

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARPA (*Hordeum vulgare* L.) DÖL
ANALİZİNDE GENETİK MARKIRLARIN
KULLANIMI

Elif Aylin ÖZÜDOĞRU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2000

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ARPA (*Hordeum vulgare* L.) DÖL
ANALİZİNDE GENETİK MARKIRLARIN
KULLANIMI

Elif Aylin ÖZÜDOĞRU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN

GEBZE
2000

ÖZET

Bitki yetiştiriciliğinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri kantitatif kalıtım gösteren kuraklığa direncin sağlanmasıdır. Bu çalışmada da kuraklığa dirençli ve hassas genotiplerden oluşan arpa (*Hordeum vulgare L.*) ailesine ait F₂ populasyonunda kuraklığa direnç geninin araştırılması ve kuraklığa dirençli ve hassas olan genotipler arasındaki polimorfizmlerin DNA düzeyinde belirlenmesi amacıyla RAPD markırları kullanılmıştır. Çalışmada, yaprak alanı, nispi su içeriği, paraquat klorofil yıkımı ve paraquata dayalı total protein analizi gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal parametreler aracılığı ile belirlenmiş olan kuraklığa hassas ve dirençli genotiplerdeki bitki materyali kullanılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonlarında kullanılan 28 adet oligonükleotid primerden 8 tanesi ile, uzunlukları yaklaşık 250-5000 bp. arasında değişen toplam 109 farklı amplifikasyon ürünü elde edilmiştir. Bunlardan B-374 primeri (5'-GGT CAA CCC T-3') ile yapılan amplifikasyon sonucunda elde edilen, hassas bireylerin %67' sinde gözlenirken dirençli bireylerde gözlenmeyen, yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki bir markırın kuraklığa dirençle ilgili olduğu düşünülmektedir.

Polimorfizm oranlarının değerlendirilmesi sonucunda ise F₂' lerin ebevyenlerle ve birbirleri ile olan benzerlik oranları belirlenmiştir. Buna göre kuraklığa dirençli olan ebeveyn Tokak' a en çok benzeyen bireyin %62,97' lik benzerlik oranı ile kuraklığa hassas olan F₂19 olduğu gözlenmiştir. Kuraklığa hassas olan ebeveyn 5819' a da %54,55' lik oranla en çok benzeyen bireyin yine F₂19 olduğu görülmüştür. F₂ bireyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında birbirine en çok benzeyen bireylerin kuraklığa hassas olan F₂18 ve F₂19 (%71,47) bireyleri olduğu belirlenmiştir. Birbirine en az benzeyen bireylerin ise %38,05 oranı ile F₂21 (hassas) ve F₂76 (dirençli), %39,65 oranı ile F₂21 (hassas) ve F₂73 (dirençli) ve %39,86 oranı ile F₂19 (hassas) ve F₂56 (dirençli) bireylerinin olduğu gözlenmiştir.

SUMMARY

Drought tolerance improvement, which is a quantitative trait, is probably one of the most difficult task for the cereal breeders. In this study RAPD markers were used to estimate drought tolerance and to identify the polymorphisms among drought resistant and sensitive genotypes in a segregating F_2 population of barley (*Hordeum vulgare* L.). The plant material consisting of resistant and sensitive genotypes were identified by physiological and biochemical parameters such as leaf area, relative water content, paraquat chlorophyll destruction and paraquat dependent total protein analysis. 28 oligonucleotide primers were used in amplification reactions and 8 of them produced 109 different amplification products ranging between 250-5000 bp. One of these products amplified by primer B-374 (5'-GGT CAA CCC T-3') was found in 67% of sensitive genotypes while it was not found in any of the resistant ones. The possible use of this RAPD marker for selection of drought tolerant individuals in breeding programmes were discussed.

As a result of the evaluations of the polymorphism rates, similarity rates between the F_2 s and the parents and also in between the F_2 individuals were determined. According to these results, drought sensitive individual F_2 19 have shown the highest similarity to the sensitive parent (54,55%) and also to the resistant parent (62,97%). The highest similarity rate in between the F_2 individuals was between the two drought sensitive individual F_2 18 and F_2 19 (71,47%). The lowest similarity rates were 38,05% (F_2 21- F_2 76), 39,65% (F_2 21- F_2 73) and 39,86% (F_2 19- F_2 56).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başlangıcından sonuçlandırılmasına kadar hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve her zaman bana destek olan danışman hocam Sn. Prof .Dr. Abdülkadir Akçin' e tüm yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca beni yüksek lisans yapmaya teşvik eden, deneylerimi TÜBİTAK-MAM-GMBAE Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarlarında yürütmemi sağlayan ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen sevgili hocam Sn. Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı' ya teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü' ndeki araştırmacı arkadaşım Ahu Altınkut-Uncuoğlu' nun yardımları ve desteği olmasaydı tezimi gerçekleştirmem çok daha zor olurdu. Bu yüzden deneylerimin her aşamasında kendi tezi gibi ilgilenen, yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her zaman bana destek olan Ahu Altınkut-Uncuoğlu' na içten teşekkürlerimi sunarım. Bunun yanı sıra, ihtiyacım olan her anda yardım ve desteklerini esirgemeyen Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü' ndeki tüm diğer araştırmacı arkadaşlarıma da teşekkür ederim. Ayrıca özellikle dendogramların tezimde yer almasını sağlayan, yorumları ve her türlü yardımlarıyla bana destek olan Dr. Ali Ergül' e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında, 13 yıldır en iyi arkadaşım olan ve bu zaman içinde de meslektaş olduğumuz ve araştırmalarımız boyunca da Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü' nde birlikte çalıştığımız canım dostum Araş. Gör. Yelda Özden' in en az benim kadar emeği bulunmaktadır. Bana her zaman destek ve yardımcı olan sevgili meslektaşına içten teşekkür ederim. Ayrıca özellikle bilgisayarla ilgili konularda yardıma ihtiyacım olan her anda yanımda olan Araş. Gör. Funda Şentürk ve tez yazım aşamasında her zaman destek olan Araş. Gör. Tuba Yıldırım başta olmak üzere, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü' ndeki tüm çalışma arkadaşlarıma her türlü yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde olduğu gibi tez çalışmam sırasında da her türlü maddi ve manevi destekleriyle başarılarımda en büyük paya sahip olan canım aileme ve tüm arkadaşlarıma teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KONU İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Bitki Materyali	24
3.2. Metod	25
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu	25
3.3. Arpa Genomik Parmakizlerinin RAPD Analiz	
Yöntemiyle Çıkarılması	27
3.3.1. RAPD Analizlerinde Kullanılan Primerler	27
3.3.2. RAPD Analizlerinde Kullanılan Enzim	27
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Yürütülmesi	28
3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi	29
3.3.4.1. %0,8' lik Jel	29
3.3.4.2. %1,2' lik Jel	30
3.3.4.3. %2' lik Jel	30
3.3.5. %2' lik Jelin Boyanması	31
3.4. Polimorfizm Oranlarının Hesaplanması	32
4. BULGULAR	33
4.1. DNA İzolasyon Yönteminin Belirlenmesi	33
4.2. PCR Amplifikasyon Şartlarının Optimizasyonu	34
4.3. Arpa Bireylerinin Genomik Parmalızlerinin Çıkarılması	34

4.4. Arpa Bireyleri Arasındaki Polimorfizm Değerlerinin Karşılaştırılması	50
5. TARTIŞMALAR	56
5.1. Uygun DNA İzolasyon Yönteminin Seçilmesi	56
5.2. Uygun Genetik Markırın Seçilmesi	57
5.3. RAPD Amplifikasyon Şartlarının Optimizasyonu	59
5.3.1. RAPD Bileşenlerinin Optimizasyonu	59
5.3.1.1. DNA Konsantrasyonu	59
5.3.1.2. Primer Konsantrasyonu	60
5.3.1.3. dNTP Konsantrasyonu	60
5.3.1.4. MgCl ₂ Konsantrasyonu	61
5.3.1.5. Tampon Konsantrasyonu	61
5.3.1.6. Enzim Konsantrasyonu	61
5.3.2. RAPD Koşullarının Optimizasyonu	62
5.3.2.1. Denatürasyon Zamanı ve Sıcaklığı	63
5.3.2.2. Primer Bağlanması	63
5.3.2.3. Primer Uzaması	63
5.3.2.4. Döngü Sayısı	64
5.4. Uygun Elektroforez Yönteminin Seçilmesi	64
5.5. RAPD Markır Sonuçlarının Değerlendirilmesi	65
5.6. Arpa Bireyleri Arasındaki Polimorfizm Oranlarının Değerlendirilmesi	67
6. SONUÇLAR	71
7. KAYNAKLAR	72
8. ÖZGEÇMİŞ	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AFLP	Amplifikasyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphisms)
AP-PCR	Rastgele Primerle Çoğaltılmış Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Arbitrary Primed Polymerase Chain reaction)
b.ç.	Baz Çifti
BSA	Bulk Ayrılma Analizi (Bulk Segregation Analysis)
C	Sitozin
°C	Santigrad Derece
CAPS	Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Cleaved Amplified Polymorphic DNA)
CsCl	Sezyum Klorür
CTAB	Cetyltrimetilammoniumbromide
DAF	DNA Amplifikasyon Parmakizi (DNA Amplification Fingerprinting)
dATP	Deoksiadenozidtrifosfat
dCTP	Deoksisitozintrifosfat
DGGE	Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dGTP	Deoksiguanozintrifosfat
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dTTP	Deoksitimidtrifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ENZ	Enzime Özgün Dizi
EtBr	Etidyum bromür
EXT	Seçici Kuyruk
G	Guanin
gr	Gram
HCl	Hidroklorik Asit

kb	Kilobaz
KCl	Potasyum Klorür
m	Metre
M	Mol
mg	Miligram
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimol
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
N	Nükleotid
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilenglikol
pH	Hidrojen İyon Konsantrasyonu
PQ	Paraquat
PVP	Polivinilpirolidon
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
rDNA	Ribozomal DNA
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphisms)
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Dakikada Dönme Sayısı (Rotation Per Minute)
S.I.	Benzerlik Oranı (Similarity Index)
sl	Ara Uzunluk (Spacer Length)
SSCP	Tek Zincirli Konformasyonel Polimorfizm (Single-Strand Conformational Polymorphisms)
SSLP	Basit Dizi Uzunluk Polimorfizmi (Single Sequence

	Length Polymorphisms)
T	Timin
TAE	Tris-Asetat
TGGE	Sıcaklık Derece Jel Elektroforezi (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
T_m	Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)
TÜBİTAK-MAM-GMBAE	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu- Marmara Araştırma Merkezi-genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü
U.V.	Ultraviyole
ü	ünite
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
2.1. RAPD yönteminin şematik anlatımı	16
4.1. Genomik DNA izolasyonu	35
4.2. OPC-6 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	36
4.3. PRA-3 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	37
4.4. O-19 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	38
4.5. O-10 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	39
4.6. B-374 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	40
4.7. A-9 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	41
4.8. UBC-237 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	42
4.9. OD-8 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
3.1. Çalışmada kullanılan bitki materyali	24
3.2. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan solusyonlar	26
3.3. RAPD analizinde kullanılan primerler	28
3.4. RAPD bileşenleri	29
3.5. Termal sayklının programlanması	29
3.6. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan maddeler	31
4.1. Arpa DNA' sı spektrofotometre sonuçları	33
4.2. OPC-6 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	44
4.3. PRA-3 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	44
4.4. O-19 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	45
4.5. O-10 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	45
4.6. B-374 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	46
4.7. A-9 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	46
4.8. UBC-237 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	47
4.9. OD-8 primeri ile elde edilen RAPD markırların dağılımı	47

4.10. F_2 bireylerinin 5819' la (hassas ebeveyn) ve birbirleri ile olan benzerlik oranları	52
4.11. F_2 bireylerinin Tokak' la (dirençli ebeveyn) ve birbirleri ile benzerlik oranları	53
4.12. 5819' la F_2 bireylerinin dendogram şemaları	54
4.13. Tokak' la F_2 bireylerinin dendogram şemaları	55

1. GİRİŞ

Arpa tahıllar arasında, gerek iç gerek dış özellikleri bakımından, çok geniş bir çeşitlilik gösterir (örneğin vegetasyon süresi, uyum gücü, istekleri gibi). Bu nedenle Norveç’ te 70° kuzey enlemi ile güney yarımkürede Arjantin’ de 45° güney enlemi arasındaki iklim koşullarında arpa yetişir. Dikey olarak en fazla çıkabildiği yükseklik Himalaya Dağları’ nın güneybatı yörelerinde 4480 m’ dir (Hoffmann, 1961). Ayrıca çok kurak olan Sahra’ da ve çok yağışlı olan Hindistan’ da da yetiştirilmektedir (Demir, 1983). Bütün bu değerler arpanın yeryüzünde yatay ve dikey olarak oldukça geniş bir alana yayıldığını gösterir. Bununla beraber, genel dağılımına bakıldığında dünyada arpa ekilişinin büyük çoğunluğunun kuzey yarımkürede olduğu görülmektedir. Ülkemizde ise tüm tarım bölgelerimizde ve, buğdayda olduğu gibi, Rize dışındaki tüm illerimizde arpa ekilmektedir (Kün, 1988).

