (I) Bu amaç doğrultusunda belirlenen altı zeytin klonundan yaprak örnekleri alınıp DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA RAPD-PCR'da test edilerek bu prosedüre uygun DNA izolasyonunu belirlenmeye çalışıldı.
- (II) RAPD-PCR oldukça hassas bir teknik olması itibariyle, yüksek varyasyon göstermesi nedeniyle reaksiyon koşulları detaylı bir şekilde optimize edildi.
- (III) Son olarak da zeytin klonları arasındaki genetik polimorfizmin RAPD marker sistemleri kullanılarak belirlenmesi amaçlandı.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar, Sigma Chemical Company ve Merck tarafından temin edilmiştir. RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal ve enzimler MBI Fermentas firmasından sağlanmıştır.

2.1.2 Solusyonlar

2.1.2.1 Della Porta yöntemine Göre Yapılan gDNA İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar

Çizelge 2.1. Dellaporta'ya göre yapılan gDNA izolasyonu yönteminde [63] kullanılan solusyonlar ve içerikleri

Solusyonlar	Kompozisyonu
Ekstraksiyon Tamponu	0.1M Tris HCl pH:8 0.05M EDTA pH:8 0.5M NaCl 10µl 2-merkaptoetanol
SDS	%20
Potasyum Asetat	5M
TE1	0.05M Tris pH:8 0.001M EDTA pH:8
TE2	0.01M Tris pH:8 0.001M EDTA pH:8
Sodyum Asetat	3M

2.1.2.2 CTAB Yöntemuna Göre Yapılan gDNA İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar

Çizelge 2.2 CTAB yöntemuna göre yapılan gDNA izolasyonunda [64] kullanılan solusyonlar ve içerikleri

Solusyonlar ve Kompozisyonu	
Ayrıştırma Tamponu	0.05 M Tris HCl pH:8, 0.01M EDTA pH:8, 0.7M NaCl, % 1 CTAB, %0.1-2-merkaptoetanol.
1 M Tris	
5 M NaCl	
0.5 EDTA	
3 M Sodyum Asetat	
5 M Potasyum Asetat	
% 20 SDS	

2.1.2.3 Modifiye Edilmiş Yönteme Göre Yapılan gDNA İzolasyonunda Kullanılan Solusyonlar

Çizelge 2.3 Modifiye edilmiş yönteme göre yapılan gDNA izolasyonunda [65] kullanılan solusyonlar ve içerikleri.

Solusyonlar ve Kompozisyonu	
Ekstraksiyon Tamponu	0.1M Tris pH:8
	0.05M EDTA pH:8
	0.5M NaCl
	%0.07 2-merkaptoetanol
% 10 SDS	
24:1 Kloroform-İzoamil alkol	
% 70 ve % 100 Etanol	
Fenol pH 8	
2M NaCl	
TE pH 8	0.01M Tris pH:8
	0.001M EDTA pH:8

2.1.2.4 Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Solusyonlar

Çizelge 2.4 Agaroz Jel Elektrofrezinde kullanılan solusyonlar ve içerikleri

Solusyonlar	Kompozisyonu
TBE (5X)	54g Tris-base
	1lt 27.5g Borik Asit
	20ml 0.5M EDTA pH:8
Yükleme Boyası	

2.1.2.5 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler

Bu çalışmada kullanılacak primerler, 1ml ddH₂O içerisinde çözülerek stok hazırlandı. Her bir primerin son konsantrasyonu 50 nmol olacak şekilde sulandırıldı. Primerler Sigma Genosys'de sentez ettirilmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin DNA dizileri, erime sıcaklıkları (T_m) ve % GC oranları Çizelge 2.5'de verilmektedir.

Çizelge 2.5.RAPD-PCR Reaksiyonunda kullanılan primerler ve T_m değerleri

Primer	DNA dizileri	T _m	GC%
OPA-01	CAG GCC CTT C	34°C	% 70
OPA-12	TCG GCG ATA G	32°C	% 60
OPB-03	CAT CCC CCT G	34°C	% 70
OPB-08	GTC CAC ACG G	34°C	% 70
OPB-12	CCT TGA CGC A	32°C	% 60
OPC-01	TTC GAG CCA G	32°C	% 60
OPD 01	ACC GCC AAG G	34	% 70
FSJ 01	GCC AGC TGT ACG	40	% 66,6
FSJ 02	ACT GGC CGA GGG	42	% 75
A 17	GAC CGC TTG T	33,7	%60
WINK	CGC TGG CCT A	41,7	% 70

2.1.3 Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan zeytin klonlarına ait yaprak örnekleri Balıkesir İlinde bulunan Tarım Köy İşleri Bakanlığı Edremit Zeytincilik Fidancılık Araştırma Merkezinden sağlandı. Bu çalışmada 6 farklı zeytin klonu seçildi ve taze yaprak materyali toplanarak genomik DNA ekstraksiyonuna kadar -80C'de muhafaza edildi.

2.1.4 Kullanılan Ekipman

Çizelge 2.6 Çalışmada kullanılan gereçler ve modelleri

Kullanılan Gereç	Modeli
-80°C ultralow derin dondurucu	Sanyo, Japonya
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
PH Metre	WTW, Almanya
Polaroid Gel Cam	Gel Cam, İngiltere
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
Santrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Almanya
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
UV- iluminator	Vilber Lourmat (IVA), Fransa
UV visible Spektrofotometreler	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Cam malzeme ve plastik malzemenin hazırlanması:

Isıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları, epindorflar, santrifüj tüpleri, solusyonlar ve cam malzeme 121°C' de 20 dak (1,02 atm basıçta) otoklavda steril edildi.

2.2.2 Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

Bu çalışmada, altı farklı zeytin klonu DNA ekstraksiyonu için seçildi. Ekstraksiyon, bitkinin yapraklarından yapıldı. Zeytin için üç farklı DNA izolasyon yöntemi denendi.

2.2.2.1 Della Porta Yöntemine göre Zeytin'den gDNA İzolasyonu

İlk olarak, Della Porta ve ark. (1983) tarafından rapor edilen DNA ekstraksiyon yöntemi kullanıldı [63]. -80' de korunan taze bitki örneklerinden 1 gr tartıldı ve steril bir havanda sıvı nitrojen yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezildi. Steril bir santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 15 ml ekstraksiyon tamponu (100mM Tris-pH: 8.0; 50mM EDTA-pH: 8.0; 500mM NaCl; 12.9µl β-merkaptoetanol) eklendi. Karışıma 1 ml % 20'lik SDS eklenip hızlı bir şekilde çalkalandı. Tüpün kapağı çıkarıldıktan sonra, 65°C' de 10 dak. inkübasona bırakıldı. Daha sonra, 5 ml 5M potasyum asetat eklendi ve çalkalandıktan sonra karışım buz üzerinde 20 dak. bekletildi. Karışım 16 000 rpm'de 20 dak. santrifüj edildi. Süpernetant alttaki çözelti ile karıştırılmadan yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 10 ml izopropanol (soğuk olmalı) eklendi. Daha sonra karışım -20°C' de 30 dak. bekletildikten sonra 14 000 rpm 'de DNA 5 dak. çöktüldü. Süpernetant döküldükten sonra pelet kurumaya bırakıldı. Daha sonra içine 400 µl TE1 (50 mM Tris-pH: 8.0; 10 mM EDTA-pH: 8.0) ekleyip pipet yardımıyla pelet çözüldü. 75µl 3M sodyum asetat, 500 µl izopropanol ekledikten sonra mikrosantrifüjde 30 sn. çöktürüldü. Süpernetant uzaklaştırıldı ve 1ml %80'lik EtOH ile 30 sn. santrifüj edildi. Daha sonra

pelet 1 sa. Kurutulup 400 µl TE2 (10mM Tris-pH: 8.0; 1mM EDTA-pH: 8.0) içinde çözüldü. DNA örnekleri +4C' de saklandı.

2.2.2.2 CTAB Yöntemine Göre Zeytin'den DNA İzolasyonu

İkinci olarak CTAB yöntemi Doyle ve Doyle (1987) kullanılarak zeytinden gDNA izolasyonu yapıldı [64]. -80' de korunan taze bitki örneklerinden 1 gr tartıldı ve steril bir havanda sıvı nitrojen yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezildi. 750µl CTAB (C₁₉H₁₂NBr, Hekzadtrimetilamonyumbromid) tamponu steril ependorf tüpe eklendi ve üzerine 2.5µl merkaptotanol ilave edildikten sonra birkaç kez ters düz edildi. Tüp parafilm ile sarıldıktan sonra, daha önceden sıcaklığı 65°C' ye getirilmiş su banyosunda 30 dak. İnkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üzerine 750µl kloroform-izoamil alkol (24:1) karışımı eklenerek ters düz edildi ve oluşan kitle görüldü. 7000 rpm, 25 °C, 5 dak. için santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant (650 µl) yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. 0.6 hacimde oda sıcaklığındaki mutlak izopropil alkol eklenerek ters düz edildi. 650µl süpernetant için 390µl izopropil alkol eklendi. 15000 rpm, 25C, 3-5 dak. için santrifüj edildi. İzopropil alkol uzaklaştırıldı. 1ml, 70% etanol tüpe eklenerek 15000rpm, 25C, 5 dak. için santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra, pelet havada kurutuldu. Elde edilen DNA, 200µl TE (10mM Tris-pH: 8.0; 1mM EDTA-pH: 8.0) içerisinde çözüldü. Elde edilen DNA solusyonu, 4°C' de saklandı.

2.2.2.3 Modifiye Edilmiş Yönteme Göre Zeytin'den gDNA İzolasyonu

Üçüncü olarak, bitki genomik DNA izolasyonu için hızlı bir yöntem Pich ve arkadaşlarından (1993) adapte edilmiştir [65]. Bu yöntem, büyük ölçüde değiştirilerek RAPD PCR'da kullanılmak üzere DNA izolasyonları yapıldı. -80'de korunan bitki yapraklarından 1 gr tartıldı. Bitki yaprakları, steril bir havanda sıvı nitrojen yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezildi. Steril ependorf tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 1 ml ekstraksiyon tamponu (100 mM Tris-pH: 8.0; 50 mM EDTA-pH: 8.0; 500mM NaCl ; % 0,07 2-ME) eklendi. 130 µl %10'luk SDS eklendikten sonra ters düz edildi. 65 C'de 5 dak. inkübasyona bırakıldı. 300µl 5M

Potasyum asetat karışıma eklenerek karıştırıldı ve karışım 30 dak. buzda bekletildi. Süpernetant (~800 µl) iki tüpe paylaştırıldı. Daha sonra fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu yapıldı [66]. Eşit hacimde (~400 µl) fenol her bir tüpe ilave edildi. 200 µl dH₂O tüplere ilave edildikten sonra 15 000 rpm 5 dak. santrifüj edildi. Süpernetant (~500 µl) yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µl kloroform-izoamil alkol eklendi. 15 000 rpm 5 dak. santrifüj edildi. Süpernetan yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 2 hacim mutlak EtOH eklendikten sonra 30 dak. buzda bekletildi. Daha sonra 14 000 rpm 5dak. santrifüj edildi ve süpernetant uzaklaştırıldı. %70'lik alkol ile pelet 30 sn. santrifüj edildi. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra pelet kurumaya bırakıldı ve DNA örneği 200 µl TE (10mM Tris-pH: 8.0; 1mM EDTA-pH: 8.0) içinde pipet yardımıyla çözüldü. DNA örnekleri +4°C'de saklandı.

Elde edilen DNA'daki polisakkaritlerden kaynaklanan kontaminasyonu engellemek için NaCl ile yıkama yöntemi [67] ile DNA örnekleri yıkandı. 5µg/µl TE (10mM Tris-pH: 8.0; 1mM EDTA-pH: 8.0) ile son hacim 500/µl' ye tamamlandı. Eşit hacimde 2M NaCl eklendi. Üzerine 2 hacim mutlak EtOH eklendi ve 30 dak. buzda bekletildi. 12000 rpm 10 dak. santrifüj edildi. EtOH uzaklaştırıldı ve pelet 1 ml %70'lik EtOH ile 3 dak. santrifüj edildi. Pelet kurutulduktan sonra 200 µl TE içerisinde çözüldü.+4°C' de DNA örnekleri saklandı.

2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi

Zeytin bitkisinden elde edilen genomik DNA'ları gözlemlemek için % 0.7'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 0.7g agaroz, 0.5X TBE tamponu içerisine konduktan sonra, ısıtıcıda agaroz eriyinceye kadar ısıtılır. İçerisine 0.5µg/ml Etidyum Bromid (EtBr) ilave edilir. Diğer tarafta kasetin içerisine tarak düzgün bir şekilde monte edilir. Hazırlanan kasete jel sıvı haldeyken dökülür ve polimerleşmesi beklenir. Jel, katılaştıktan sonra tarak yavaşça çıkarılır ve örnek yükleme kertikleri oluşturulur. Elektroferez tankına yerleştirilen jelin üzeri kaplanıncaya kadar 0.5X TBE tamponu ile doldurulur. 5µl dH₂O, 5µl DNA örnek, 3µl yükleme boyası başka bir tüpte karıştırılır ve yükleme kertiklerine otomatik pipet yardımı ile yükleme yapılır. Jele yükleme yapılırken bir kertige de parça

büyükükleri belli olan moleküler büyükükük markeri yüklenir. Jel, güç kaynağından 80V voltaj verilerek yaklaşık 1 sa. yürütüldü. DNA bantları, U.V ilüminatörde gözlendi ve polaroid jel makinesi ile fotoğrafları çekildi.

2.2.4 DNA Miktar Tayini

Her bir örneğın DNA konsantrasyonu, spektrofotometrede belirlendi. Başlangıçta, 2ml TE solusyonu küvete boşaltıldı. Küvet peçete ile kurutulduktan sonra cihazdaki kuyucuğa yerleştirildi. Cihaz sıfırlandı. 10µl DNA örneğı, 1990 ml TE ile karıştırılarak diğerk küvete kondu. DNA ölçümleri, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında alındı. En temiz 6 tane DNA örneğı PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere seçildi. Elde edilen son DNA konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$C_{260} = OD \times 50 \times \text{Sulandırma Faktörü}$$

2.2.5 Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu

Proteinler açısından temizlenecek olan DNA materyaline eşit hacimde fenol pH 8 ilave edilir. Vortekste 20 saniye ile 1 dakika arasında karıştırıldı ve 18000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. En üstteki faz, yeni bir epindorfa aktarıldı. Kloroform:izoamil alkol (24:1)'ün eşit volümü de alınarak 18000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernetant alınarak etanol presipitasyonu yapılır ve 40 µl TE'de çözülererek -20°C'de saklanır [66].

2.2.6 Etanol Presipitasyonu

Konsantre edilecek DNA içeren solusyona iki hacim %95 etanol eklenir. En az 30 dakika -20°C' de inkübe edilir. 10 dakika 18 000 rpm'de çevrilir. Supernetant atılır ve 1ml %70'lik etanol eklenerek 3 defa DNA pelleti yıkanır. Yıkamalar sonunda elde edilen pellet havada kurutulur ve en az 50 µl lik steril TE yada ddH2O eklenerek -20°C de saklanır.

2.2.7 RAPD-PCR

Zeytin Bitkisinden elde edilen genomik DNA kullanılarak yapılan RAPD-PCRda 25µl lik toplam hacimde yapılmıştır. 25µl lik hacimde, 25ng genomik DNA, 2mM dNTP, 2,5mM MgCl₂, 0,04U taq DNA Polimeraz, 0,6µM primer, 1X tampon olarak belirlendi. RAPD-PCR reaksiyon döngü koşulları aşağıda belirtilmiştir [68]. Dereceli bir şekilde, artan ön denaturasyon aşaması uygulanmıştır. 85°C'de 15 sn, 95°C'de 5 sn ve 92°C'de 1.55 dak ön denaturasyon aşamasından sonra 44 devir olarak asıl döngü koşulları uygulanmıştır. Buna göre asıl döngü koşulları 95°C de 5 sn, 92°C 55 sn, 37°C 1 dak., 72°C 2 dak'dır. En son olarak da 72°C 7 dak son uzama aşaması eklenmiştir.



3 BULGULAR

3.1 DNA İzolasyonunun Optimizasyonu

Bitkilerde DNA tabanlı moleküler tekniklerin uygulama alanlarının artması, ilgili bitkilerden yeterli saflıkta ve moleküler yöntemlere uygun olabilecek DNA eldesini gerekli kılmaktadır. Fakat bitkiler arasındaki kimyasal kompozisyon açısından doğan farklılıklar, elde edilen DNA'da pek çok safsızlığa neden olduğu bilinmektedir. Bu alanda kullanılan yöntemlerin çoğunda protein kirliliği problemi çözümlenirken, diğer kirleticilere değişken oranda içeren bitkilerden saf DNA eldesi problemlidir. Bu yüzden farklı bitkiler için farklı protokoller yada modifiye protokoller geliştirilmiştir. Fakat bu protokoller bile, çok değişken kimyasal içeriğe sahip olan bitki türleri için bile yetersiz kalmaktadır. Bitkilerde kullanılan farklı DNA protokollerinin değişik dezavantajları bulunmaktadır: (1) Düşük DNA ürünü; (2) Polifenol oksidaz aktivitesi ile bağlantılı kinon bileşenler DNA kırılmasına sebep olurlar; (3) Elde edilen DNA diğer kirleticiler (polifenoller ve diğer sekonder metabolitler).

Bu gibi kirleticiler ortamında bulunan DNA hızla degrade olur ve bu kirleticiler, DNA ile daha sonra yapılacak olan diğer enzimatik reaksiyonlarda, (restriksiyon endonükleaz, polimeraz ya da ligaz gibi) engelleyici nitelik taşımaktadır [69].

Bunun için, ilk olarak zeytin yaprak dokusundan genomik DNA izolasyonunun optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla uygulanan 3 farklı purifikasyon yöntemi karşılaştırıldı ve en uygun yöntem optimize edildi. Uygulanan yöntemin moleküler çalışmalarda uygunluğu, elde edilen DNA'nın RAPD-PCR reaksiyonlarında denenmesiyle test edildi.

İlk olarak Della Porta'ya göre gDNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi. Bu yöntem, elde edilen gDNA'lar, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında okunduktan sonra gDNA konsantrasyonları ve $A_{260/280}$ saflık oranları hesaplandı. Yöntemin büyük ölçekte bir teknik olması gereği oldukça konsantre DNA eldesi

ortalama 100-600mg/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen DNA'lar, 0,7 % agaroz jel elektroforezinde yürütülerek test edilmiştir. Yüksek DNA konsantrasyonu ile paralel olarak Şekil 3.1'de görüldüğü gibi, çok fazla RNA kirliliği de gözlenmektedir. $A_{260/280}$ oranları ortalama olarak 3,9 olarak hesaplanmıştır. Bu da protein kirliliğini göstermektedir. Fakat bizim için asıl gerekli olan yüksek saflıkta ve RAPD-PCR reaksiyonunda uygulanabilir bir DNA olduğu için, elde edilen gDNA'lar, RAPD-PCR'da denenmiştir. PCR reaksiyonu sonucunda tekrarlanabilir bir amflikasyon göstermemiştir. Bu durum ve DNA preplerinin renkli ve sarımtırak gözlenmesi, elde edilen gDNA'larda polisakkarit gibi çok fazla kirleticinin olduğunu işaret etmektedir. Bu yöntemin diğer dezavantajları arasında, büyük hacimde çalışılması ve ultrasantrifüj gerektirmesi ve uygulamasının çoklu örneklerle çalışıldığında pratik olmamasıdır.

İkinci olarak, CTAB DNA purifikasyon yöntemi kullanıldı [64]. Elde edilen genomik DNA'ların spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorpsanları ölçüldü ve buna bağlı olarak DNA konsantrasyonları hesaplandı. Ortalama 50mg/ml gibi oldukça az miktarda DNA elde edildiği gözlemlendi. Bu yöntemle elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV ilüminatörde gözlemlendi ve polaroid fotoğraf makinesi ile fotoğrafı çekildi. Şekil 1'de CTAB yöntemi ile elde edilen DNA'ların resmi gösterilmektedir. Bu yöntemle elde edilen DNA'ların konsantrasyonları çok düşük çıkmıştır. Tekrarlanabilir bir RAPD-PCR amplifikasyonu, elde edilemedi.

Bu nedenle, RAPD-PCR reaksiyonlarında tekrarlanabilirliği yüksek bir DNA izolasyonu bulmak için üçüncü yöntem denenmiştir. Pitch ve arkadaşları tarafından rapor edilen mini ölçekde DNA izolasyon yöntemi denenmeye karar verilmiştir [65]. Bu yöntem, polifenolik ve polisakkarit ve sekonder metabolitlerce zengin olan zeytin bitkisi için optimize edilmiştir. Bu amaçla orijinal prosedüre, DNA'da var olan ve problem teşkil eden, polisakkarit gibi kirleticileri temizleyecek NaCl ile yıkama prosedürü dahil edilmiştir [67]. Modifiye edilen genomik DNA izolasyonu yöntemi ile 6 farklı zeytin klonunun yapraklarından elde edilen gDNA'ların 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrede absorpsanları ölçüldü. Farklı zeytin klonları için değişen oranlarda 310-220 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında gDNA elde edildiği

gözlendi. Bu miktar, yöntemin bir küçük ölçekte bir yöntem olduğu düşünüldüğünde iyi derecede bir konsantrasyon olduğu düşünüldü. Bu yöntemle elde edilen zeytin klonlarından elde edilen DNA'ların jel resmi Şekil 3.2'de verilmektedir.

Bu modifiye edilen yöntemle elde edilen gDNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları diğer yöntemlere göre daha fazladır. Ayrıca bu yöntemin mikrosantrifüj ile yapılması ve kısa sürede gerçekleşmesi bize avantaj sağlamaktadır. DNA optimizasyonda kullanılan 3 yöntem ile elde edilen DNA'lar aynı jelde karşılaştırma amacıyla yürütülmüştür (Şekil 3.1). Protein ve RNA kirliliği ise RAPD-PCR reaksiyonunda amplifikasyona engel olmayacak düzeydedir. Diğer taraftan RAPD-PCR reaksiyonunda amplifikasyonu engelleyen en önemli etmenlerden biri olan polisakkarit kirliliği de ek olarak ilave edilen NaCl ile yıkama ile en aza indirgenmiştir. Sonuçta modifiye edilen bu yöntem diğer DNA izolasyonlarında elde edilen DNA'lar RAPD-PCR reaksiyonunda tekrarlanabilir bantlar verdiği için tercih edilmiştir.

RAPD analizi [20], bitki genetiği çalışmaları için PCR-tabanlı yöntemler arasında en uygun ve en güçlü yöntemlerden biridir. Bu yöntem sonucunda tekrarlanabilir ürün eldesi, yüksek kaliteli DNA kalıbına bağlıdır [70]. PCR, *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA Polimeraz gibi ısıya dayanıklı polimerazların etkili aktivitesine dayalı bir yöntem olduğu için bu reaksiyonda bulunan kirleticilerden olumsuz yönde etkilenir [67,71-76]. Elde edilen DNA materyalinin uygunluğu aynı DNA'nın farklı primerlerle amplifikasyon edilip edilemeyeceği test edildi. Bu aşamasında, tesadüfi olarak UB3 klonu; primerlerden ise OPA01, OPA12, OPB03, OPB08, OPB12, OPC01 primerleri PCR reaksiyonuna sokuldu ve ürünler Agarose jel'de yürütüldü. Jel fotoğrafı Şekil 3.3'de verilmektedir.