En eski kültür bitkisi olarak, binlerce yıl insan besini olarak kullanılmış olan arpa, yer yer içki yapımında (özellikle II. Dünya Savaşı’ ndan sonra bira tüketiminin hızlı bir şekilde artışı arpa üretimine önem kazandırmıştır; Demir, 1983) ve VI. yüzyıldan itibaren de hayvan beslenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Önceleri insan beslenmesinde büyük payı olan arpa, günümüzde bu yerini kısmen buğday ve çavdara bırakmıştır. Bugün arpa unu, ancak bazı ülkelerde buğday ununa %8-10 oranında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Arpa ununda gluten bulunmaması ve esmer ekmek vermesi, ekmek yapımında arpanın kullanılmamasının baş nedenidir. Günümüzde arpa danesi; büyük çoğunlukla hayvan yemi, malt ve bira endüstrisinin ham maddesi olarak kullanılmaktadır. Hayvan yemi olarak tüketilen tahıl cinsleri arasında, yem değeri en üstün olan arpadır. %79’ u aşan nişasta değeri nedeniyle, öteki yemlere üstünlük gösterir ve diğer yemlerin karşılaştırılmasında ölçü olarak kullanılır. Ayrıca malt artığı olarak bazı maddelerin karışımına giren besinlerin elde edilmesinde de kullanılır. Sapları saman ve yataklık olarak, malt artığı küspe ise yaş ya da kuru olarak hayvan beslemede kullanılır. Malt şurubu; ekmekçilik, şekerleme, dokuma endüstrisinde; yapıştırıcı etkisi nedeniyle tıpta ayrıca maltlı süt, alkol, sirke ve maya yapımında kullanılır (Kün, 1988).

Arpa sadece dünyadaki en önemli dördüncü tahıl ürünü olmakla kalmaz, aynı zamanda oldukça küçük, basit bir genoma sahip olan diploid bir organizma olduğundan biyokimyacılar, fizyologlar, genetikçiler ve moleküler biyologlar için de iyi bir model organizmadır (Gürel et. al., 1993). Bu sebeple de tahıllar içinde genetik olarak en fazla araştırılan bitkidir. Kromozom haritaları, genlerin bağlantı grupları, bu gruplar arası translokasyonlar ve genler arası “krossing-over” değerleri bulunmuştur. Kendine döllen ve temel kromozom sayısı 7 olan arpanın $2n=14$, 28 ve 42 olan formlarına rastlanmaktadır. Hatta bazen aynı türde (örneğin *Hordeum nodosum*) diploid-tetraploid-hekzaploid formlara rastlanır. *Hordeum* genusunda diploid ve tetraploid olmak üzere 25-30 tür vardır. Ancak kültürü yapılan tüm arpalar diploiddir ($2n=14$). Tetraploid kültür arpası bulunmamaktadır. Suni olarak kolşisin ile muamele edilen tetraploid arpalar zayıf geliştiğinden ve diploidlerden daha verimsiz olduğundan ekonomik değerleri yoktur (Demir, 1983). $n=7$, 14, 21 gibi değişik kromozom sayılı yabancı türlerin birbirleriyle ya da kültür türleriyle melezlenmesinden elde edilebilen tüm tetraploid melezler kısırdır. Poliploid yabancı arpa türlerinde bitkilerin vegetatif ve generatif gelişmesi, kültür arpalarına göre çok geridedir (Kün, 1988). Tüm bu sebeplerden dolayı arpa poliploidi ıslahı ümit verici değildir (Demir, 1983).

Yeryüzünde üç adet arpa gen merkezi vardır:

1. Doğu Asya : 6-sıralı kültür arpalarının birincil (primer) gen merkezi.
2. Önasya : 2-sıralı yabancı arpaların, 2-sıralı kültür arpalarının ve 6-sıralı kültür arpalarının gen merkezi.
3. Etopya ve Eritre : Hemen hemen tüm formların ikincil (sekonder) gen merkezi (Kün, 1988).

Arpa ıslah çalışmalarında bu kaynaklardan yararlanılır. Arpa ıslahının tarihçesi de, arpanın kendisi gibi, çok eski zamanlara dayanır. İlk defa 1820 yılında, İngiltere’ de “chevalier” arpası ıslah edilmiştir. O zamandan beri de; dane veriminin artırılması, enfeksiyon hastalıklara, zararlılara, soğuğa, kurağa, diğer dış şartlara direnç sağlanması ve kalitenin artırılması amacıyla ıslah çalışmaları devam etmektedir. Özellikle yerli çeşitler, arı döllerinin karışımından meydana geldiklerinden, bunlarda hastalıklara, kuraklığa, soğuğa direnç genlerine rastlanmaktadır (Demir, 1983).

Yurdumuzda da arpa verimini sınırlandıran en önemli etkenlerin başında kuraklık gelir (Altınkut et. al., 1998). Kuraklık kantitatif bir özelliktir ve kantitatif karakterler kalitatif karakterlerden, bireylerin kesin fenotipik sınıflara ayıramaması sebebiyle farklılık gösterirler. Sürekli bir çeşitlilik gösterdiklerinden kantitatif karakterlerin araştırılmasında Mendel kuralları direkt olarak uygulanamaz (Prioul et. al., 1999). Klasik ıslahçılar genelde gözle görülen morfolojik parametreleri (bitki boyu, yaprak genişliği gibi) ön seleksiyon kriteri olarak kullanıp kuraklığa dayanıklı çeşitler geliştirmektedir. Bu morfolojik testlere daha sonraki yıllarda fizyolojik testler (Van Rensburg and Krüger, 1994) eklenmiştir. Ancak daha sonra pek çok ürün türüne uygulanabilen DNA' ya dayalı metodların geliştirilmesi ıslah çalışmalarına zaman açısından ivme kazandırmış (Jamaux et. al., 1997), bitkiler ve aileiçi hatlar arasındaki farklılıkların belirlenme gücünü arttırmıştır (Smith and Chin, 1992). Örneğin DNA proplarına dayanan markırlar yani restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (RFLP=Restriction Fragment Length Polymorphisms) genetik haritaların ve tarımsal ve fizyolojik öneme sahip karakterlerin haritalanmasının gelişimine yeni boyutlar getirmiştir. Bununla beraber, bu markırlar pahalıdır, zaman alırlar ve büyük ve karmaşık bir genoma sahip olan bazı türlerde (örneğin buğday gibi) kullanımı teknik olarak zordur (Weining and Langridge, 1991).

1985 yılında, tahıl genomunun haritalanmasında bugünkü sınırlamaların üstesinden gelme yeteneğine sahip olan ve belirli nükleotid dizilerinin çıkarılmasında alternatif bir metod olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR=Polymerase Chain Reaction) geliştirilmiştir (Saiki et. al., 1985; Mullis and Faloona, 1987). PCR; belirlenmesi mümkün olmayacak kadar az bir miktar hedef DNA' nın özgün dizilerinin *in vitro* amplifikasyonuna imkan tanıyan, bugün biyolojinin pek çok dalında kullanılan çok güçlü bir tekniktir (Erlich, 1989; Innis and Gelfand., 1990). Sadece bazı bireyler arasında paylaşılan PCR ürünleri, filogenetik ve genetik haritalama metodlarında kullanılan diğer polimorfik karakterlere benzer şekilde, polimorfik markır olarak rol oynarlar. Böylece elde edilen sonuçlar, aynı türün birbirine çok yakın kalıtları arasındaki farklılıkların bile belirlenebilmesini sağlar. Bu polimorfizmler genetik olarak haritalanabilir (Welsh et. al., 1991).

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde son zamanlarda yapılan bir gelişme; rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA' dır (RAPD=Random Amplified Polymorphic DNA: Welsh and McClelland, 1990; Williams et. al., 1990b). İzozimlerin tersine, RAPD; genomun daha rastgele bir kısmını gerektirir ve genetik analizlerde kullanılmak üzere sınırsız sayıda lokus üretebilir. RAPD' in bir diğer üstünlüğü de; genetik analizlerde yaygın olarak kullanılan RFLP' ye nazaran daha kolay laboratuvar işlemlerini ve genomik DNA' nın daha küçük bir parçasını gerektirmesidir (Whitkus et. al., 1994).

RAPD henüz yeni bir teknik olmasına rağmen, genetik haritaların kurulması, özgün fenotipik kalımlarla bağlantılı genetik markırların üretimi, ebeveyn tayini, klonların ve yetiştirilen yeni bitkilerin belirlenmesi ve populasyon dinamiği dahil olmak üzere pek çok konudaki kullanırlılığı ispatlanmıştır (Hadrys et. al., 1993; Williams et. al., 1993; Whitkus et. al., 1994).

Yaptığımız bu çalışmada da kuraklığa hassas ebeveyn (5819), kuraklığa dirençli ebeveyn (Tokak), 1 F₁ ve kuraklığa hassas ve dirençli genotiplerdeki 14 F₂ bireyinden oluşan arpa (*Hordeum vulgare* L.) ailesinin, RAPD markırları kullanılarak döl analizlerinin çıkarılması ve kuraklığa hassas ve dirençli genotipler arasındaki genetik polimorfizmlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak DNA izolasyonları yapılan örneklerin DNA bankaları kurulmuş ve daha sonra bu genetik materyal kullanılarak, RAPD tekniği ile DNA parmakizleri çıkarılmıştır. Ortaya çıkan bu parmakizleri değerlendirilerek polimorfizm oranları % olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçların *Hordeum vulgare* üzerinde, bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutması umulmaktadır.

2. KONU İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR

Arpa; diploid, kendi kendine tozlaşan, çiftlik hayvanlarının ve insanların dietinde bulunan, yaygın olarak adapte olmuş bir tahıldır. Arpanın iyi geliştirilmiş klasik ve genomik haritası (Sogaard and von Wettstein-Knowles, 1987) ve bir markır seti vardır (Shin et. al., 1990). Kültüre alınan arpa varyeteleri ve yabani hatlar değişik çevre koşullarına uyum gösterecek biçimde insan ve doğa tarafından seleksiyona uğratılmışlardır (Moore et. al., 1993).