3.2 RAPD-PCR Koşullarının Optimizasyonu

Reaksiyonda kullanılan DNA kalitesi kadar, reaksiyonda kullanılan bileşenlerin içeriklerinin optimize edilmesi gerekir. Kalıp DNA, MgCl₂, primer, deonükleotidtrifosfat (dNTP) konsantrasyonları PCR optimizasyonu için çalışılan

parametrelerdir. Reaksiyon tüpüne 2mM dNTP karışımı eklendi. Bu çalışmada ilk önce reaksiyon döngü koşulları optimize edilmiştir. Bu amaçla iki döngü koşulu kullanılmıştır. İlk döngü koşulu 94 C'de  n denaturasyondan geçildikten sonra her bir devri 94 C'de 30 sn, 35 C'de 30sn ve 72 C'de 30sn olacak şekilde bu devir 44 defa tekrarlanmıştır. En son olarak da 72 C'de 10dak son uzama evresine tabi tutulmuştur. İlk döngü koşullarında, optimizasyonda kullanılan DNA izolasyon yöntemleri ile elde edilen kalıp DNA'ların hiç birinde amplifikasyon gözlenmemiştir [77]. İkinci uygulanan RAPD-PCR döngü koşullarında, modifiye edilen yöntemle elde edilen genomik DNA'lar ürün vermiştir. RAPD reaksiyon döngü koşulları aşağıda maddeler halinde verilmektedir: Artan tarzda  n denaturasyon safhaları uygulanmıştır. 85C'de 15san, 95C'de 5san, 92C'de 1dak ve daha sonra 44x (92C'de 55san, 37C'de 1dak, 72C'de 2dak.) ve en son olarak da 72C'de 7dak son denaturasyona tabi tutulmuştur [68]. PCR amplifikasyonları PROGENE Termocycler Techne (Cambridge Ltd., UK) de gerçekleştirilmiştir. İkinci PCR döngü koşulları bundan sonra amplifikasyonlarda kullanılmıştır.

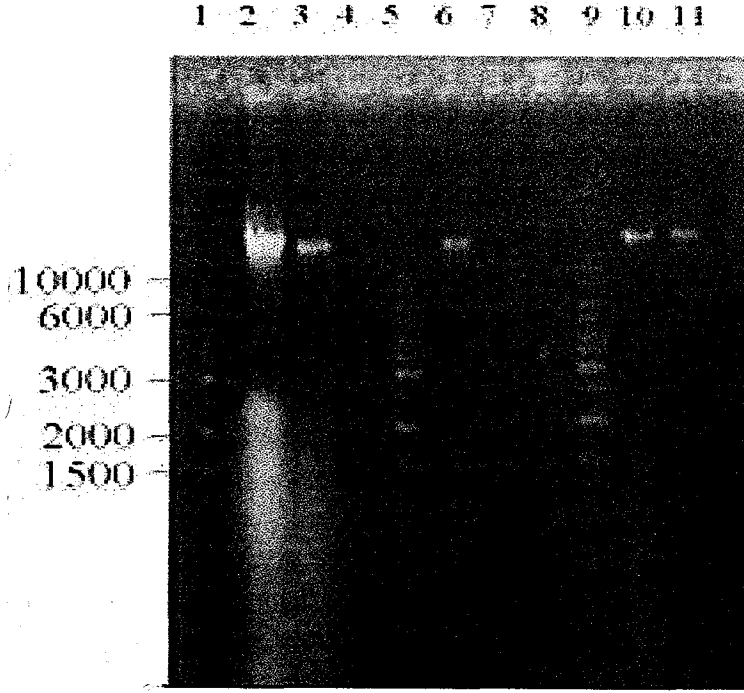
MgCl₂ konsantrasyonları, 0,5 mM, 1 mm, 1.5 mM, 2 mM, 3 mM, 3,5 mM aralığında test edildi. MgCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu, UB3 zeytin klonu ve OPB 03 primeri ile yapıldı. PCR  r nleri, % 1'lik Agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve resmi polaroid jel makinesi ile çekildi (şekil 3.4). Buna göre; en uygun MgCl₂ konsantrasyonu 2.5mM seçildi. Kalıp DNA için 5 ng, 15 ng, 25 ng, 35 ng, 50 ng konsantrasyonları test edildi. Elde edilen bulgulara göre en uygun kalıp DNA konsantrasyonunun 25 ng olduğu belirlendi (şekil 3.5). Primer konsantrasyonunun optimizasyonu için 02  mol, 0,4  mol, 0,6  mol, 0,8  mol aralığı denedi ve her birinde aynı bant profili gözlendi. Buna göre ise 0,4  l mol primer konsantrasyonu seçildi (şekil 3.6).

3.3 Zeytin Klonlarına ait RAPD profilleri

Edremit Zeytincilik Fidanlık müdürlüğünden temin edilen 6 zeytin kültüründen alınan örneklerin genetik ilişkilerinin belirlenmesi için RAPD-PCR analizine tabi tutulmuşlardır. UB1, UB3, UB8, UB10, 0108, 0308 olarak isimlendirilen bu zeytin klonlarından modifiye DNA izolasyonu yöntemi ile genomik

DNA lar elde edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri optimize edilen şartta doğrultusunda RAPD-PCR analizinde kullanılmıştır. Bunun için 15 adet tesağu olarak seçilmiş 10 bazlık primerler Sigma genosys ve UBC (University of British Colombia)'dan temin edilmiştir. Bunlardan elde edilen amplifikasyon ürünleri değerlendirildiğine sadece 9 primerin tekrarlanabilir PCR ürünleri verdiği tespit edilmiştir. Bu primerler ve DNA dizileri Bölüm 2'de belirtilmiştir. Amlifikasyon ürünleri %1 -%1.5 oranlardaki agaroz jel elektroforezinde yürütölerek sonuçlar UV. ilüminatör altında değerlendirilerek poloroid görüntüleme sistemiyle jel fotoğrafları çekilmiştir.

Bu primerler elde edilen amlifikasyon ürünleri sırayla Şekil 3.7 (OPA01 Primeri), Şekil 3.8 (OPA12 Primeri), Şekil 3.9 (OPB12 Primeri), Şekil3.10 (OPC01 Primeri), Şekil 3.11 (OPB 08 Primeri), Şekil 3.12 (OPDO1 Primeri), Şekil 3.13 (A17 Primeri), Şekil 3.14 (FSJ 02 Primeri), Şekil3.15 (Wink Primeri)'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Üç farklı prosedür ile taze zeytin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların Agaroz jel analizi [63-65]. (Her bir farklı DNA markeri arasında bir boş hat bırakılmıştır).

Hat 1. 1 kb DNA marker

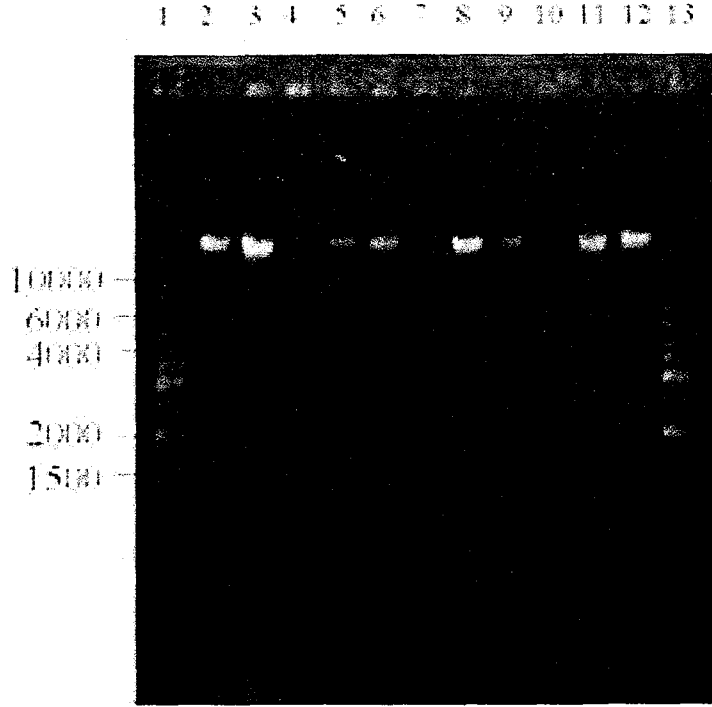
Hat 2-3. Dellaporta prosedürü ile elde edilen DNA

Hat 5. 1 kb DNA marker

Hat 6-7. CTAB prosedürü ile elde edilen DNA

Hat 9. 1 kb DNA marker

Hat 10-11. Modifiye edilen prosedür ile elde edilen DNA
Hat 11. Modifiye edilen prosedür ile elde edilen DNA



Şekil 3.2 Modifiye edilen prosedür ile taze zeytin yapraklarından elde edilen bazı genomik DNA örnekleri. (4, 7 ve 10. kertişler boş bırakılmıştır).

Hat 1. 1 kb DNA marker

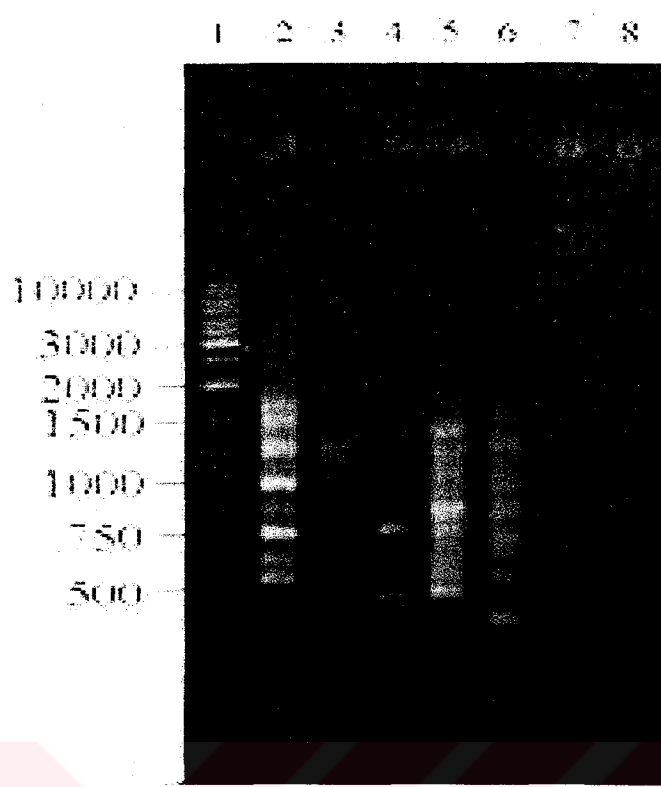
Hat 2-3. Modifiye edilen prosedür ile elde edilen DNA

Hat 5-6. Modifiye edilen prosedür ile elde edilen DNA

Hat 8-9. Modifiye edilen prosedür ile elde edilen DNA

Hat 11-12. Modifiye edilen prosedür ile elde edilen DNA

Hat 13. 1 kb marker



Şekil 3.3 UB3 zeytin DNA'sı ile farklı primerlerin verdiği RAPD profili.