Son yıllara kadar arpa yetiştiriciliğindeki gelişmeler fenotipe dayalı olarak yapılan genetik analizlere dayanıyordu (Gözükırmızı et. al., 1995). Genelde fenotipik belirleme morfolojik karakterlere dayanır (Hu and Quiros, 1991). Tek bir gen tarafından kontrol edilen bu morfolojik karakterler, eğer ekspresyonları geniş çevresel şartlarda tekrarlanabilirse, genetik markır olarak kullanılabilirler (Staub et. al., 1996). Bu durumda fenotipe dayalı seleksiyon; çevre, multigenik ve kantitatif kalıtım, tam olmayan dominantlık vb. gibi olaylardan etkilenmektedir (Tingey et. al., 1993). Bununla beraber, morfolojik markırlar nadir olarak kesin bir tanımlama sunarlar ve bitkilerin belirlenmesindeki kullanımları sınırlıdır (Stagemann, 1984). Daha da ötesi, bu metodlar pahalıdır, zordur ve çevresel şartlara duyarlı olan bitki büyümesinin uzun bir süre incelenmesini gerektirir (Hu and Quiros, 1991). Bu yöntemlerde karşılaşılan güçlükler (fenotipin çevresel ve gelişimsel etkenlerden etkilenmesi), özgün enzimlerin allelik çeşitliliğine dayanan markırların gelişimi (izozimler; Tanksley and Orton, 1983) ve genotipin direkt olarak DNA düzeyinde tanımlanması sonucu giderilmiştir (Albayrak et. al., 1995).

İzozimler; farklı yüklenmiş, elektroforetik yöntemlerle (genellikle nişasta jeli) ayrılacak protein molekülleridir (Markert and Moller, 1959). Enzimler belirli kimyasal reaksiyonları katalizlediğinden, uygun substrat ve kofaktörün sağlanması ve enzimatik reaksiyonun ürününün renk-üreten bir reaksiyona sokulması ile belirli enzimin yerleşimi belirlenebilir. Renkli ürün, belirli enzimin elektroforetik olarak yerleştiği bölgede görünür bir bant oluşturularak jelde tutulur. Belirli enzimlerden görünür hale gelen bantlar protein ürünlerini temsil ederler, genetik temellidirler ve

kodominant markırlar olarak genetik bilgi sağlayabilirler. Bununla beraber, izozim lokuslarının azlığı ve bunların post-translasyonel modifikasyonlara tabi olmaları onların yararlarını sınırlamaktadır (Staub et. al., 1982).

İzozim analizleri gibi biyolojik karşılaştırmalarda kullanılan pek çok tekniğin aksine DNA' ya dayanan metodlar örnek materyalin filogenini ve ilişkisini direkt olarak aksettirir. Daha da ötesi, DNA kimyası hücre tipleri arasında farklılık gösterdiğinden ve baz çifti mutasyonları her hücre bölünme döngüsünde durgun olarak kalıtım gösterdiğinden, tek hücreyi bireyden ayırabilirler. Kararlılığı, yumuşaklığı, her yerde bulunması sebebiyle DNA analizler için ideal ortamdır. Örneğin; sadece birkaç hücreden alınan DNA materyali veya mumyalanmış ya da fosilleşmiş materyallerden alınan eski DNA materyali DNA amplifikasyonlarıyla analiz edilebilir (Paabo, 1989; Gollenberg et. al., 1990; Hagelberg et. al., 1991). Bu amaçla günümüzde, temel olarak DNA' yı ele alan genetik markır teknikleri geliştirilmiştir (Williams et. al., 1990b; Shin et. al., 1990).

Bu tekniklerden biri olan RFLP' ler genomik DNA moleküllerini belirli nükleotid dizilerinde (restriksiyon bölgeleri) kesen restriksiyon enzimlerinin kullanımıyla belirlenirler (Staub et. al., 1996). Restriksiyon enzimleriyle DNA' nın kesilmesinin ardından parça uzunluklarında çeşitlilikler meydana gelir. Bu polimorfizmleri belirlemek için DNA kesilir, elektroforezle ayrılır, membrana aktarılır ve izotoplarla işaretlenmiş DNA problarıyla hibritlenir. X-ışınları filmlerinde çeşitli bant modelleri şeklinde açığa çıkan parmakizleri, seçilen proba belirlenen polimorfik parçaların sonucudur. Prob DNA çoklu ikili-tekrarlara veya çok çeşitli minisatellitlere hibritlenerek (Jeffreys et. al., 1985a,b; Vassart et. al., 1987) karmaşık parmakizi modelleri üretebilir (Caetano-Anollés et. al.,1991b). Alternatif olarak; problemler bireysel ve çok çeşitli gene özgün olabilir (Wong et. al., 1986, Nakamura et. al., 1987; Wong et. al., 1987; Armour et. al., 1989) ve tek hatta çoklu lokustan allellerin belirlenmesi yoluyla daha basit modeller üretilebilir (Caetano-Anollés et. al.,1991b).

Bitki yetiştiriciliğinde RFLP markırların kullanımının, çok güvenilir bir metod olduğu kanıtlanmış ve oldukça iyi kurulmuştur (Tanksley et. al., 1989).

RFLP markırları, orjinal olarak genomların parmakizinin çıkartılmasını (Botstein et. al.,1980; Wyman and White, 1980), farklı türlerin genom haritalanmasının (arpa için: Graner et. al., 1991; Kleinhofts et. al., 1993), markır aracılığı ile yapılan seleksiyonun (Ma et. al., 1994; Schachermayr et. al., 1994) ve nicel özellik gen analizlerinin (Paterson et. al., 1990; Pan et. al., 1994) temelini oluşturan farklı bitki türlerinin genom bağlantılı haritaların kurulmasını mümkün kılmıştır (Linc et. al., 1996). Örneğin arpada Blake (1990) ve Nilan (1990) tarafından RFLP' ye dayalı genomik bağlantı haritaları kurulmuştur. RFLP haritaları ilgili bitki türleri arasındaki karşılaştırmalı haritalarda yeni bir araç meydana getirmiştir (Van Deynze et. al., 1994) ve bu markırların genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanımında bir artış görülmektedir (Melchinger et. al., 1994; Sagai-Marroof et. al., 1994). Bununla beraber, RFLP analizlerini uygulamadaki teknik zorluklar ve belirleme metodunda kısa ömürlü radyoizotopların yaygın olarak kullanımı, rutin RFLP uygulamalarının geniş ölçekli ürün ıslahı programlarında uygun olup olmadığının tartışılmasına sebep olmuştur (Waugh and Powell, 1992).

Daha yakın zamanda, pek çok araştırma, radyoaktif olmayan belirlemeye olanak tanıyan DNA' nın amplifikasyonu avantajına sahip olmuştur (Smith and Chin, 1992). Bunlardan biri olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) belirli DNA parçalarının *in vitro* çoğaltılmasında uygulanan ve moleküler biyolojinin pek çok alanında kullanılan enzimatik bir metoddur (Erlich, 1989).

PCR amplifikasyonu; amplifiye olacak DNA parçasının yanında bulunan iki oligonükleotid primeri, tekrarlanan döngüler halinde DNA' nın denatürasyonunu, primerlerin tamamlayıcı bölgelere bağlanmasını ve bağlanan primerlerin DNA polimerazla uzamasını içerir. Primerler hedef dizinin karşı zincirine hibritlenirler ve bu primerlerin arasındaki bölgelerde polimeraz aracılığı ile DNA sentezinin olacağı şekilde yönlendirler, böylece DNA parça miktarı etkili bir şekilde iki katına çıkar. Daha da ötesi, uzayan ürünler de primerlere tamamlayıcı olduğundan ve bunlara bağlanma yeteneğinde olduğundan, her bir başarılı döngü sonucunda, bir önceki döngüde sentezlenen DNA miktarı iki katına çıkar. Bu; hedef parçanın 2^n miktarında artması sonucunu verir. Burada "n" döngü sayısıdır (Saiki et. al., 1988).

PCR tekniği; her biri genel olarak 20 nükleotid uzunluğundaki, bir hayli özgün oligonükleotid primer çiftleriyle başlatılır (Caetano-Anollés, 1991b). Bu primerlerin dikkatli bir şekilde seçilmesi pek çok polimorfizmin standart genetik markırlar olarak belirlenmesini ve haritalanmasını sağlayacaktır. Genellikle 0,1-0,5 μM arasındaki primer konsantrasyonları optimumdur. Daha yüksek primer konsantrasyonları yanlış bağlanmalara ve özgün olmayan ürünlerin oluşmasına sebep olabilir ve primer-dimer oluşumu şansını artırabilir. Özgün olmayan ürünler ve primer-dimer oluşumları da PCR için birer substrattır ve arzu edilen ürünle enzim, dNTP ve primer için rekabete girerler ve böylece arzu edilen ürün veriminin düşük olmasına sebep olurlar (Innis and Gelfand, 1990). Her primerin 3' uçlarındaki bazların hedef bölgeye çok iyi bir bağlanma sağlaması gereklidir, bu durumda primerin hedef bölge dışında bağlanmayan yaygın bölgeleri gözardı edilebilir (Sommer and Tautz, 1989). Bu da PCR' ı başlatmak için hedef bölgeye kısmi homoloji gösteren dizileri kullanabilme seçeneği verir. Bu ilke polimorfik PCR bantları üretmek için rastgele primerler kullanan Williams ve ark. (1990b) tarafından geliştirilmiştir (Weining and Langridge, 1991).

Seçilen bu primerlerin bağlanma ısısı, düşük ısılar “artefakt” bantların amplifikasyonuna ve etidyum bromid ile boyanmış agoroz jelde analiz sonucu “smear” yapıların oluşmasına sebep olduğundan, en önemli değişkendir (Hamill et. al., 1991). Bu yüzden primer bağlanması için gerekli olan ısı ve zaman uzunluğu baz kompozisyonuna, uzunluğu ve amplifikasyon primerlerinin kompozisyonuna bağlı olarak optimize edilir (Innis et. al., 1988). 55-72°C arasındaki bağlanma ısıları genellikle en iyi sonuçları verir. Tipik primer konsantrasyonlarında (0,2 μM) bağlanma sadece birkaç saniye sürer. Bağlanma ısısının artırılması yanlış bağlanan primerlerin ayrılmasını artırır ve primerin 3' ucuna yanlış nükleotidlerin bağlanmasını indirger (Innis and Gelfand, 1990).

PCR' da primerlerin kalıp DNA' ya bağlanmasını katalizleyen DNA polimeraz, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*' tan izole edilen ve 95°C' ye dayanıklı Taq DNA polimerazdır (Gelfand, 1989). Bu ısıya dayanıklı polimeraz, yöntemi büyük oranda kolaylaştırmış ve amplifikasyon reaksiyonunun daha yüksek sıcaklıklarda yapılmasına olanak tanıyarak, özgünlük, verim, duyarlılık

ve amplifiye olmuş ürünün uzun olmasını sağlamıştır (Saiki et. al., 1988). Taq DNA polimeraz (Perkin-Elmer Cetus) için önerilen konsantrasyon miktarı, diğer parametreler optimum olduğunda, 100 µl reaksiyon için 1-2,5 ünitidir. Bununla beraber farklı kalıp veya primere bağlı olarak, enzim gereksinimi çeşitlilik gösterebilir. Ancak eğer enzim konsantrasyonu çok yüksek olursa özgün olmayan ürünler oluşabilir, enzim konsantrasyonu çok düşük olduğunda ise istenilen ürün yeterli miktarda elde edilemez (Innis and Gelfand, 1990).

PCR, moleküler biyolojideki pek çok yöntem alternatif yaklaşımlar sağlamıştır ve pek çok standart tekniğin de yerini almıştır (Erlich, 1989). Özgün hedef dizilerin daha sonraki klonlamalar için amplifiye edilmesinde kullanılabilir ve özgün RNA ve DNA dizilerinin belirlenmesinde son derece hassas bir metod sağlar. Bu da ökaryotik genomlardaki basit dizilerin çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasında PCR' ın kullanımına öncülük etmiştir (Litt and Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber and May, 1989). İnsan β -globin geni PCR ile çoğaltılan ilk DNA dizilerinden biridir (Saiki et. al., 1985; Mullis et. al., 1986; Mullis and Faloona, 1987). PCR ayrıca bakteriyal kolonilerdeki veya bireysel faj plaklarındaki eklenen genlerin hızlı bir şekilde görüntülenmesinde veya dizisinin çıkarılmasında da yararlı olabilir (Innis and Gelfand, 1990). PCR' daki gelişmeler (Saiki et. al., 1988), hastalık direnç genlerinin belirlenme gücünü de arttırmıştır (Poulsen et. al., 1995). Buna örnek olarak arpa (Heun, 1992; Schuller et. al., 1992; Graner and Bauer, 1993; Jahoor et. al., 1993; Chen et. al., 1994), buğday (Hartl et. al., 1993), yulaf (Penner et. al., 1993b) ve çeltik (Yu et. al., 1991)' de dahil olmak üzere çeşitli tahıllarda, pek çok hastalığın direnç genlerine karşı PCR kullanılarak moleküler markırların belirlenmesi gösterilebilir (Poulsen et. al., 1995).

Yukarıdaki kullanım alanlarının yanı sıra, PCR' ın üstünlüklerinden biri, çeşitli konsantrasyonlarda DNA kullanarak ve basitçe amplifikasyon döngü sayısını arttırarak, agaroz/EtBr jellerde temiz bir şekilde görünür olan düzeylerde hedef dizinin amplifiye edilebilmesidir, ancak döngü sayısı çok fazla olursa "artefakt" bant amplifikasyonları oluşabilir (Innis and Gelfand, 1990). Ayrıca bir diğer üstünlüğü de, çoğaltılacak DNA örneklerinin nicel ve nitel özelliklerinin yüksek olmasının gerekmemesidir. Tek bir hücre veya sadece birkaç yüz baz çifti uzunluğundaki

örnekler genellikle başarılı bir amplifikasyon için yeterlidir (Saiki et. al., 1986; Kogan et. al., 1987; Higuchi et. al., 1988; Li et. al., 1988; Bugawan et. al., 1988).

PCR' ın gelişimi, DNA polimorfizmlerini belirli DNA parçalarının çoğaltılmasıyla belirleyen ve bu parçaları, polimorfizmleri göstermek amacıyla jel elektroforezinde ayıran metodlar sunmuştur (Thormann and Osborn, 1992). Günümüzde, çoğu parçaların belirlenmesinde PCR' ı kullanan, çeşitli DNA parmakizi teknikleri uygulanmaktadır (Jeffreys et. al., 1985; Nakamura et. al., 1987; Tautz, 1989; Weber and May, 1989; Williams et. al., 1990; Caetano-Anollés et. al., 1991; Welsh and McClelland, 1990). Aşağıda bu tekniklerden SSLP, CAPS, AFLP, DAF, AP-PCR ve RAPD' e değinilmektedir.

Basit dizi uzunluk polimorfizmi (SSLP=Single Sequence Length Polymorphism) adını alan PCR markırları mikrosatellit olarak bilinen, birbiri ardına tekrarlanan bir veya daha fazla nükleotidlerin çoğaltılmasına dayanmaktadır (Preuss, 1996). Mikrosatellitler bir çok ökaryotik genomda sık sık ve rastgele bulunan ve tekrarlanan birimlerin sayısındaki çeşitliliğe göre yüksek derecede polimorfizm gösterirler (Cornall et. al., 1991; Hearne et. al., 1992; Weber and May, 1989). Yapılan çalışmalar rastgele seçilen mikrosatellitlerin haritalanan herhangi bir popülasyon hakkında bilgi verebildiğini göstermektedir (Preuss, 1996).

Bir diğer PCR markırı olan kesilmiş çoğaltılmış polimorfik diziler (CAPS=Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) DNA parçalarını çoğaltmak için primerleri kullanır. Çoğaltılan bu parçalar daha sonra RFLP' leri ortaya koymak amacı ile restriksiyon endonükleazları ile kesilir (Tragoonrung et. al., 1992; Weining and Langridge, 1991; Williams et. al., 1991). Ancak polimorfizmleri ortaya koyabilmek için farklı restriksiyon enzimlerine gerek duyulması, bunlar pahalı olduğundan, yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (Preuss, 1996).

Rastgele primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon parça uzunluk polimorfizmi (AFLP=Amplification Fragment Length Polymorphism) analizleri, genetik dizinin belirlenmesi veya haritalanmasında alternatif bir araç olarak

kullanılmıştır (Williams et. al., 1990b; Welsh and McClelland, 1990; Caetano-Anollés et. al., 1991a). Bu yöntem genomun rastgele fakat belirli miktarlarının amplifikasyonlarını başlatmak için rastgele üretilmiş primerleri kullanır (Caetano-Anollés et. al., 1992).

Bu primerler üç bölümden oluşur; çekirdek dizi, enzime özgün dizi (ENZ) ve seçici kuyruk (EXT) (Zabeau and Vos, 1993). Bu bölgeler aşağıda üç seçici nükleotide sahip (NNN) olan EcoRI ve MseI primerleri için gösterilmiştir (Vos et. al., 1995).

	<u>Çekirdek</u>	<u>ENZ</u>	<u>EXT</u>
EcoRI	5'- GACTGCGTACC	AATTC	NNN -3'
MseI	5'- GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN -3'

Tamamı kesilmiş genomik DNA' nın restriksiyon parçalarının seçici PCR amplifikasyonuna dayanan bu teknik üç basamak gerektirir:

- i) DNA' nın restriksiyonu ve oligonükleotid adaptörlerin bağlanması,
- ii) Restriksiyon parça setlerinin seçici amplifikasyonu ve
- iii) Amplifiye olmuş parçaların jel analizi (Vos et. al., 1995).

AFLP genomik restriksiyon parçalarını belirleyen DNA parmakizi tekniğidir ve RFLP' den restriksiyon parçalarının belirlenmesinde "Southern" hibridizasyon (Southern, 1975) yerine PCR amplifikasyonunun kullanılması sebebiyle farklıdır. Yine de RFLP tekniğine yakınlığından dolayı AFLP adını almıştır, bununla beraber AFLP adı akronim olarak kullanılmamalıdır. Çünkü AFLP tekniği, restriksiyon parçalarındaki uzunluk farklarını değil bu parçaların varlığını veya yokluğunu gösterir (Vos et. al., 1995).

Organizmalar arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde bir diğer yöntem olan DNA amplifikasyon parmakizi (DAF=DNA Amplification Fingerprinting), genomik DNA' nın kısa parçalarını amplifiye etmek ve çeşitli DNA ürünleri üretmek için rastgele nükleotid dizisine sahip ve genellikle kısa bir primer (≥ 5 baz çifti) tarafından yönlendirilen ısıya dayanıklı DNA polimerazı kullanır. Elde

edilen ürünler poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyama yöntemi ile analiz edilir (Caetano-Anollés et. al., 1991). Bu yaklaşım, klonlamaya veya dizi bilgisine bağlı değildir ve virus, bakteri, mantar, bitki ve hayvan orijinli DNA' lardan parmakizi üretebilir (Caetano-Anollés et. al., 1991b).

DAF parmakizleri iki gruba ayrılan bantlar içerir; filogenetik olarak korunanlar ve bireye özgün olanlar. Bu; primer bölgelerinin hedef genom boyunca rastgele dağıldığı ve hem korunmuş hem de büyük çeşitlilik gösteren bölgelerin yanında olduğu fikrini verir. Ayrıca tekrarlanan deneyler arasında farklı parçalar arasındaki amplifikasyon derecesinde yaygın bir çeşitlilik vardır. Bu çeşitlilik amplifiye olmuş bölgelerin çoklu kopyalarının sonucunda olabilir, amplifiye olmuş belirli bölgelerin verimliliğini gösterebilir veya primerin hatalı bağlanması bir sonucu olabilir (Caetano-Anollés et. al., 1991b).

DNA analizinde yaygın uygulama alanlarının olacağı umulan DAF; bireylerin belirlenmesi çalışmalarında (Beckmann and Soller, 1986; Caetano-Anollés et. al., 1991b), aile ilişkileri ve bağlantı haritalarında, güçlü bir araç olarak insan genomunun analizinde, doğum öncesi teşhislerde, hastalık genlerinin yerleşimlerinde, genetik çeşitlilikte, moleküler arkeolojide, adli belirlemelerde ve epidemiyolojide (Dweikat et. al., 1993, Graner et. al., 1991; Graner et. al., 1994) kullanılmaktadır (Caetano-Anollés et. al., 1991b).

DAF' a benzer şekilde (Caetano-Anollés et. al., 1991b), rastgele genomik DNA parçalarının rastgele seçilmiş PCR primerleriyle çoğaltılmasına dayanan bir diğer yöntem; rastgele primerle başlatılmış PCR' dır (AP-PCR=Arbitrary Primed PCR) (Welsh and McClelland, 1990; Welsh et. al, 1991; Vos et. al., 1995).

AP-PCR metodu ilke olarak, çeşitli primerlerin kullanılmasıyla çok sayıdaki çeşitli organizmada polimorfizmlerin belirlenmesinde uygulanabilir. Tür düzeyindeki belirlemelerde AP-PCR herhangi bir belirli primer dizisini gerektirmez. Bunun yerine parmakizi çıkarılacak genomun dizisine bağlı olmadan seçilen primerleri kullanır. Dolayısıyla AP-PCR araştırılan organizmanın moleküler biyolojisine ait ön

bir bilgi gerektirmez. Araştırmacılar standart primer setlerini seçmeyi tercih edebilirler, bu durumda elde edilen sonuçlar laboratuvarlar arasında da karşılaştırılabilir. Halen kullanılmakta olan primerlerin seçimi mantıklı olacaktır (Welsh and McClelland, 1990). Ancak yine de her bir oligonükleotid primer, amplifikasyon şartlarına, kalıpla orantılı primer konsantrasyonuna ve magnezyum konsantrasyonuna göre optimizasyon gerektirebilir (Ellsworth et. al., 1993).

Her primer AP-PCR ürünlerinde, her biri kalıtımlar arası polimorfizmleri belirleme yeteneğine sahip olan farklı bantlar verir. Böylece elde edilen sonuçlar aynı türdeki birbiriyle yakından ilişkili kalıtımların bile ayırt edilmesine olanak tanır. Bu bir anlamda izozim çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir. (Selander et. al., 1987).

İlke olarak, bant modellerinin üretilmesinde tek bir primer yeterlidir (Vos et. al., 1995). Ancak Welsh ve McClelland (1991) tarafından fare genomik DNA' sında yapılan deneyler rastgele seçilmiş oligonükleotid primerlerin sadece tek başlarına değil, çiftli kombinasyonlar halinde de kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu deneyde iki oligonun primer olarak kullanıldığı AP-PCR' da üretilen ürünlerin ortalama uzunluğu, her durumda, tek bir oligonun kullanılmasıyla üretilenlerden kısaydı. İki primerin birlikte kullanıldığı AP-PCR parmakizlerindeki daha küçük ürünler, uzama sırasında, tek bir primer tarafından üretilen daha uzun ürünlere karşı daha etkili bir şekilde yarışmaktaydı. Böylece iki oligoyu da içeren ürünler final modelde daha baskındılar (Welsh and McClelland, 1991).

Alternatif olarak tek bir primeri kullanan PCR ürünleri renatürasyon sırasında saç tokası yapıları oluşturabilir, bu da saç tokası yapısı üretemeyen, iki primeri kullanan PCR ürünlerine nazaran daha kullanışsız olmalarına sebep olur (Welsh and McClelland, 1991).