Hat 1. 1 kb marker

Hat2. OPA 01 Primeri

Hat3. OPA 12 Primeri

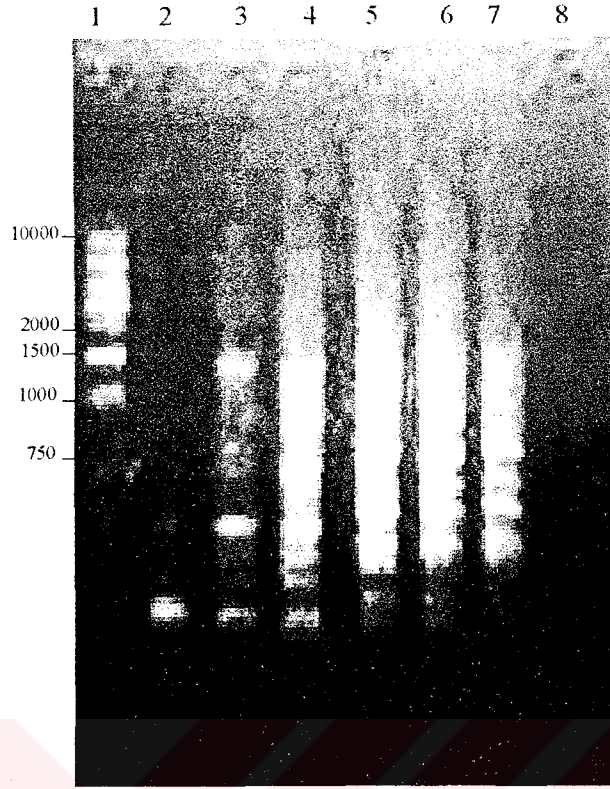
Hat 4. OPB 03 Primeri

Hat 5. OPB 08 Primeri

Hat 6. OPB 12 Primeri

Hat 7. OPC 01 Primeri

Hat 8. Negatif Kontrol



Şekil 3.4 UB3 zeytin DNA'sı ile OPA01 primeri kullanılarak farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında RAPD-PCR parametrelerinin optimizasyonu:

Hat1. 1 kb marker

Hat2. 0,5 mM

Hat3. 1 mM

Hat4. 1,5 mM

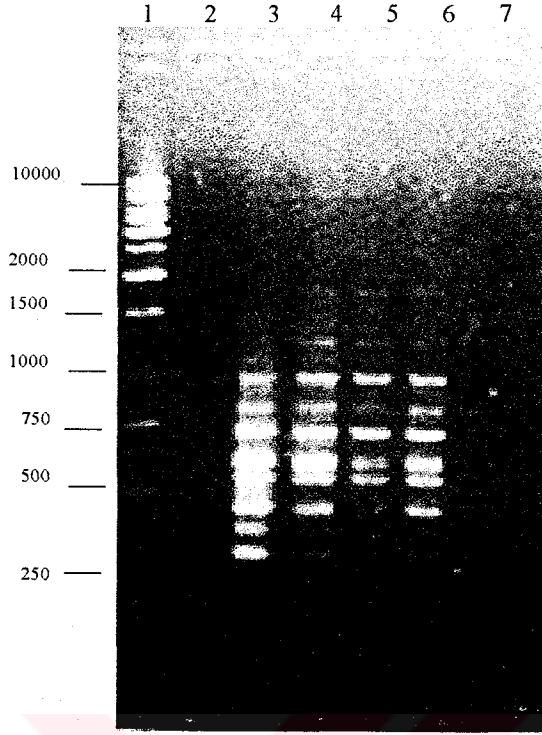
Hat5. 2 mM

Hat6. 2,5 mM

Hat7. 3 mM

Hat8. 3,5 mM

Hat9. Negatif Kontrol



Şekil 3.5 UB3 zeytini kullanılarak farklı DNA konsantrasyonlarında OPA01 primeri ile RAPD-PCR parametrelerinin optimizasyonu

Hat1. 1 kb marker

Hat2. 5 ng

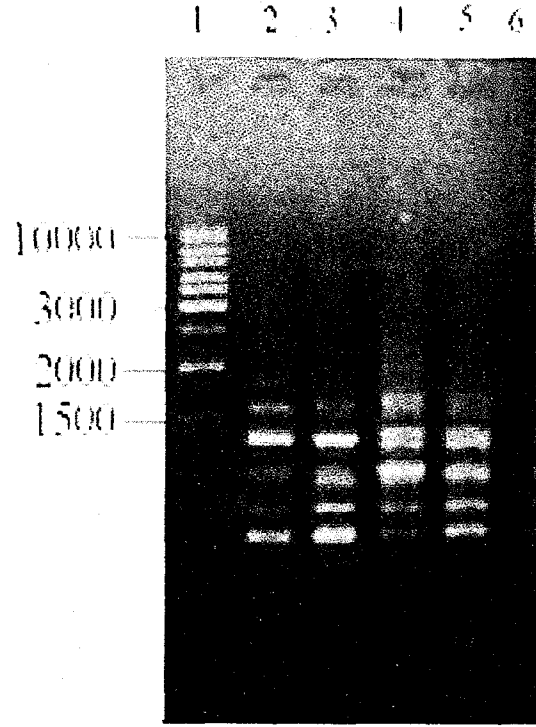
Hat 3. 15 ng

Hat 4. 25 ng

Hat5. 35 ng

Hat 6. 50 ng

Hat 7. Negatif Kontrol



Şekil 3.6 UB3 zeytin DNA'sı ile WINK primerine ait farklı primer konsantrasyonlarında RAPD-PCR parametrelerinin optimizasyonu:

Hat1. 1 kb marker

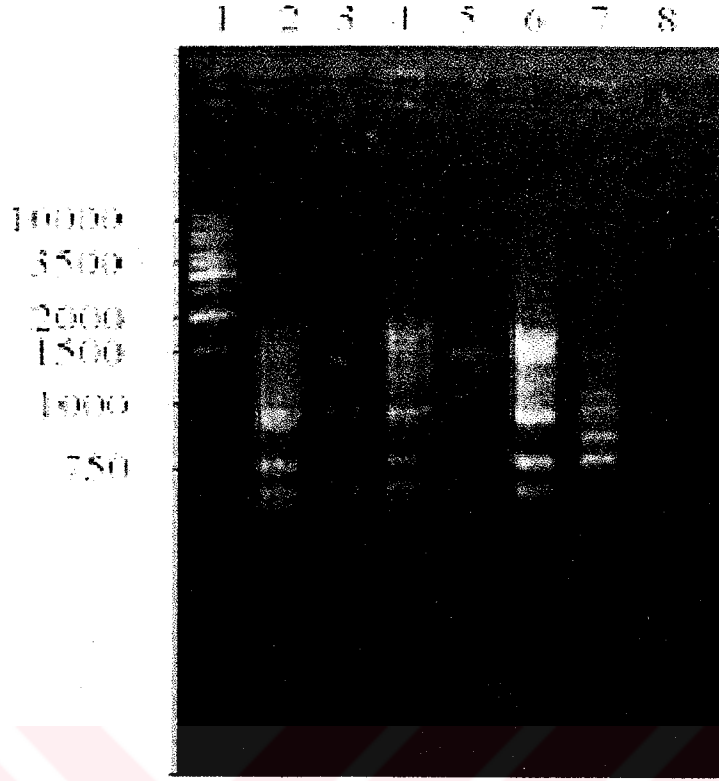
Hat2. 0,2 pmol

Hat3. 0,4 pmol

Hat4. 0,6 pmol

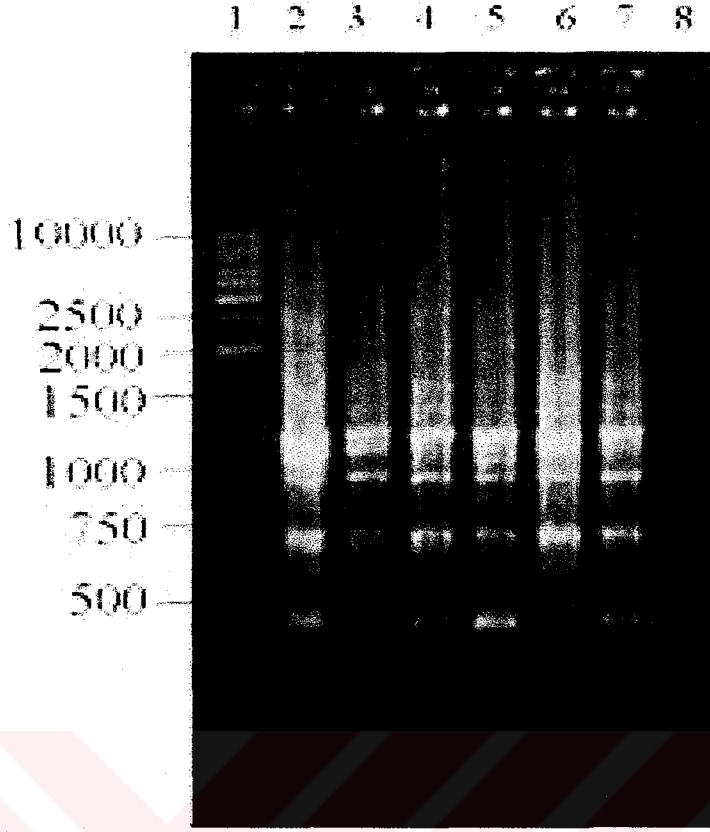
Hat5. 0,8 pmol

Hat6. Negatif Kontrol



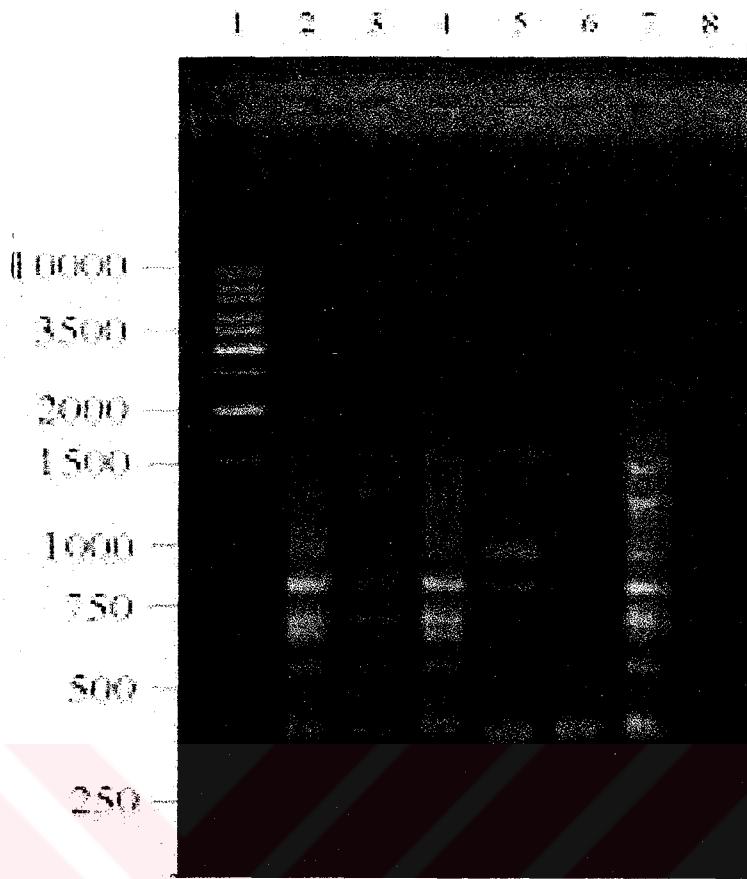
Şekil 3.7 OPA 01 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.

- Hat1. 1kb marker
- Hat 2. UB1 Klonu
- Hat 3. UB3 Klonu
- Hat 4. UB 8 Klonu
- Hat 5. UB 10 Klonu
- Hat 6. 0108 Klonu
- Hat 7. 0308 Klonu
- Hat 8. Negatif Kontrol



Şekil 3.8 OPA 12 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.

- Hat1. 1kb marker
- Hat 2. UB1 Klonu
- Hat 3. UB3 Klonu
- Hat 4. UB 8 Klonu
- Hat 5. UB 10 Klonu
- Hat 6. 0108 Klonu
- Hat 7. 0308 Klonu
- Hat 8. Negatif Kontrol



Şekil 3.9 OPB 12 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.