Sebepler ne olursa olsun, çiftli kombinasyonlar, tek bir primer tarafından üretilen modellerden %50' den daha fazla farklı model verdiği için, çiftli oligoların

kullanıldığı iki DNA arasında belirlenen polimorfizmlerin %50' den fazlası tek bir oligonükleotid ile belirlenenlerden farklı olmalıdır (Welsh and McClelland, 1991).

Oligonükleotid setleri çok fazla sayıda çiftli kombinasyonlar halinde kullanılabileceğinden, birbiriyle %50' den daha az benzerliğe sahip, çok fazla sayıda farklı model üretilebilir. Örneğin 50 oligo tek tek veya çiftler halinde 2500 kombinasyonda kullanılabilir. Ortalama olarak her bir oligo, iki veya daha fazlası o oligonükleotid çiftine özgün olan, 4 veya daha fazla polimorfizm açığa çıkarmalıdır (Welsh and McClelland, 1991).

Oligonükleotid çiftlerinin kombinasyonlar halinde kullanılması prensibi herhangi bir organizmanın parmakizine uygulanabilir. Tabii ki organizmanın genomunu haritalamak için gerekli olan oligonükleotid sayısı; genom büyüklüğü, rekombinasyon düzeyi ve arzu edilen doğruluğa göre belirlenmelidir (Welsh and McClelland, 1991).

AP-PCR, RFLP analizlerindeki “Southern” işaretlemenin hazırlanmasında gereken, kuyu başına düşen genomik DNA' nın 1/100' ünden daha azını gerektirir, bu da F₂ çaprazlamaların ve geri çaprazlamaların haritalanmasında önemlidir (Welsh and McClelland, 1991).

AP-PCR parmakizi, genetik haritalama için geliştirilmiş diğer metodlara göre, pek çok açıdan daha kolay ve daha hızlıdır. Haritalama programına, RFLP problemlerinin belirlenmesine gerek duymadan başlanabilir. Klonların yapılması veya plazmidlerin saflaştırılması gerekmez. Hemen hemen seçilen her primerle polimorfizmler üretilebilir (Welsh and McClelland 1991). Üretilen polimorfik AP-PCR bantları prob olarak kullanılabildiğinden genetik ve fiziksel haritalar arasındaki bağlantı da böylece gösterilebilir (Welsh and McClelland, 1990).

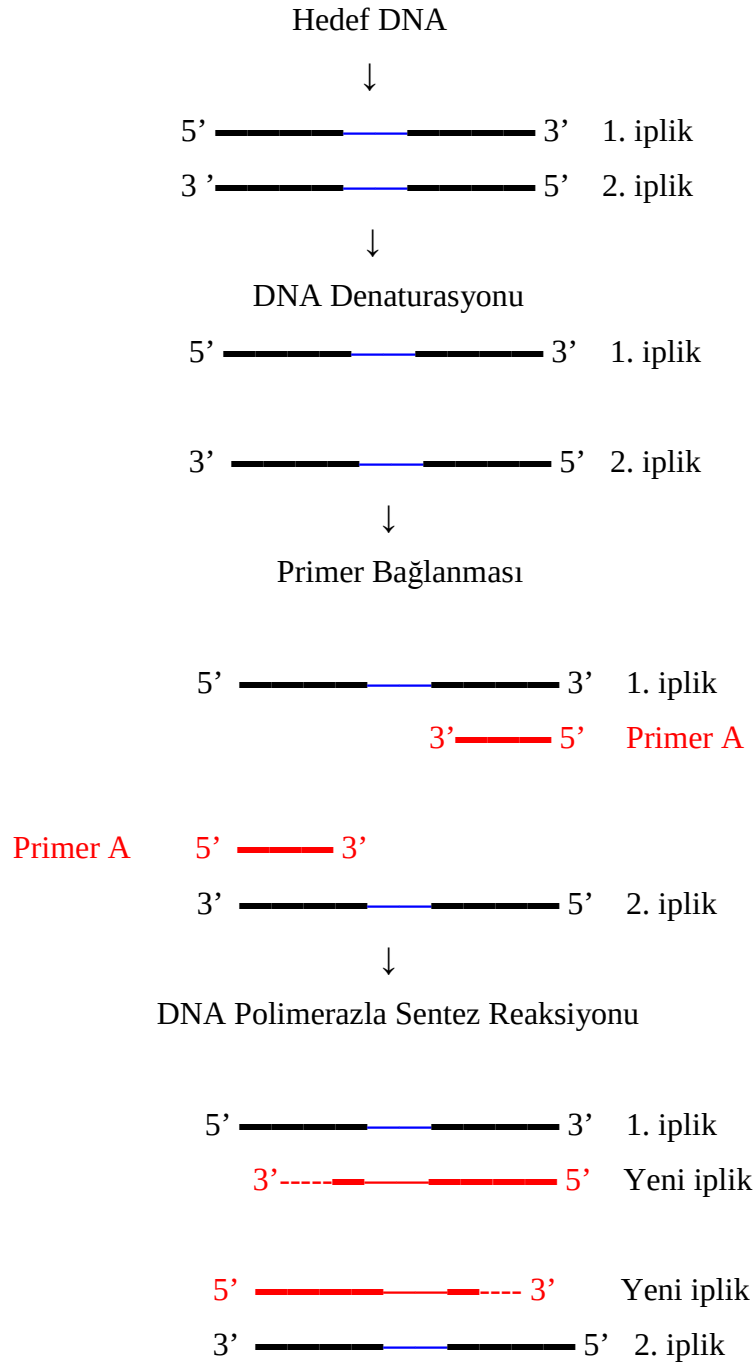
AP-PCR' daki aşamaların çoğu otomatiktir. Metod, EtBr işaretlemesini, floresan işaretlemeyi veya “Southern” hibridizasyonundaki gibi az miktardaki işaretli bazları kullanabilir. Daha da önemlisi AP-PCR ile üretilen DNA polimorfizmleri

jelden direkt olarak izole edilebilir ve restriksiyon haritalama stratejilerinde prob olarak kullanılmak üzere yeniden amplifiye edilebilir. AP-PCR, genom içindeki çok fazla sayıdaki DNA markırlarının genetik haritalarının kurulmasında da kullanılabilir (Welsh et. al., 1991).

AP-PCR' a benzer bir diğer yöntem aynı yıl Williams ve ark. (1990b) tarafından tarif edilmiş ve yönteme RAPD adı verilmiştir. Gerçekten de RAPD; AP-PCR metodunda daha uzun primerlerin kullanılması, PCR ürünlerinin radyoaktif olarak işaretlenmesi ve poliakrilamid jelde çözünmesi dışında, AP-PCR' a eşdeğerdir (Fritsch and Reiseberg, 1996).

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) gerçekte PCR' a dayalı moleküler markır sistemidir (Williams et. al., 1990b; Welsh and McClelland, 1990). RAPD yönteminin uygulanması için rastgele nükleotid dizisine sahip olan tek bir oligonükleotid, ısıya dayanıklı DNA polimeraz ve uygun bir tampon varlığında, genomik DNA ile karıştırılır ve polimeraz zincir reaksiyonuna özgü sıcaklık döngüsü şartlarına bırakılır (Şekil 2.1). Reaksiyonun ürünleri oligonükleotidin uzunluğuna, dizisine ve reaksiyon şartlarına bağlıdır (Williams et. al., 1990a).

Genel olarak 10 bazlık rastgele primerleri içeren RAPD analizlerinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) programı 94°C' de 1 dakikalık kalıp DNA 'nın denatürasyon basamağını, 36°C' de 1 dakikalık primerin bağlanma basamağını ve 72°C' de 2 dakikalık primerin uzatma basamağını içerir (Williams et. al., 1990b). Genellikle RAPD ürününün elde edilmesi için bu üç basamağı içeren 45 döngü yürütülür. Ancak her basamağın süresinin, farklı uzunluktaki rastgele seçilmiş primerler için ve/veya farklı türlerden elde edilen kalıp DNA için yeniden optimize edilmesi gerekebilir (Yu and Pauls, 1992).



Şekil 2.1. RAPD yönteminin şematik anlatımı

Termal döngüdeki uygun bağlanma ısısında, tek bir primer, birbirine uzaklıkları amplifikasyona uygun olan (örneğin birkaç bin nükleotid uzaklıktaki) genomik DNA' nın karşılıklı zincirlerindeki bağlanma bölgelerine bağlanır ve bağımsız DNA parçaları sentezlenir. Bu özgün ürünün varlığı veya yokluğu, rastgele seçilmiş primerlerle amplifiye edilmiş olmasına rağmen, genomik DNA' daki

oligonükleotid bağlanma bölgelerinin teşhis edilmesini sağlar (Williams et. al.,1990a).

Pratikte, aynı şartlar altında her primer için birçok amplifiye olmuş bant veren DNA amplifikasyon reaksiyonları pek çok farklı primer kullanılarak DNA örnek setlerinde tekrarlanır. Polimorfik bantlar, örneğin çaprazlanan ebeveynler arasındaki polimorfik bantlar, belirlenir ve polimorfizmler ayrılan populasyonlarda haritalanabilir (Williams et. al., 1990a).

Çoğu zaman tek bir primer, her biri farklı bir lokusu haritalayan pek çok polimorfizmin belirlenmesinde kullanılabilir (Williams et. al., 1990a) ve sadece primerin değiştirilmesiyle, başka hiçbirşeyin değiştirilmesine gerek kalmadan çok sayıda RAPD markırı elde edilebilir (Mori et. al.,1993).

RAPD’ de kullanılan 10 nükleotidlik primerler %50-70 arasında G-C içeriğine sahiptirler, eğer pallindromları içeriyorlarsa bu pallindromik diziler 6 bazdan uzun değildir ve 3’ ucunun tamamlayıcısı olamaz. Bu özelliklere sahip olan primerin etidyum bromid işaretlemesi sonucunda en verimli sonucu verdiği görülür (Williams et. al., 1993).

Bu yöntemin en önemli üstünlüğü; DNA dizi bilgisine ihtiyaç duyulmamasıdır. Ayrıca yöntem; hızlı ve kolay bir şekilde uygulanabilir ve radyoaktivite yerine floresansı kullanır (Williams et. al., 1990b). RAPD tekniği amplifikasyona dayalı olduğundan sadece nanogramla ölçülebilen DNA miktarı yeterlidir ve yöntemin otomasyonu mümkündür (Tingey et. al., 1993). Yorucu klonlama işlemleri, nükleotid dizi analizi veya “Southern blot” hibridizasyonu gerekli olmadığından, teknik; polimorfizmlerin ve genetik markırların çeşitli bitki ve hayvanlarda hızlı ve düşük maliyetle belirlenmesini sağlar (Ellsworth et. al., 1993). RAPD’ ler genomik bölgelerde, tekrarlanan DNA dizilerinin varlığından dolayı RFLP analizlerinde elde edilemeyen, DNA markırları sağlarlar ve elde edilen bu RAPD bantları jelden geri alınabilir ve hibridizasyon probu olmak üzere yeniden amplifiye edilebilir (Williams et. al., 1990a).

Bununla beraber, RAPD markırlarının bazı olumsuzlukları da belirtilmiştir. Hemen hemen bütün RAPD markırları, tek bir bireye ait aynı uzunluktaki DNA parçaları amplifiye olduğundan, dominanttır. Dominant RAPD markırlarla DNA parçasının heterozigot lokustan mı (bir kopya) homozigot lokustan mı (iki kopya) amplifiye olduğuna karar vermek mümkün değildir. Aynı lokustan amplifiye olan farklı uzunluktaki DNA parçaları olarak belirtilen kodominant RAPD markırları nadiren belirlenir (Williams et. al., 1990b).