Hat1. 1kb marker

Hat 2. UB1 Klonu

Hat 3. UB3 Klonu

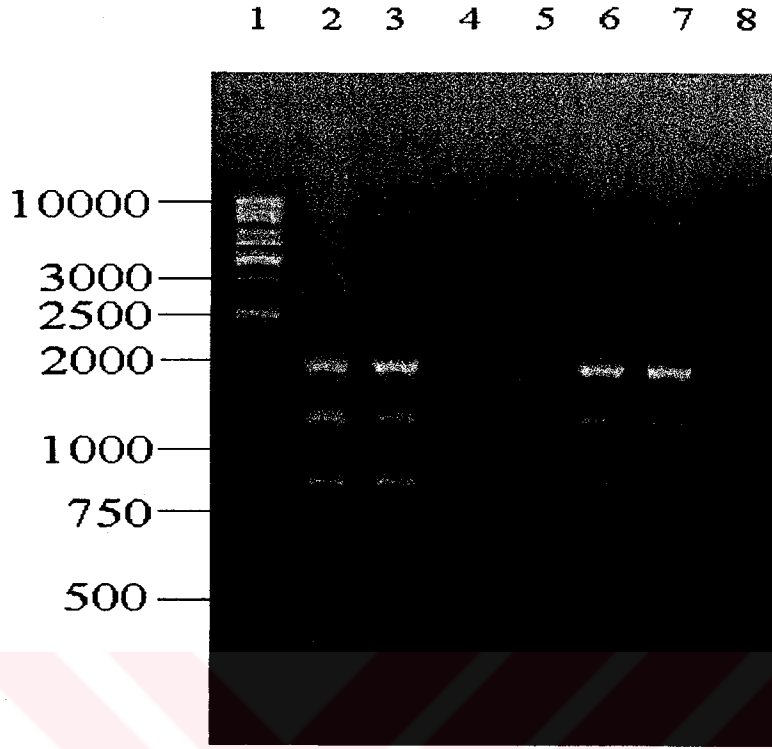
Hat 4. UB 8 Klonu

Hat 5. UB 10 Klonu

Hat 6. 0108 Klonu

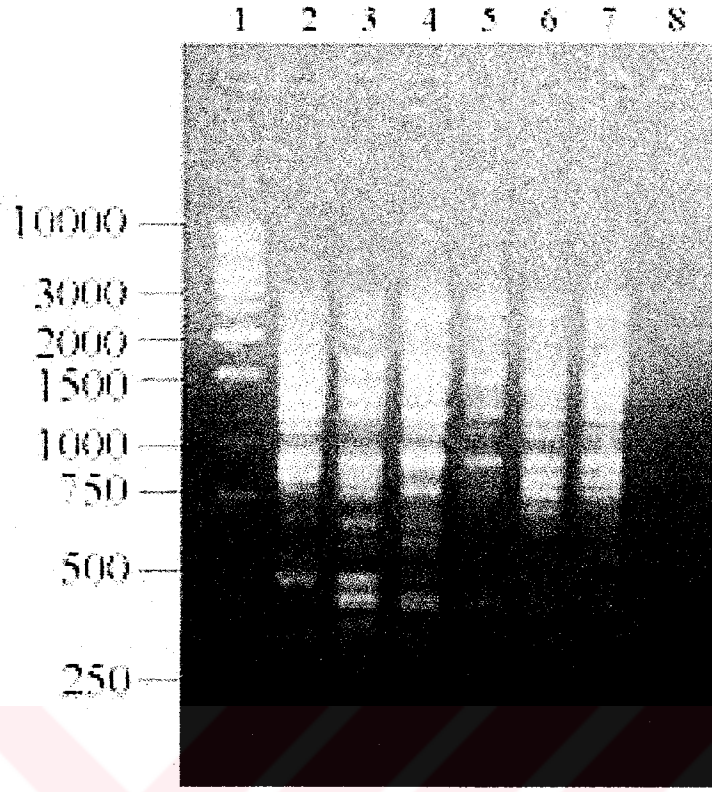
Hat 7. 0308 Klonu

Hat 8. Negatif Kontrol



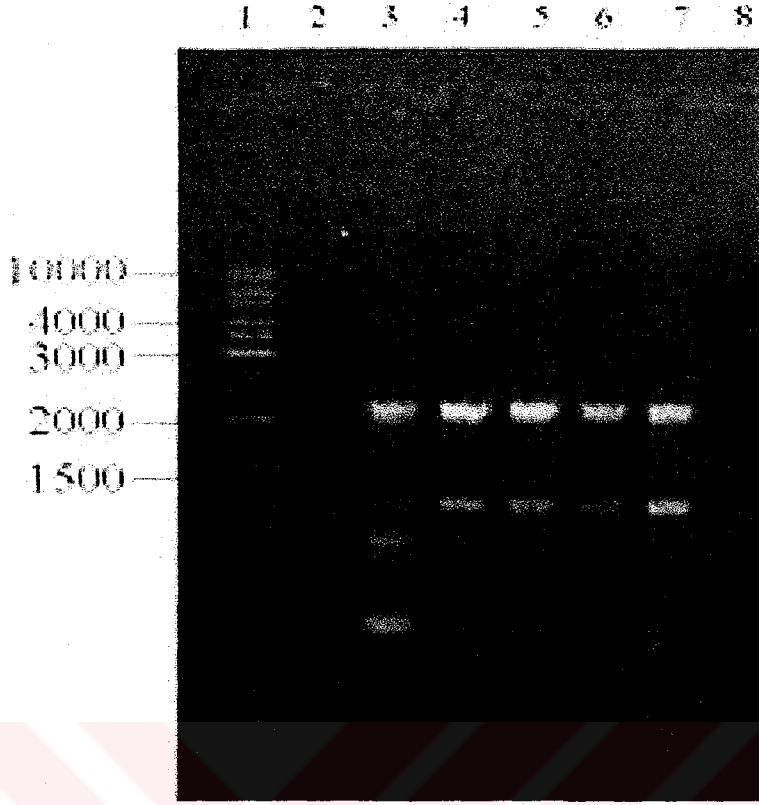
Şekil 3.10 OPC 01 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.

- Hat1. 1kb marker
- Hat 2. UB1 Klonu
- Hat 3. UB3 Klonu
- Hat 4. UB 8 Klonu
- Hat 5. UB 10 Klonu
- Hat 6. 0108 Klonu
- Hat 7. 0308 Klonu
- Hat 8. Negatif Kontrol

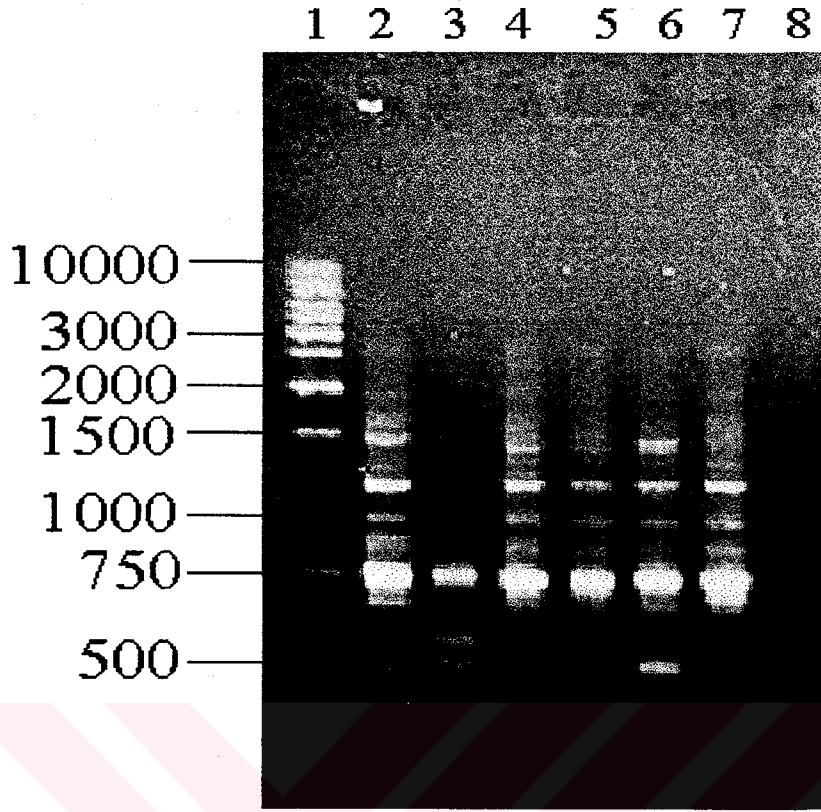


Şekil 3.11. OPB 08 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.

- Hat1. 1kb marker
- Hat 2. UB1 Klonu
- Hat 3. UB3 Klonu
- Hat 4. UB 8 Klonu
- Hat 5. UB 10 Klonu
- Hat 6. 0108 Klonu
- Hat 7. 0308 Klonu
- Hat 8. Negatif Kontrol



Şekil 3.12 OPD 01 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.
Hat1. 1kb marker
Hat 2. UB1 Klonu
Hat 3. UB3 Klonu
Hat 4. UB 8 Klonu
Hat 5. UB 10 Klonu
Hat 6. 0108 Klonu
Hat 7. 0308 Klonu
Hat 8. Negatif Kontrol



Şekil 3.13 A17 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.

Hat 1. 1kb marker

Hat 2. UB1 Klonu

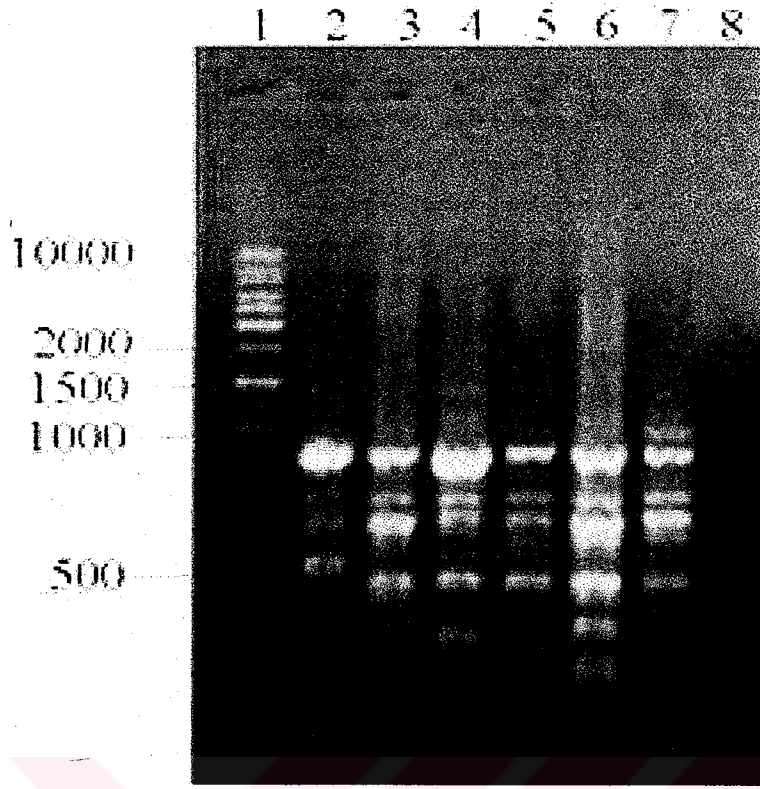
Hat 3. UB3 Klonu

Hat 4. UB 8 Klonu

Hat 5. UB 10 Klonu

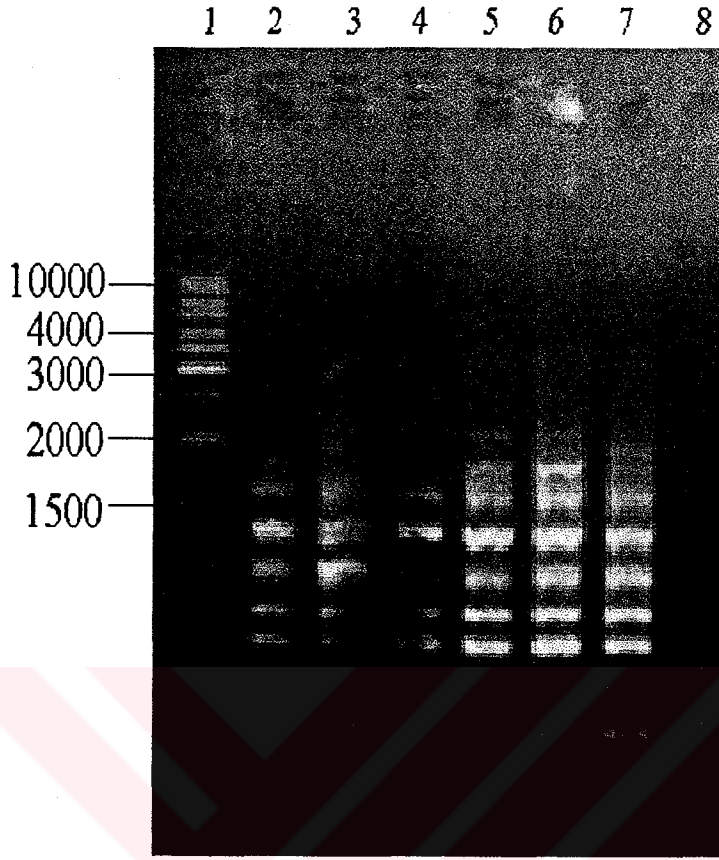
Hat 6. 0108 Klonu

Hat 7. 0308 Klonu Hat 8. Negatif Kontrol



Şekil 3.14 FSJ 02 primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.

- Hat1. 1kb marker
- Hat 2. UB1 Klonu
- Hat 3. UB3 Klonu
- Hat 4. UB 8 Klonu
- Hat 5. UB 10 Klonu
- Hat 6. 0108 Klonu
- Hat 7. 0308 Klonu
- Hat 8. Negatif Kontrol



Şekil 3.15 WINK primeri ile elde edilen farklı klonlara ait RAPD Profili.
Hat1. 1kb marker
Hat 2. UB1 Klonu
Hat 3. UB3 Klonu
Hat 4. UB 8 Klonu
Hat 5. UB 10 Klonu
Hat 6. 0108 Klonu
Hat 7. 0308 Klonu
Hat 8. Negatif Kontrol

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Zeytin (*Olea europaea* L.), boyu 10-15 m, geniş taçlı, Akdeniz iklimini benimsemiş bir ağaçtır. Yenilebilir meyve ve yağ elde edilmektedir. Türkiye’de kültüre alınan var. *europaea* ve var. *sylvestris* olmak üzere iki varyetesi vardır. Ayrıca, yabani zeytin türleri de Akdeniz Bölgesinde yayılış alanı bulmaktadır [78]. Akdeniz bölgesi kültüre alınan zeytinler açısından Dünya’da %95 ini oluşturmaktadır. Zeytin ağaçlarının çok sayıda kültüre alınmış varyetesi bulunmaktadır. Çevresel faktörler, zeytin bitkisinin morfolojik tarımsal özelliklerini etkilemektedir. Bu durum da fenotipe dayalı olarak varyete tanımlanmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Bu nedenle kültüre alınmış farklı varyeteler, ayırt edilememesi nedeniyle yanlış adlandırılmış veya yanlış gruplandırılmıştır. Bu yüzden zeytinde varyeteleri tanımlamak için farklı biyokimyasal ve DNA tabanlı moleküler markerler de kullanılmıştır. Bu markerler çevresel markerlere göre daha az duyarlı olduğu için genellikle tercih edilmektedir [44-46]. Bu amaçla, Mikrosatellit markerlar bazı İspanyol ve İtalyan zeytin varyetelerinin ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Angiolillo ve arkadaşları tarafından kültüre alınmış formları yabani formları ve yakın türleri AFLP (Amplified Length polymorphism) ile karakterize edilmiştir [43,53]. Halbuki özellikle Ege ve Akdeniz bölgesinde oldukça büyük ekonomik öneme sahip ülkemizdeki zeytin varyetelerinin moleküler markerlerle tanımlanmasına yönelik detaylı bir çalışma ne yazık ki bizim bilgilerimiz dahilinde bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye’de özellikle Edremit yöresinde kültüre alınan *Olea europaea* L. var. *europaea*’ya dahil olan zeytin ağaçları arasındaki genetik ilişki incelenmiştir. Çalışılan altı zeytin soyları, Tarım Köy İşleri Bakanlığı, Edremit Zeytincilik Fidanlık Merkezinden elde edilmiştir. Ülkemiz yağ üretiminin büyük bir kısmını karşılayan bu yörede yapılan bir çalışmada soylara ait genel özellikler belirlenmiştir ve yağ verimi, tane iriliği, et/çekirdek oranı, periyodisite eğilimi gibi kriterlere bakılarak üstün özelliklere sahip zeytin klonları puanlanmıştır [62]. Buna göre Ayvalık, Edremit ve dikili alanlarını kapsayan farklı bölgelerden 303 zeytin ağacı incelenmiş buna göre periyodisitesi en az, verimi yüksek 7 klon ile, yağ oranı açısından 3 zeytin klonu et/çekirdek oranı açısından seçilmiştir. Bu çalışmada

kullanılan ve ayrıca üreticilerden elde edilen verilere göre en fazla toplam puan alan 6 zeytin klonu UB8, 0108, UB1, UB3, UB10 ve 0308 klonlarına ait genel özellikler ve aldıkları puanlar Çizelge 1.2’de gösterilmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi aralarındaki genetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla seçilen zeytin soyları, gerek yağ verimi, gerekse tane iriliği gibi kriterler bakımından önemli bulunmuştur. UB8, 0108, UB1, UB3, UB10 klonlarının verimi yüksek, periyodisitesi az ve yağ oranı yüksek olduğu, 0308 klonunun ise et/çekirdek oranı açısından en yüksek puana sahip olduğu görülmektedir.

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) aynı zamanda Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) olarak da bilinmekte olan, PCR-tabanlı marker sistemidir. RAPD, rastgele seçilmiş kısa oligonükleotid ile başlatılan genomik bir kalıbın çoğaltılmasına dayalı polimeraz zincir reaksiyonudur. Bu sistem farklı uygulama alanlarında geniş bir kullanım alanı bulmaktadır ve beraberinde çok fazla avantaj taşımaktadır. Tesadüfi bir yöntem olduğu için kısa oligonükleotid dizileri dizayn edilirken spesifik DNA dizi bilgisine ya da DNA problemlerine gerek duyulmamaktadır. Hibridizasyon ve Blotlama gibi radyoaktif işlemler içermemesi, hızlı, basit ve otomasyona uygun bir yöntem olması, RAPD’in moleküler sistematik çalışmalarında popülerliğini artırmaktadır.

RAPD reaksiyonu sonucunda elde edilecek ürün üzerinde etkili pek çok parametre vardır [20]. Bunlardan en önemlileri; kalıp DNA’nın kalitesi ve miktarıdır [70]. Çünkü DNA izolasyon yöntemleri farklı organizmalarda farklı kalitede DNA vermektedir. Bu nedenle, taze zeytin yapraklarından DNA izolasyon yöntemleri optimize edilmiştir. Buna göre üç farklı DNA izolasyon yöntemi denenmiştir. Dellaporta’ya göre yapılan DNA izolasyon yöntemi sonucunda elde edilen DNA’ları gerek spektrofotometrik analizde gerekse de jel elektroforez analizinde protein, RNA ve diğer kirleticiler bulunduran DNA’lar elde edilmiştir [63] (Şekil 3.1). Bitki dokularından düşük saflıkta DNA oluşmasının en önemli sebeplerinden biri de polisakkarit kontaminasyonudur [67,73]. Bu yöntemle elde edilen kalıp DNA’lar RAPD reaksiyonunda her defasında ürün vermemiştir. Ayrıca bu yöntem, büyük hacimlerde gerçekleştiği için masraflı ve ultrasantrifüj gerektirmesi ise diğer bir dezavantajdır. Daha sonra uygulanan CTAB yöntemi [64] bitkilerden DNA

izolasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle elde edilen DNA konsantrasyonları çok düşük çıkmıştır (Şekil 3.1). Yine, elde edilen DNA'lar RAPD-PCR reaksiyonunda tekrarlanabilir amplifikasyon ürünleri vermemiştir. Bu nedenle farklı bir DNA izolasyon prosedürü, zeytinin yapısı dikkate alınarak büyük ölçüde modifiye edilmiştir [65]. Modifiye ettiğimiz yöntemle elde edilen genomik DNA'lar RAPD reaksiyonunda ürün vermiştir. Bu yöntemde modifiye edilerek eklenen NaCl yıkaması ile, DNA izolasyonunu olumsuz yönde etkileyen polisakkaritler ve sekonder bileşenler uzaklaştırılmıştır [67]. Bu yöntemin diğer bir avantajı sadece 1.5ml lik eppendorf tüplerde çalışabilmesi ve ultrasantrüf gerektirmemesidir. Yine fazla zaman almaması, ekonomik ve basit olması nedeniyle aynı anda pek çok izolasyonun yapılabilmesidir. Bu durum özellikle popülasyon genetiği ve varyete çalışmalarında çok örneğin aynı anda yapılması gereken durumlar için bir avantaj oluşturmaktadır.

RAPD reaksiyonuna uygun kaliteli kalıp DNA elde ettikten sonra, reaksiyonu etkileyen diğer parametrelerinde optimizasyonu gerekmektedir. Özellikle kısa 10 bazlık primerlerin genomda tesadüfi bağlanması temeline dayanan bu teknikde MgCl₂, kullanılan DNA konsantrasyonu, döngü koşulları gibi reaksiyon parametrelerinin iyi optimize edilmesi gereklidir. Örneğin gerekenden az miktardaki DNA kullanımı, tekrarlanabilirliği olmayan bant örneklerinin oluşmasına sebep olabilmektedir. Diğer taraftan çok fazla DNA kullanımı ise amplifikasyonu etkileyip, simire yol açmaktadır [20]. Diğer parametreleri ise Mg iyonu konsantrasyonu [22-24]; primer konsantrasyonu [20-25]; bağlanma sıcaklığı [27] denatürasyon, bağlanma ve uzama zamanları [28] oluşturmaktadır. Bu çalışmada ilk önce reaksiyon döngü koşulları optimize edilmiştir. İlk denenen PCR döngü koşullarında, [77] optimizasyonda kullanılan DNA izolasyon yöntemleri ile elde edilen kalıp DNA'ların hiç birinde amplifikasyon gözlenmemiştir. İkinci uygulanan RAPD-PCR döngü koşullarında, modifiye edilen yöntemle elde edilen genomik DNA'lar ürün vermiştir. RAPD reaksiyon döngü koşulları aşağıda maddeler halinde verilmektedir (Bölüm 3). Burada primerin DNA kalıbına bağlanması için gerekli olan bağlanma sıcaklığı kullanılan primerin T_m değerine göre değiştirilmiştir. Kullanılacak DNA miktarı da farklı DNA konsantrasyonları kullanılarak belirlenmiştir. Kalıp DNA miktarı, 5 ng, 15 ng, 25 ng, 35 ng, 50 ng aralığında

optimize edilmiştir ve sonunda en uygun DNA konsantrasyonu 25 ng olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5). $MgCl_2$ konsantrasyonunun optimizasyonu; 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM aralığında yapıldı ve en uygun $MgCl$ konsantrasyonu, 2,5 mM olarak belirlendi (Şekil 3.4). Kullanılan primerlerin konsantrasyonu farklı konsantrasyon aralıklarında test edilmiştir. Primer konsantrasyonunun optimizasyonu; 0,2 pmol, 0,4 pmol, 0,6 pmol, 0,8 pmol aralığında yapıldı ve en uygun primer miktarı, 0,6 pmol olarak belirlendi (Şekil 3.6); dNTP konsantrasyonu, 2 mM; 0,04 U *Taq* DNA Polimeraz ve $MgCl$ içermeyen 1x'lik tampon kullanılarak RAPD parametreleri optimize edildi ve bu koşullar altında reaksiyonlar gerçekleştirildi. Rastgele seçilen zeytin klonuna ait kalıp DNA ile farklı primerle RAPD gerçekleştirildi ve % 1 agaroz jel elektroforezinde ürünler gözlemlendi (Şekil 3.3). Optimizasyon tamamlandıktan sonra 15 primer RAPD-PCR reaksiyonunda kullanılmıştır. Bunlar arasında tekrarlanabilir band veren 9 farklı primer tespit edilmiştir. Bunlara ait amplifikasyon ürünleri (Şekil 3.7-Şekil3.15) de gösterilmektedir. Şekillerden görüldüğü gibi primerler tüm altı zeytin klonunda ortak bantlar verdiği gibi polimorfik bantlar da vermiştir. Elde edilen parlak ve tekrarlanabilirliği olan amplifikasyon ürünleri değerlendirmeye alınmıştır. Var olan bantlar 1, olmayan batlarda 0 olarak alınmıştır. Elde edilen veriler kullanılarak matris oluşturulmuştur. Bu matris kullanılarak zeytin klonları arasındaki genetik ilişki PAUP (Phylogenetic Analysis using Parsimony) 4.0d65 de değerlendirmeye alınmıştır.