Buna ek olarak bazı çalışmalar RAPD' in çok zor tekrarlanabildiğini belirtmiştir (Weeden et. al., 1992; Penner et. al., 1993a; Skroch and Nienhuis, 1995). Moleküler düzeyde, homolog dizilerin heterodubleks oluşumu (Ayliffe et. al., 1994; Novy and Vorsa, 1996) hatanın muhtemel kaynağıdır (Hansen et. al., 1998).

Bununla beraber, RAPD yönteminde ortaya çıkan en önemli hata amplifikasyon için farklı DNA parçaları arasındaki yarıştı (Williams et. al., 1993; Halldén et. al., 1996). Bir genotipte başarıyla amplifiye edilen bir RAPD bantının bir diğerinde belirlenememesi, yanlış genotip yorumu ile sonuçlanır. Polimorfik bantlar için bu yarıştan kaynaklanan hata frekansı, hem yüksek hem de düşük karmaşıklıkta genomlarda, yaklaşık olarak %15 oranında bulunmuştur (Halldén et. al., 1996).

Kodominant markırlara nazaran dominant markırlarla daha az bilgi elde edilir. Ancak daha az bilgi vermelerine rağmen, dominant markırlar hala F_2 , geri-çaprazlama ve rekombinant aile içi popülasyonlarda bağlantı haritalarının oluşturulmasında kullanılır (Williams et. al., 1990a). Ayrıca bağlantılı RAPD markırlarına dayanan seleksiyon, heterozigotluk düzeyi minimal olduğunda, ileri-generasyon rekombinant tür içi hatlarda kullanıldığında RFLP markırları kadar verimlidir (Kelly, 1995).

RAPD primerleriyle yapılan amplifikasyonlar primer bağlanma bölgesindeki tek nükleotidlik değişikliklere inanılmaz derecede hassastır. Bu özellik RAPD' lerin

yakın ilişkili bireyler arasındaki filogenetik analizlerde çok kullanışlı olacağını göstermektedir (Williams et. al., 1990a).

Bu teknik aynı zamanda tıbbi olarak değeri olan bitkilerin coğrafik çeşitliliklerinin belirlenmesinde (Mizukami et. al., 1993a,b; Nakai et. al., 1996) ve tıbbi değeri olan bitki türleriyle onların ikincil metabolitleri arasındaki genetik ilişkilerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Yamazaki et. al., 1994) ve halen bakteri, mantar ve bitkilerde genetik varyasyonların analizi (Wang et. al., 1993; Bidochka et. al., 1994; Mailer et. al., 1994) , bazı bitki türlerinin ilk bağlantı haritalarının kurulması (Lodhi et. al., 1995; Yang and Quiros, 1995) gibi genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hansen et. al., 1998).

RAPD sistemi ayrıca “bulk” ayrılma analizinde (BSA=Bulk Segregation Analysis), bağımsız genomik bölgelerin haritalanması ve çoğu bitki türünde çeşitli özelliklere markırların bağlanması için kullanılmıştır (Michelmore et. al., 1991; Halldén et. al., 1997; Warburton et. al., 1996). Bağlanan markırlar, yetiştirme programlarında markırlar aracılığıyla seleksiyonda (Hansen et. al., 1997) veya haritaya dayalı klonlama için genomik kütüphanelerin gösterilmesinde (Tanksley et. al., 1995) kullanılır.

Yöntemin kolay ve hızlı olması ve küçük laboratuvarlarda bile kullanılabilmesi onu biyologlar arasında kabul edilebilir kılmıştır (Williams et. al., 1990a).

Yukarıda özelliklerinden bahsedilen moleküler markır tekniklerinin arpa bitkisindeki kullanımına ait örneklerinden bazıları şunlardır:

Saghai-Maroo ve ark. tarafından 1984 yılında yapılan deneylerde RFLP tekniği kullanılarak ribozomal RNA gen kümelerindeki (rDNA) ara uzunluk (spacer-length (sl)) çeşitlilikleri, 50 tane işlenmiş arpa, 25 tane yabani tip arpa ve arpanın deneysel popülasyonu olan müşterek çaprazlamaların (CC2) 5 generasyonunun dahil olduğu 502 arpa bitkisinde araştırılmış ve 15 tane farklı rDNA

sl çeşitlerinden toplam 17 sl fenotipi belirlenmiştir. F₂ populasyonundaki 4 tane rDNA sl çeşidiyle yapılan çalışmalar, bu varyantların birbirine bağlı olmayan ve her biri 2 kodominant allel içeren *RrnI* ve *RrnII* adlı lokuslarda konumlandıklarını göstermiştir. Daha sonra buğday-arpa ek kuyusunu kullanarak bu *RrnI* ve *RrnII*'nin kromozom 6 ve 7 üzerinde konumlandığı belirlenmiştir.

1991 yılındaki bir çalışmada (Hinze et. al., 1991) yine RFLP tekniği kullanılmış ve farklı ml-o mutantı olan 7 geri çaprazlamadan 8 ml-o geri çaprazlama hattı (BC hattı) analiz edilmiştir (arpadaki ml-o lokusu *Erysiphe graminis f. sp. hordei* mantarının bilinen tüm türlerine karşı direnç sağlar). ml-o BC hattında belirlenen RFLP markırları arasındaki sıkı bağlantı, *Hordeum vulgare subsp. spontaneum* x *Hordeum vulgare subsp. vulgare* cv. *aramir*' in F₂ populasyonlarında tayin edilmiştir. Daha sonra da *Hordeum vulgare* cv. *Carlsberg II* ml-o x *Hordeum vulgare* cv. *G. Zweiz* ml-o II arasındaki çaprazlamalardan üretilen F₂ populasyonundaki homozigot ml-o bitkisinin analizi yoluyla ML-o ile ilgili markırların arasındaki uzaklıklar ölçülmüştür.

1985 yılında polimeraz zincir reaksiyonunun gelişiminin ardından 1991 yılında Dehmer ve ark., yaptıkları bir çalışmada PCR' ın belirli DNA dizisinin gösterilmesindeki kullanımını açıklamışlardır. Bu amaçla tüm PCR deneylerinde kışlık arpa çeşidi "İgri"den elde edilen DNA kullanılmıştır. PCR' da kalıp olarak kullanılan gen "*B-hordenis*" adını alan ve arpadaki başlıca saklama proteinini kodlayan *13 Hor II* geninden birisidir (Kreis et. al., 1983). Elde edilen DNA' larla yapılan deneylerde, EtBr boyaması sonucunda 304 baz çiftlik bantın her reaksiyon karışımında bulunduğu görülmüştür. Bu DNA parçasının kalıp görevi yapan *B1-hordein* geni ile olan ilişkileri Hor-II probunun hibridizasyonu ile gösterilmiş ve bu da daha önceki jeldekiyle tamamen aynı bant modeli ile sonuçlanmıştır.

Aynı yıl Weining ve Langridge (1991) tarafından yapılan çalışmada ise PCR' ın tahıllardaki polimorfizmleri ortaya çıkarma ve haritalamadaki kullanımı açıklanmıştır. Bunun için iki primer seti test edilmiştir: bilinen özgün dizileri hedefleyenler ve intron-ekson bağlanma bölgelerini hedefleyenler. İki primer tipi de RFLP markırlarına göre daha hızlı ve daha kolay elde edilen, çok değerli çeşitlilik

kaynakları sunmuşlardır. Ayrıca, rastgele veya özgün primerler ile birlikte kullanılan, intronları hedefleyen primerler, eksonları hedefleyen primerlere göre daha karmaşık ve farklı bant modelleri vermiştir.

Yurdumuzda da RAPD yöntemi kullanılarak moleküler düzeyde genom analizi ve tanımlanmasına ilişkin ilk DNA parmakizi çalışmaları aynı yıl *Hordeum*' da gerçekleştirilmiştir (Gürel, 1993).

1993 yılında Gürel ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada yabani arpa hatları arasındaki farklılıklar RAPD tekniği ile moleküler düzeyde karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. PCR' da 20 nükleotid uzunluğundaki, rastgele seçilmiş 2 primer kullanılmış ve ilk primerle yapılan amplifikasyon sonucunda pek çok monomorfik bant elde edilmiştir. İkinci primerle yapılan amplifikasyon sonucunda ise monomorfik ve polimorfik bantlar gözlenmiştir. Bu bantların içinde 10 RAPD markırı belirlenmiş ve hatlar arasındaki polimorfizm değerleri tayin edilmiştir.

Bir yıl sonra, 1994 yılında Çobanoğlu ve ark. tarafından yapılan çalışmada yurdumuz orijinli *Hordeum marinum*, *Hordeum bulbosum* ve *Hordeum vulgare spontaneum* türlerine ait 23 yabani arpa hattı arasındaki çeşitlilik RAPD markırları kullanılarak moleküler düzeyde araştırılmış, materyalin DNA parmakizi tanısı yapılmış ve polimorfizm oranı hesaplanmıştır. Çalışmalar sırasında 20 nükleotid uzunluğunda bir primer (TUB 38) ile 10 nükleotid uzunluğundaki bir primer (OPA 01) kullanılmıştır ve kullanılan her iki primer de polimorfik bantlar oluşturmuştur.

1994 yılında yapılan bir diğer çalışmada Arı ve ark., kültür arpaları Kaya, Quantum, Tokak, Yerçil ve Cumhuriyet' in yabani arpalarla yapılan melezlerinin F₁ generasyonlarının tanımlanmasını amaçlamışlardır. Bunun için öncelikle ebeveyn varyetelerinin RAPD yöntemi ile DNA parmakizleri çıkarılmış ve daha sonra melezlerde bu parmakizlerinin durumu incelenerek melezlerin doğruluk tanısı yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, daha fazla primer kullanılarak daha çok sayıda farklılığın ortaya konabileceğini göstermektedir.

1995 yılında Gözükırmızı ve ark. tarafından, model bitki olarak kullanılan kışlık 6-sıralı *Hordeum vulgare* cv. *Zafer 160* bitkisi için kullanılan doku kültürü sistemlerinde kromozom varyasyonları incelenmiş ve gen mutasyonlarının RAPD yöntemi ile araştırılabileceği gösterilmiştir. Bu amaçla, ilk uygulamada doku kültüründe rejenere olan bitkilerdeki somaklonal varyasyon RAPD yöntemi ile gen düzeyinde belirlenmiştir. RAPD markırları ile yapılan bir diğer uygulamada 10 nükleotidlik primerler kullanılarak arpa melezlerinin tanısı yapılmış, *Hordeum vulgare* L.'nin Kaya, Quantum, Tokak, Yerçil ve Cumhuriyet varyeteleri ile çaprazlanan yabani hattının F₁ dölü RAPD parmakizleri incelenerek gerçek melezler belirlenmiştir.

1995 yılında yapılan bir diğer çalışmada (Albayrak-Çobanoğlu et. al., 1995) farklı ökaryotik model organizmaların (*Schizosaccharomyces pombe*, *Hordeum vulgare*, *Cicer arietinum*) RAPD yöntemi kullanılarak DNA parmakizlerinin çıkarılması amaçlanmıştır. Çalışmada 10 nükleotid uzunluğunda 2 primer kullanılmış (OPB 02, OPC 09) ve elektroforez analizi sonucunda OPC 09 primeri ile, bu organizmalar arasındaki farklılıkları ortaya koyan bantlar elde edilmiştir.

Aynı yıl Poulsen ve ark. (1995) çalışmalarında ek arpa Q211861 ve Avusturya arpa çeşidi "Galleon" arasındaki çaprazlamalardan elde edilen F₂ popülasyonunu (*Puccinia hordei*), arpa yaprak direncine karşı RAPD markırlarının oluşturulmasında kullanmışlardır. Hassas ve dirençli DNA' lar, F₂ bitkilerinin yaprak pası enfeksiyon tipine göre sınıflandırılmasını takiben kurulmuş, daha sonra da "bulk" ayrılma analizleri 2,7 kb' lık markırın belirlenmesinde kullanılmıştır.

Atanassov ve ark.'nın ise 1995 yılında yaptıkları çalışmalarda protein, RFLP' ler ve RAPD' ler gibi genetik markırları, 2,4 D- γ ışınlarının ve sodyum azidin mutagenik etkilerinin ve bunların kombinasyonlarının Bulgar arpa bitkilerinin doku kültüründe üretilen genetik çeşitliliğin kalitesine ve miktarına etkilerinin çalışılması amacıyla kullanmışlar ve arpanın tam bir apikal meristemle yaprak tabanını içeren nakledilen fide dokularından rejenerasyonu için güvenilir bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışma, Bulgar arpa bitkilerinin somaklonal varyantların karakterizasyonunun 10 nükleotidlik primerler kullanılarak ilk kez belirlenmesidir.

1996 yılında Linc ve ark. tarafından yapılan deneylerde, genetik çeşitliliğin değerlendirilmesinde ve farklı arpa gruplarının ayrılmasında (*Hordeum vulgare* L.) RFLP problemlerinin ve RAPD primerlerinin etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmış ve bunun için de büyüme şekli ve baş yapılarına dayanan farklı grupları temsil eden 5 arpa çeşidi seçilmiştir. Bu çeşitlerin birbirine paralel bir şekilde 5 enzim kombinasyonu içinde 12 RFLP probu ve 19 RAPD primeri ile test edilmesi sonucunda RAPD primerleri ile elde edilen DNA ürün miktarı ve polimorfik bant frekansının RFLP problemleri ile elde edilenden daha yüksek olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, tek bir RFLP probunun kullanılması sonucu tahmin edilen genetik çeşitlilikte, tek bir RAPD primerinin kullanılması sonucu tahmin edilen genetik çeşitliliğe nazaran çok daha düşük bir çeşitlilik olduğundan, RFLP' nin daha aydınlatıcı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, varyeteler arasındaki birbirine yakın bireylerin güvenilir bir şekilde gruplanmasında RFLP problemlerinin daha etkili olduğu, RAPD primerlerinin ise bireysel varyetelerin ve yetiştirilen materyalin karakterinin belirlenmesinde RFLP problemlerine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan bitki materyali olan arpa (*Hordeum vulgare L. cvs*) bitkisine ait ebeveynlerin (Tokak; dirençli ana, 5819; hassas baba) ve F₁ bireylerinin tohumları Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden alındı, daha sonra F₁ bireylerinin kendileşmesi sonucunda 80 tane F₂ bireyi elde edildi. Sera koşullarında yetiştirilen bu 80 tane F₂ bireyinin kuraklığa dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla Altunkut ve ark. (1998) tarafından yaprak alanı, paraquat (PQ) uygulanan bitkilerde klorofil kaybının tespiti, nispi yaprak su kapsamı ve total protein miktarının belirlenmesi gibi çeşitli morfolojik ve fizyolojik testler uygulandı. Uygulanan bu testlerin sonucunda da F₂ generasyonunda en hassas ve dirençli tipler belirlendi ve bunların arasından 7 tane kuraklığa hassas ve 7 tane kuraklığa dirençli bitki bu çalışmada kullanılmak üzere seçildi (Çizelge 3.1). Seçilen bu bitkilerin her biri saksılarda yetiştirildi ve daha sonra DNA izolasyonu yapmak amacıyla genç yapraklar kesilip, 1-2 gr'lık gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-70° C' de) saklandı.

Çizelge 3.1: Çalışmada kullanılan bitki materyali

Bitki Materyali	Kuraklığa Dirençlilik-Hassaslık
5819 (baba)	Hassas
Tokak (ana)	Dirençli
F ₁ -51	
F ₂ 50-18	Hassas
F ₂ 50-19	Hassas
F ₂ 50-21	Hassas
F ₂ 50-27	Hassas
F ₂ 50-31	Hassas
F ₂ 50-40	Hassas
F ₂ 50-42	Dirençli
F ₂ 50-45	Dirençli
F ₂ 50-54	Dirençli
F ₂ 50-56	Dirençli
F ₂ 50-65	Hassas
F ₂ 50-72	Dirençli
F ₂ 50-73	Dirençli
F ₂ 50-76	Dirençli

3.2. Metod

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Derin dondurucuda saklanan yapraklardan genomik DNA izolasyonu ilk önce Spiers ve ark. (1981) tarafından önerilen yöntemle göre yapıldı. Ancak bu yöntemle yeterli miktarda DNA elde edilemediğinden, daha sonra DNA izolasyonunda Lodhi ve ark. (1994) tarafından önerilen yöntemler kullanıldı. Bu yöntem şu şekilde uygulanır:

1. Büyüklüğünü almamış genç yapraklar hemen kullanılacaksa buz veya sıvı nitrojenle muamele edilir. Eğer hemen kullanılmayacaksa, kullanılana kadar -70°C altındaki sıcaklıklarda saklanır. 0,5 gr yaprak sıvı azot ile havanda ezilir ancak yaprak hücrelerinin ezilmeye başlamadan önce donu çözölmüş olmalıdır.
2. Yapraklar iyice ezildikten sonra 5 ml ekstraksiyon tamponu (Çizelge 3.2) eklenerek karıştırılır.
3. Çözelti 15 ml' lik polipropilen santrifüj tüpüne (Eppendorf 5415 C) konur, havana 1 ml daha çözelti konularak yıkanır ve bu da çözeltiye eklenir.
4. 50 mg PVP (Sigma P6755) eklenir ve tüp ters çevrilerek yaprak çözeltisiyle birkaç kez karıştırılır (100mg PVP/gr yaprak).
5. Çözelti 60°C' de 25 dakika bekletilir ve oda sıcaklığında soğutulur.
6. 6 ml kloroform:oktanol (Çizelge 3.2) eklenir ve karışımın oluşması için tüpler 20-25 defa hızla çalkalanır.
7. Oda sıcaklığında masa üstü santrifüjde 6000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilir.
8. Üsteki sıvı faz 15 ml' lik yeni bir santrifüj tüpüne geniş uçlu pipet ucu ile transfer edilir. Eğer PVP' nin varlığından dolayı sıvı faz bulutumsu bir renkte ise ikinci bir kloroform:oktanol ekstraksiyonu gerçekleştirilebilir.
9. Önceki adımda elde edilen çözeltiye 0,5 hacim 5M NaCl (Çizelge 3.2) ilave edilir ve iyice karıştırılır.
10. 1 hacim %95' lik etanol (-20°C) eklenir ve buzdolabında (4-6°C' de) 15-20 dakika bekletilir. Bekletmenin sınırını DNA iplikçiklerinin belirmesi belirler.

Buna göre çözelti 1 saat, hatta gerekli ise daha uzun zaman (gece boyu) bekletilebilir.

11. Çözelti daha sonra oda sıcaklığında 3000 rpm' de 3 dakika, sonra da 5000 rpm' de 3 dakika santrifüj edilir. Bu değişik rpm' deki santrifüjleme DNA'nın santrifüj tüpü dibinde yığılmasını sağlar.
12. Sonra süpernatant dökülür ve pellet soğuk (0, +4°C) %76' lık etanol ile yıkanır. Tüpler 37°C' de 20-30 dakika ters çevrilerek pellet DNA kurutulmadan etanolün uzaklaştırılması sağlanır.
13. Elde edilen DNA 200-300 µl TE' de çözünür.
14. Karışımdaki RNA' nın uzaklaştırılması amacıyla çözeltiye her 100 µl DNA solüsyonuna karşılık 1 µl Rnaz A (Çizelge 3.2) eklenir ve 37°C' de 15 dakika bekletilir.

Çizelge 3.2: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan solusyonlar

Solusyon Adı	İçeriği	Konsantrasyonu
Ekstraksiyon Tamponu	Sodyum EDTA Tris-HCl NaCl CTAB β-merkapto etanol	20 mM 100 mM 1,4 M %2 (w/v) %0,2
Kloroform:oktanol	Kloroform Oktanol	24:1 (v/v)
NaCl	Sodyum Klor	5 M
TE Tamponu	Tris-HCl EDTA	10 mM 1 mM
Rnaz A		10 mg/ml

Bütün bu işlemler sonucunda elde edilen DNA' nın miktarının ve daha sonra yapılacak olan polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak DNA sulandırım oranlarının belirlenmesi amacıyla U.V. spektrofotometrede (Milton Roy 601) 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı (Çizelge 4.1). Distile su ile yapılan 1/200' lük sulandırımın U.V. spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonları hesaplandı. DNA konsantrasyonları hesaplanırken

$$\text{O.D.}_{260} \times 50 \times \text{Seyreltme Katsayısı (oranı)}$$

(Maniatis et. al., 1982) formülü kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu için sulandırımı yapılan genomik DNA örnekleri -20°C’ de saklandı.

3.3. Arpa Genomik Parmakizlerinin RAPD Analiz Yöntemleriyle Çıkarılması

Ebeveynler 5819 (hassas-baba) ve Tokak (dirençli-ana), F₁ ve 14 tane F₂ bireylerinin genç yapraklarından Lodhi ve ark.’nın (1994) önerdiği yöntemle izole edilen genomik DNA’ların, rastgele nükleotid dizisine sahip olan 10-19 bazlık primerler kullanılarak, Williams ve ark. (1990b) ile Welsh ve McClelland (1990) tarafından önerilen RAPD yöntemi ile genomların rastgele bölgelerinin çoğaltılması sağlandı. Bu işlemler sonucunda bireylerin genomik parmakizleri çıkartıldı ve analiz edildi.

3.3.1. RAPD Analizlerinde Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan 17 bireyden her birinin RAPD analizleriyle DNA parmakizlerinin çıkarılmasında Operon Teknoloji tarafından sentezlenen ve Prizma A.Ş. firmasından alınan, rastgele nükleotid dizisine sahip olan 10-19 bazlık 28 farklı primer kullanıldı (Çizelge 3.3). Kullanılan bu primerlerin stok çözeltileri -20°C’ de dondurucuda saklandı. Deneylerde stok çözeltilerin 1/20 oranında sulandırımı kullanıldı. Primerlerin GC içerikleri %40-%70 arasında değişmekteydi.

3.3.2. RAPD Analizlerinde Kullanılan Enzim

RAPD analizlerinde, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*’tan izole edilen, pH 9’ da 72°C’ de en yüksek aktiviteyi gösteren ve 90-95°C’ lere bile dayanabilen Taq DNA Polimeraz (MBI Fermentas, EPO 282) enzimi kullanıldı (Gelfand, 1989). Enzim -20°C’ de dondurucuda saklandı.

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Yürütülmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu 0,5 ml' lik mikrotüplerde toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.4' de gösterilmektedir. Tüm bu bileşenler tüplere eklendikten sonra PCR reaksiyonlarında gerçekleştirilen yüksek sıcaklıklarda bileşenlerin buharlaşmasını engellemek amacıyla her bir tüpe 1-2 damla mineral yağ damlatıldı. Daha sonra tüpler termal saykırda (MJ Researching., PTC 100) yaklaşık 3 saat süren ve Çizelge 3.5' de gösterilen PCR programına maruz bırakıldı.