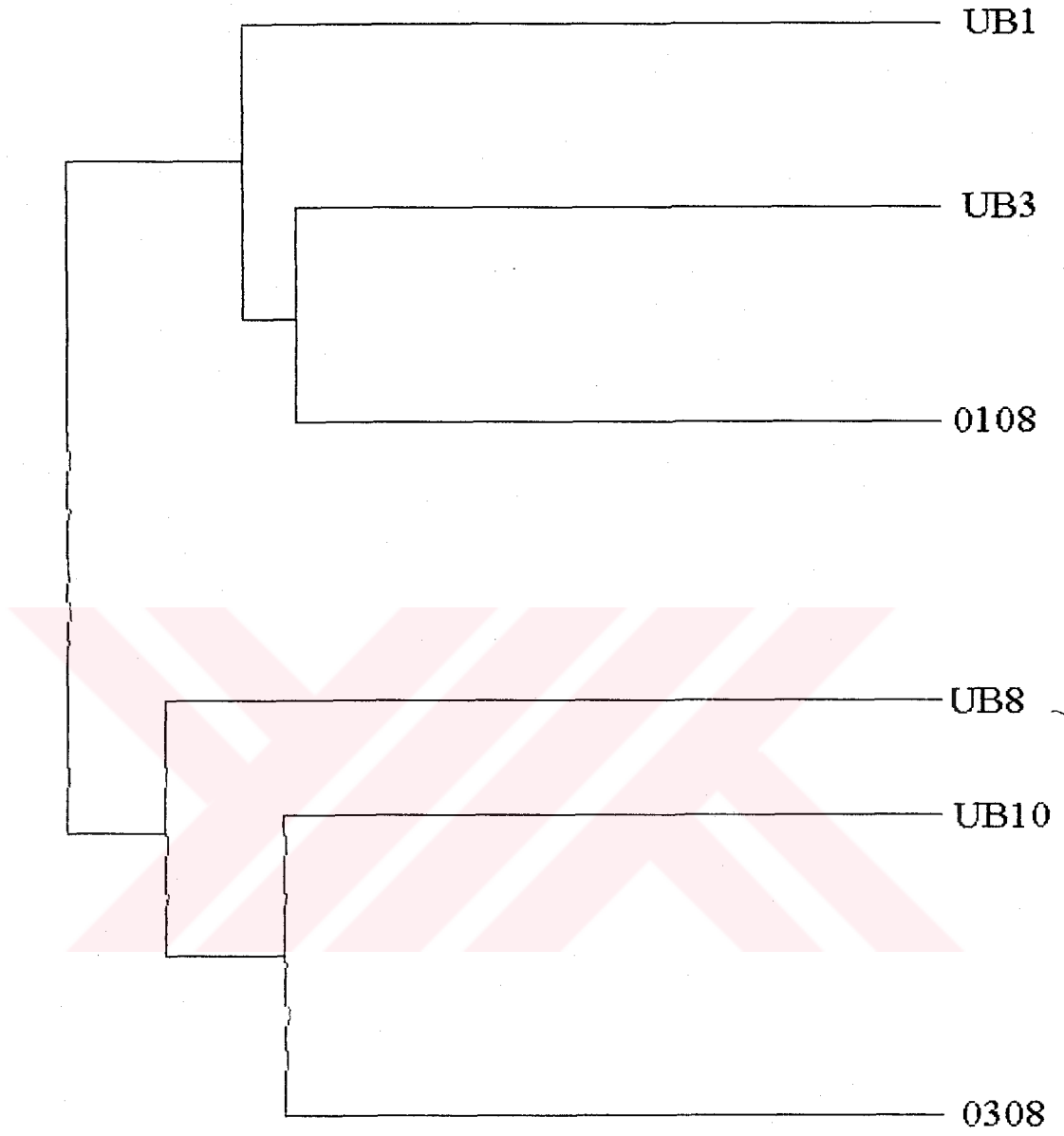
Zeytin klonları arasındaki genetik ilişki Matris verileri ve UPGMA algoritim kullanılarak dendogram elde edilmiştir (Şekil 4) UPGMA (Unweighted pair group yöntem with arithmetic mean) dendogram oluşturmak için kullanılan yöntemlerden birisidir. Elde edilen dendogramda altı zeytin klonu iki hat halinde toplanmıştır. Buna göre UB1, UB3 ve 0108 genetik yapı itibariyle birbirlerine en yakın zeytin klonlarıdır. Diğer klusterda bulunan UB8, UB10 ve 0308 beraber gruplanmıştır.

PAUP kullanılarak, PAIRWISE DISTANCE (İkili karşılaştırmalı uzaklık) analizi yapılmış, böylece toplam karakter arasında tespit edilen farklı karakter durumları klonlar arasında incelemeye alınmıştır. Genel olarak PAIRWISE DISTANCE analizine göre klonlar arasındaki genetik farklılığın çok fazla olmadığı gözlemlenmiştir. Bunlar arasındaki en farklı klonlar %43 ile UB1 ve 0308 klonlarıdır.

UB1 , 0308 ile aynı soy hattında (lineage) bulunan UB10, UB8 klonları arasında %38 ve %35'lik bir genetik farklılık göstermiştir. UB3'ün en farklı olduğu klon, %31 ile UB8 klonudur. UB3 ve diğer klonlar arasındaki genetik uzaklık oldukça benzerdir. UB8 için genetik yakınlık en fazla UB10 klonu arasında tespit edilmiştir (Çizelge 4). 0108 için en fazla farklılık %32.8 ile UB8 arasındadır. 0308 için ise UB3, UB10 ve 0108 klonlarıyla oldukça benzer olduğu gözlenmiştir (%26, %26 ve %27).

Çizelge 4 Klonlar arasındaki genetik farklılığı gösteren PAIRWISE DISTANCE analizi. Tablodaki yukarıda bulunan üçgen ortalama karakter farklılığını, aşağı pozisyondaki üçgende toplam karakter içinde farklılık gösteren karakter sayısını göstermektedir.

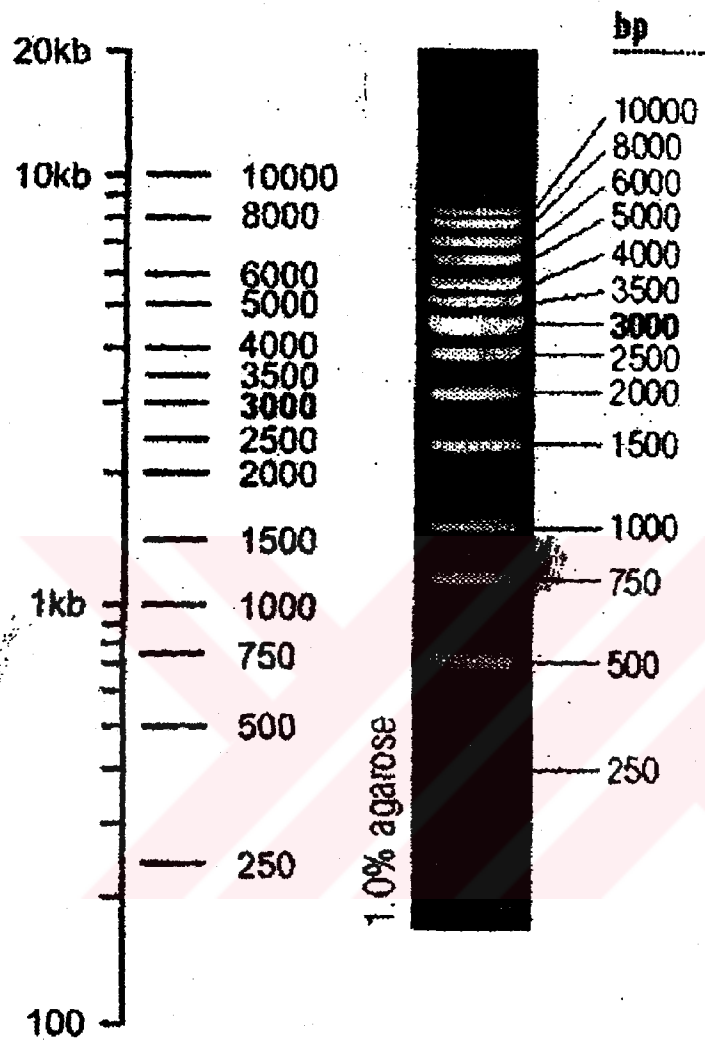
	1	2	3	4	5	6
1 UB1.	-	0.25000	0.35526	0.38158	0.28947	0.43421
2 UB3.	19	-	0.31579	0.28947	0.25000	0.26316
3 UB8.	27	24	-	0.28947	0.32895	0.34211
4 UB10	29	22	22	-	0.27632	0.26316
5 0108.	22	19	25	21	-	0.27632
6 0308.	33	20	26	20	21	-



Şekil 4 Altı farklı zeytin klonu arasındaki genetik ilişkiyi gösteren ve UPGMA tekniği ile üretilen bir fenogram

EK 1 1 kb DNA Marker

Fragment Sizes



5. KAYNAKLAR

- [1] <http://www.agri.ankara.edu.tr/bolumler/balikesir/pratikbilgiler/meyve/zeytin/genel>.
- [2] Tunalıoğlu, R., Önemli zeytin üreticisi ülkelerin zeytinciliği ile Türkiye zeytinciliğinin bazı yönlerden karşılaştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı, İzmir, (1994).
- [3] IOOC, Zeytin yağı Konseyi Tanıtım Broşürü, (1993)
- [4] Yüceşahin, S., Balıkesir ilinde zeytin alanları, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Coğrafya Anabilim Dalı, Ankara, (1999)
- [5] Hui Lui, B., Statistical Genomics Linkage, Mapping and QTL Analyses, CRC Press, Boca Raton, New York, (1998).
- [6] Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W., "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms" *Am. J. Hum. Genet.* 32 (1980) 314-331.
- [7] Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., and Tanksley, S.D., "Resolution of quantitative traits into Mendelian factors, using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms" *Nature (London)* 335 (1988) 721-726.
- [8] Lander, E.S., and Botstein, D., "Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps" *Genetics*, 121 (1989) 185-199.
- [9] Allard, R.W., "Principles of Plant Breeding" (1960) Wiley. New York.
- [10] Simmonds, N.W., "Principles of Crop Improvement" *Longman*, (1979) New York.

[11] Friebe, B. And Gill, B.S. "Chromosome banding and genome analyses in diploid and cultivated polyploid wheats" (In P.P. Jauhar ed.) *Yöntems of Genome Analysis in Plants.*, (1995) 39-60.

[12] Crawford, S.L. "An application of the laplace yöntem to finite mixture distributions" *J. of the American Statistical Association*" 89 (1994) 425.

[13] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N., "Enzymatic amplification of Beta- globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia" *Science*, 230 (1985) 1350-1354.

[14] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polimerase chain reaction" *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol*, 51 (1986) 263-273

[15] Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. "PCR Protocols: A guide to yöntems and applications" *Academic Press, San Diego*

[16] Southern, E.M., "Detection of spesific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis" *J. Mol. Biol.*, 98 (1975) 503-50

[17] Olson, J.M., Hood, L., Cantor, C., and Botstein, D. " A comman language for physical mappng of the human genome" *Science*, 245 (1989) 1434-35.

[18] Mazur, B.J. and Tingey, S.V. "Genetic mapping and introgression of genes o agronomic impotence" *Current Opinion in Biotechnology*, 6 (1995) 175-183.

[19]<http://avery.rutgers.edu/WSSP/Studentseniars/project/arenives/onions/rapa.ntml>

- [20] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers" *Nucl Acids Res.*, 18 (1990) 6531-6535.
- [21] Welsh, J. and McClelland, M., "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers" *Nucl Acids Res*, 18 (1990) 7213-7218.
- [22] Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D. and Honeycutt, R.L. "Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA in banding patterns" *BioTechniques*, 14 (1993) 214-217.
- [23] Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V., "Genetic analysis using randomly amplified polymorphic DNA markers" *Meth Enzymol*, 218 (1993) 705-740.
- [24] Park, Y-H. and Kohel, R.J. "Effect of concentration of MgCl₂ on random – amplified DNA polymorphisms" *Biotechniques*, 16 (1994) 652-655.
- [25] Muralidharan, K. and Wakeland, E.K. "Concentration of primer end template qualitatively affects product in random-amplified polymorphic DNA PCR" *Biotechniques*, 14 (1993) 362-364.
- [26] Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and Williams, J.G.K., "Genetic analyses with RAPD markers" *Proc. Symp. Appl. RAPD Technol Plant Breed, Crop Sci Soc. Am., Minneapolis*, (1992) 12-17.
- [27] Schweder, M.E., Shatters, R.G., West, S.H. and Smith, R.L., "Effect of transition interval between melting and annealing temperatures on RAPD analyses" *BioTechniques*, 19 (1995) 38-42.

- [28] Bielawski, J.P., Noack, K. and Pumo, D.E. "Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA" *BioTechniques*, 18 (1995) 856-860.
- [29] Dos Santos, J.B., Niehuis, J., Skroch, P., Tivang, J. and Slocum, M.K. "Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. Genotypes" " *Theor Appl. Genet.*, 87 (1994) 909-915.
- [30] Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G. and Osborn, T.C., "Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species" *Theo. Appl. Genet.*, 88 (1994) 973-980.
- [31] Ragot, M. And Hoisington, D.A. "Molecular markers for plant breeding: comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs" *Theor Appl. Genet.*, 86 (1993) 975-984.
- [32] Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S.J. and Fedak, G. "Reproducibility or random-amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses among laboratories" *PCR Yöntems Appl.*, 2 (1993) 341-345.
- [33] Russel, J.R., Hosein, F., Jhonson, E., Waugh, R. And Powell, W. "Genetic differeantiation of cocoa populations revealed by RAPD analyses" *Mol. Ecol.*, 2 (1993) 89-97.
- [34] Novy, R.G., Kobak, C., Goffreda, J. And Vorsa, N. "RAPDs identify variatelmisclassification and regional divergence in cranberry" *Theor Appl. Genet.*, 88 (1994) 1004-1010.
- [35] Yang, X. And Quiros, C. "Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers" *Theor. Appl. Genet.*, 86 (1993) 205-212.
- [36] Wachira, F.N., Waugh, R., Hackett, C.A. and Powell, W., "Detection of genetic diversity in tea using RAPD markers" *Genome*, 38 (1995) 201-210.

- [37] Millan, T., Osuna, F., Cobos, S., Torres, A.M. and Cubero, J.I. "Using RAPDs to study phylogenetic relationships in Rosa" *Theor Appl. Genet.*, 92 (1996) 273,277.
- [38] Lodhi, M.A., Daly, M.j., Ye, G-N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. "A molecular marker based linkage map of Vitis.", *Genome*, 38 (1995) 786-794.
- [39] Rafalski, J.A., Vogel, J.M., Morgante, M., Powell, W., Adre, C., Tingey, S.V., "Generating and using DNA markers in plants. In: birren B., Lai E. (eds) Nonmammalian genomic analysis. A practical guide" *Academic Press, San Diego*. (1996) pp 75-134.
- [40] Mueller, UG., Wolfenbarger, LL., "AFLP genotyping and fingerprinting" *TREE*. 14 (1999) 389-394.
- [41] Cantini, C., Cimato, A., Sani, G., "Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region" *Euphytica*, 109 (1999) 173-181.
- [42] Soller, M., Beckman, J.S., "Genetic polymorphism in varietal identification and improvement" *Theor Appl Genet*, 67 (1983) 25-33.
- [43] Sensi, E., Vignani, R., Scali, M., Masi, E., Cresti, M. " DNA fingerprintinf and genetic relatedness among cultivated varieties of *Olea europaea L.* Estimated by AFLP analysis" *Scientia Horticulturae*, 97 (2003) 379-388.
- [44] Pontikis, C.A., Loukas, M., Kousounis, G. "The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars" *J. Hort. Sci.*, 55 (1980) 333-343.
- [45] Quazzanni, N., Lumaret, N.R., Villemur, P., di Giusto, F. " Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea L.*)" *J.Hered.*, 84 (1993) 34-42.

[46] Trujillo, I., Rallo, L. "Identifying olive cultivars by isozyme analysis" *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 120 (1995) 318-324.

[47] Bogani P., Cavalieri D., Petrucelli R., Polsinelli L., Roselli G., "Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA" *Acta Hort*, 356 (1994) 89-101

[48] Fabri A., Hormaza JI., Polito VS., "Random amplified polymorphic DNA analyses of olive (*Olea europaea L.*) cultivars" *J. Am Soc Hort Sci*, 120 (1995) 538-542

[49] Claros, M.G., Crespillo, R., Aguilar, M.L., Canovas, F.M. "DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea L.*)" *Euphitica*, 116 (2000) 131-142.

[50] Gallitelli M., Semeraro L., Gioriro G., "Valutazione del grado di variabilita genetica tra 15 cultivar di olivo (*Olea europaeae L.*) con l'uso di marcatori molecolari (RAPDs)" *XXXVI Italian Society for Agricultural Genetics National Congress, Metaponto, Italy, 5-8 October (1992) Abstract 84.*

[51] Vergari G., Patumi M., Fontanazza G., "Use of RAPDs markers in the characterisation of olive germplasm" *Olivae*, 60 (1996) 19-22

[52] Weisman Z., Avidan N., Lavee S., Quebedeaux B., "Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West Bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers" *J Am Soc Hort Sci*, 123 (1998) 837-841

[53] Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., "Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms" *Theor Appl Genet.*, 98 (1999) 411-421..

- [54] Besnard G., Berville A., "Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. Ssp. *Europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms" *Life Sci.* 323 (2000) 173-181
- [55] Rallo P., Dorado G., Martin A., "Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.)" *Theor Appl Genet*, 101 (2000) 984-989
- [56] Sefc KM., Lopes MS., Mendonca D., Rodrigues dos Santos M. Laimer da Camara Machado M., da Camara Machado A., "Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterisation in Italian and Iberian olive trees" *Mol Ecol*, 9 (2000) 1171-1173.
- [57] Carriero F., Fontanazza F., Cellini F., Giorio G., "Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olivo (*Olea europaea* L.)" *Theor Appl. Genet.*, 104 (2002) 301-307.
- [58] Quazzani, N., Lumaret, N.R., Villemur, P., di Giusto, F., "Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.)" *J.Hered.*, 84 (1993) 34-42.
- [59] Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., et al., "Cultivar identification in olive based on RAPD markers" *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 126 (6) (2001) 668-675.
- [60] Besnard, G., Green, P.S., Berville, A., "The genus *Olea*: molecular approaches of its structure and relationships to other *Oleaceae*" *Acta Bot. Gallica*, 149 (1) (2002) 49-66.
- [61] Caraffa, V.B., Giannettini, J., Gambotti, C., Maurry, J., "Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers" *Euphytica*, 123 (2002) 263-271.
- [62] Luma, Y. ve ark., Ayvalık yağlık çeşidinde klonal seleksiyon, Edremit, (1986).

- [63] Dellaporta, S.L., Wood, J. And Hicks, J.B. "A plant DNA minipreparation: Version II." *Plant Mol. Biol. Rptr.*,1 (1983) 19-21.
- [64] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue" *Phytochem Bullet*, 19 (1987) 11-15
- [65] Pich, U and Schubert, I., "Miniprep yöntem for isolation of DNA from plants with a high content of polyfenols" *Nucl. Acids REs.*, 21 (1993) 3328.
- [66] Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., In *moleculer cloning: A laboratory Manual 2nd eition*, Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York, 1982.
- [67] Do, N. and Adams R.P. "A simple technique for removing polisccharide contaminants from DNA" *Biotechniques*. 10 (1991) 162-166.
- [68] Kayihan, G.C., *The Genetic Structure of Cedrus Libani A. Rich Populations Determined by DNA Markers*, M. Sc. Thesis, The Middle East Technical University Institute of Science, The Department oh Biology, Ankara, (2000).
- [69] Rogers, S.O. and Bendich, A.J. "Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi" (Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. eds.) *Plant molacular biology manual. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.* (1994).
- [70] Weising, K., Nybom, K., Wolff, K. and Meyer, W. "DNA fingerprinting in plants and fungi" *CRC Press, Boca Raton, Fla.* (1995
- [71] Hattori, J., Gottlob-McHugh, S.G., Jhonson, D.A. The isolation of high-molecular-weight DNA from plants" *Anal. Biochem.* 165 (1987) 70-74.
- [72] Demeke, T. and Adams, R.P. "The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR" *Biotechniques*. 12 (1992) 332-334.

[73] Murray, M.G. and Thompson, W.F. "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA" *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 4321-4325.

[74] Furokawa, K. and Bhavadna, V.P. "Influences of amniotic Polysaccharides on DNA synthesis in isolated nuclei and by DNA polymerase: Correlation of observed effects with properties of the polysaccharides" *Biochem. Biophys. Acta* 740 (1983) 466-475.

[75] Shioda, M. And Marakami-Muofushi, K. "Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Physarum polycephalum*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146 (1987) 61-66.

[76] Gelfand, D.H. and White, T.J. "Thermostable DNA polymerases, PCR Protocols. A guide to yöntem and applications" (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds.) *Academic Press, San Diego* (1990) 129-141.

[77] Tura Kockar, F., Characterisation of the coding and the promoter region of the *Xenopus leavis* C/EBP alpha gene, Ph. D. Thesis Cardiff School of Biosciences, Cardiff University (1999).

[78] Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, (6), EDINBURGY at the University Pres, (1978) 155-156

ÖZET

BAZI ZEYTİN KLONLARINDA RAPD MARKERLERİ KULLANILARAK GENETİK İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Rahşan İLİKÇİ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Balıkesir, 2003

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) temelde Akdeniz bölgesinde bulunan kültüre alınmış bir bitkidir. Edremit, zeyincilik ve zeytinyağı üretimi açısından Türkiye’de en önemli bölgelerden birisidir. Bölgede sayısız kültüre alınmış zeytin klonları bulunmakta ve bunların büyük çoğunluğunun morfolojik olarak ayırımı yapılamamaktadır. Bu yüzden, moleküler markerların kullanımı özellikle zeytin klonlarının ayırt edilmesi ve genetik ilişkilerinin belirlenmesi açısından gereklidir.

Bu çalışmada, Edremit Zeytincilik Fidan Üretim Merkezinden elde edilen zeytin klonları arasındaki genetik ilişki RAPD-PCR tekniği kullanılarak incelenmiştir. RAPD markerleri bitki türleri ve diğer organizmalar arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede kullanılan bir tekniktir. Fakat bitkilerden yüksek saflıkta DNA izolasyonu, farklı bitkilerin yüksek düzeyde polisakkarit ve polifenolik bileşikler içerdikleri için zordur. Bu yüzden, farklı yöntemler kullanılarak RAPD-PCR için uygun olabilecek modifiye DNA izolasyon yöntemi geliştirildi. En iyi reaksiyon koşullarını belirlemek amacıyla RAPD-PCR reaksiyonları optimize edildi. Farklı zeytin klonlarının modifiye prosedürle elde edilen DNA’ları ve 9 farklı 10 bazlık primer kullanılarak RAPD-PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Jel elektroforezi sonucunda elde edilen amfiliye edilen bantlar arasında var ve yok olan bantlar değerlendirildi. Zeytin klonları arasında genetik ilişkinin belirlenmesi içinde ayrıca Pairwise Distance analiz de yapıldı ve UPGMA algoritması kullanılarak bir fenogram oluşturuldu.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *Olea europaea*, Türkiye, Zeytin, RAPD, genetik çeşitlilik.

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY FROM SOME OLIVE CULTIVAR USING RAPD MARKERS

Rahşan ILIKÇI

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(MSc. Thesis / Supervisor: Dr. Feray Köçkar)

Balıkesir- Turkey, 2003

Olive tree (*Olea europaea* L.) is a cultivated plant mainly localized in Mediterranean region. Edremit is one of the most important regions in Turkey for the production of olive and oil olive oils. There are numerous cultivars in the region, which most of them cannot be identified by phenotypic markers. Therefore, the use of the molecular markers is required for identification and genetic relationship for the olive clones.

In this study, genetic relationships of six olive clones obtained from Edremit Olive Germplasm Center were investigated using RAPD markers. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR is a technique that can distinguish the genetic relationship amongst plant species and other organisms. However, isolation of high quality DNA from plant is difficult due to high level of polysaccharides and other substances that can interfere particularly RAPD-PCR reactions. Therefore, the genomic DNA suitable for RAPD-PCR reaction was optimized using different methods. The RAPD-PCR reaction parameters were optimized in order to obtain the best reaction conditions. The genomic DNA of different olive clones obtained from a modified procedure were subjected to RAPD PCR reaction using nine 10-mer primers. The absence and presence of the bands have been determined amongst the amplified patterns obtained from agarose gel electrophoresis. Pairwise Distance analysis have been also performed in order to evaluate the genetic relationship between olive clones and dendrogram has been obtained using UPGMA algorithms.

KEY WORDS: *Olea Europaea*, Turkey, Olive, RAPD, genetic diversity.