Çizelge 3.3: RAPD analizlerinde kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi
OD-8	5' GTG TGC CCC A 3'
O-19	5' GGT GCA CGT T 3'
B-374	5' GGT CAA CCC T 3'
O-10	5' TCA GAG CGC C 3'
PRA-3	5' CAA TCG CCG T 3'
UBC-237	5' CGA CCA GAG C 3'
PRA-1	5' GTG ACG TAG G 3'
OPC-6	5' GAA CGG ACT C 3'
OPE-10	5' CAC CAG GTG A 3'
OPA-1	5' CAG GCC CTT C 3'
G-2	5' GG TAC ACG TTG CAC ATA CA 3'
K-15	5' CTC CTG CCA A 3'
OPC-19	5' GTT GCC AGC C 3'
A-17	5' GAC CGC TTG T 3'
R-1	5' TCG TGC CTG ACT TAC CTG 3'
K-10	5' GTG CAA CGT G 3'
F-13	5' GGC TGC AGA A 3'
E-3	5' GAA TTC CAG GTA AGT 3'
A-9	5' GGG TAA CGC C 3'
A-18	5' AGG TGA CCG T 3'
K-8	5' CCC ATG GGT G 3'
S-34	5' GAT AGC CGA C 3'
BC-302	5' CGG CCC ACG T 3'
O-02	5' ACG TAG CGT C 3'
PRA-2	5' GTG ATC GCA G 3'
P-394	5' CGA CTC CAA C 3'
OPC-15	5' GAC GGA TCA G 3'
A-5	5' AGG GGT CTT G 3'

Çizelge 3.4: RAPD Bileşenleri

Bileşen	İçeriği	Reaksiyon Konsantrasyonu	Reaksiyona Eklenme Sırası
Enjeksiyonluk su	-	-	1
10 X PCR Tamponu	Tris HCl (pH 8.8 25°C'de) KCl Nonidet P40	10 mM 50mM %0.01	2
MgCl ₂	-	2 mM	3
dNTP mix (10 mM) MBI Fermentas R0191	dATP dCTP dGTP dTTP	5 mM 5 mM 5 mM 5 mM	4
Primer	-	50 ng	5
Genomik DNA	-	75 ng	6
Taq Polimeraz (5ü/µl)	-	0.5 ü	7

Çizelge 3.5: Termal sayklırın programlanması

	İlk 34 Döngü		Son Basamak	
	Sıcaklık	Zaman	Sıcaklık	Zaman
Kalıp DNA' nın denatürasyonu	94 °C	30 saniye	—	—
Primer Bağlanması	35 °C	1 dakika	—	—
Polimerizasyon	72 °C	1 dakika, 45 saniye	72 °C	8 dakika

3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

3.3.4.1. % 0.8' lik Jel

İzole edilen DNA örneklerinin hem RNaz muamelesi öncesi hem de sonrası jelde görünümüne bakmak amacıyla %0.8' lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 0,48 gr agaroz tartılıp, erlenmayer içindeki 60 ml 1 x Tris-Asetat (TAE) tamponuna eklendi. Daha sonra karışımın mikrodalga fırında 5 dakika ısıtılarak erimesi sağlandı ve traye dökülmeden önce sıcaklığının 50-55°C' ye düşmesi beklendi. Karışımın sıcaklığı istenilen değere ulaştığında üzerine DNA örneklerinin boyanmasını

sağlamak amacıyla 10 mg/ml' lik etidyum bromür (EtBr) solusyonundan 3.5 µl EtBr eklendi, tüp EtBr' ün homojen dağılmasını sağlamak amacıyla iyice çalkalandı ve daha sonra da traye dökülüp donduktan sonra içinde 1 x TAE bulunan elektroforez tankına alındı. Daha sonra, hazırlanan bu jeldeki kuyulara her bir bireye ait DNA örneklerinden 2µl, üzerlerine yaklaşık 1µl DNA' ların kuyulara çökmesini sağlayan bromofenol mavisi eklenerek yüklendi ve 70-80 V' ta 5 dakika yürütüldü. 5 dakika sonucunda, U.V. ışığı (TFX-20M) altında izole edilen DNA' ların varlığı belirlendi ve örnekler -20°C' de dondurucuda saklandı. İzole edilmediği gözlenen örneklerin izolasyonuna devam edildi.

3.3.4.2. % 1.2' lik Jel

Polimeraz zincir reaksiyonları sonucunda genomik DNA örneklerinin, kullanılan 10 bazlık primerlerle çoğalıp çoğalmadığının anlaşılması amacıyla % 1.2' lik deneme jeli hazırlandı. Bunun için 1.08 gr agaroz 90 ml 1 x TAE tamponuna eklenip, mikrodalga fırında 5-6 dakika ısıtılarak eritildi. Karışımın sıcaklığı 50-55°C' ye düştüğünde üzerine 1.7 µl EtBr eklendi, iyice çalkalandı ve traye döküldü. Jelin 15-20 dakika boyunca donması beklendikten sonra 1 x TAE' nin bulunduğu elektroforez tankına alındı ve PCR bileşenlerinin bulunduğu her bir mikrotüp üzerine 5 µl bromofenol mavisi eklenerek kuyulara yüklendi. Jelin 70 V' ta 10 dakika yürütülmesi sonucunda, kullanılan primerin çalışıp çalışmadığı U.V. ışığı altında belirlendi, çalışan örnekler -20°C' de dondurucuda saklandı.

3.3.4.3. % 2' lik Jel

Kullanılan her bir primerin, tüm örneklerde çalıştığı % 1.2' lik deneme jeline belirlendikten sonra, tamamlanan PCR setlerinin fotoğraflarının çekilmesi amacıyla % 2' lik boyama jeli hazırlandı. Bunun için 3 gr agaroz tartılıp 150 ml 1 x TAE tamponuna eklendi. Karışımın mikrodalga fırında 5-6 dakika ısıtılmasıyla erimesi sağlandı, daha sonra da sıcaklığın 50-55°C' ye düşmesi beklendi. Jel daha sonra boyandığından bu aşamada EtBr eklenmemiştir. Jelin sıcaklığı istenilen değere düştüğünde jel traye aktarıldı ve 15-20 dakika donması beklendi. Jel donduğunda

elektroforez tankına alınıp yüklemeye hazır duruma getirildi. Daha sonra jelle sırasıyla 5 µl Ladder DNA (1 kb), 5 µl negatif kontrol ve 5819, Tokak, F₁ ve küçükten büyüğe sıralanan F₂ bireylerinin tüplerde kalan 20-25 µl' sinin tamamı yüklendi ve 100 V' ta yaklaşık 2-2.5 saat yürütüldü. Bu süre sonunda jel aşağıda belirtildiği şekilde boyandı ve U.V. ışığı altında gözlemlenebilen RAPD bant profillerinin, DS 34 Polaroid kamera ve 667 Polaroid film kullanılarak fotoğrafı çekildi.

Agaroz jel elektroforezlerinde kullanılan maddeler Çizelge 3.6' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.6: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan maddeler

Madde İsmi	İçeriği	Konsantrasyonu
Agaroz	-	-
Tris-Asetat Tamponu (5x) (0.5 l)	Tris-HCl Glasiel Asetik Asit (GAA) EDTA (0.5 M)	1.21 gr 28.6 ml 50 ml
Bromofenol mavisi (20 ml)	Bromofenol Sukroz Distile su	0.05 gr 8 gr 11.95 ml
Etidyumbromür (10mg/ml)	Etidyumbromür Distile su	5 gr 500 ml

3.3.5. % 2' lik Jelin Boyanması

% 2' lik jelin boyanması şu şekilde gerçekleştirildi:

1. Jelin boyanacağı kabın içine, karanlık odada 320 ml distile su ve EtBr' ün ½ stoğundan 14 µl eklenip jel suyun içine yerleştirildi ve 30 dakika bekletildi.
2. 30 dakika sonra aynı suyun içine 4 µl daha EtBr ½ stoktan eklendi ve 15 dakika bekletildi.
3. Toplam 45 dakika bekletilen su dökülüp, kaba yeniden 320 ml distile su ve EtBr ½ stoğundan 12 µl eklendi. 10 dakika bekletildi.
4. 10 dakika bekletilen EtBr' lü su döküldü. Jel distile suda birkaç kez yıkandı ve 30 dakika distile suda bekletildi. 30 dakikalık boyama sonucunda jelin fotoğrafı çekildi.

3.4. Polimorfizm Oranlarının Hesaplanması

Çalışmada kullanılan arpa (*Hordeum vulgare* L.) ailesine ait 14 F₂ bireyinin ebeveynlerin her birine benzerlikleri ve ayrıca F₂' lerin kendi aralarındaki benzerlik dereceleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Sokal and Sneath, 1963). Bu amaçla Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9' da görülen jel fotoğraflarındaki markırlar değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda her bir primer için çizelgeler hazırlandı (Çizelge 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9) ve her bir bireyin sahip olduğu markırlar çizelgeler üzerinde '+' olarak işaretlendi. Daha sonra bu çizelgelerden yararlanılarak karşılaştırılan bireyler arasındaki homolog bantlar ve homolog olmayan bantlar sayıldı ve bulunan sonuçlar % olarak Çizelge 4.10 ve 4.11' de verildi. Ayrıca bu veriler kullanılarak "sayısal taksonomi ve çok çeşitli analiz sistemleri 1.8 versiyon" programında (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.8; Rohlf, 1990) dendogram şemaları çizildi (Çizelge 4.12 ve 4.13).

$$S. I. = \frac{\text{Homolog bantların sayısı}}{\text{Homolog bantların sayısı} + \text{Non-homolog bantların sayısı}}$$

S.I. = Benzerlik oranı (Similarity Index)

4. BULGULAR

4.1. DNA İzolasyon Yönteminin Belirlenmesi

Amplifikasyon reaksiyonlarında kullanılan genomik DNA materyali, genç arpa yapraklarından Lodhi ve ark. (1994) tarafından önerilen yöntemle göre izole edildi (Şekil 4.1). Daha sonra izole edilen bu DNA'ların saflığının, miktarının ve polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak DNA sulandırım oranlarının belirlenmesi amacıyla U.V. spektrofotometrede (Milton Roy 601) 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı (Çizelge 4.1). Bu ölçümler sırasında Maniatis ve ark.'nın (1982) önerdikleri formülden yararlanıldı.

Çizelge 4.1: Arpa DNA' sı spektrofotometre sonuçları

Bireyler	A ₂₆₀	µg/µl	ng/µl
Tokak	0,230	2,30	2300
5819	0,291	2,91	2910
F ₁ -51	0,098	0,98	980
F ₂ 50-18	0,331	3,31	3310
F ₂ 50-19	0,248	2,48	2480
F ₂ 50-21	0,214	2,14	2140
F ₂ 50-27	0,250	2,50	2500
F ₂ 50-31	0,232	2,32	2320
F ₂ 50-40	0,206	2,06	2060
F ₂ 50-42	0,225	2,25	2250
F ₂ 50-45	0,163	1,63	1630
F ₂ 50-54	0,222	2,22	2220
F ₂ 50-56	0,204	2,04	2040
F ₂ 50-65	0,154	1,54	1540
F ₂ 50-72	0,200	2,00	2000
F ₂ 50-73	0,277	2,77	2770
F ₂ 50-76	0,177	1,77	1770

4.2. PCR Amplifikasyon Şartlarının Optimizasyonu

PCR analizindeki bileşenlerden DNA, primer, $MgCl_2$ ve Taq DNA polimerazın, en iyi amplifikasyon şartlarını elde etmek amacıyla optimizasyonları yapıldı. Buna göre reaksiyonlarda kullanılacak olan DNA miktarı 75 ng, primer miktarı 50 ng, $MgCl_2$ 2 mM ve Taq DNA polimeraz miktarı ise 0,5 ünite olarak belirlendi.

4.3. Arpa Bireylerinin Genomik Parmakizlerinin Çıkarılması

Yapılan çalışmada 10-19 baz uzunluğundaki 28 farklı oligonükleotid primer kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile RAPD analizleri yapıldı. Kullanılan 28 primerden 20 tanesi ile (A-5, A-17, A-18, BC-302, E-3, F-13, G-2, K-8, K-10, K-15, O-02, OPA-1, OPC-15, OPC-19, OPE-10, P-394, PRA-1, PRA-2, R-1 ve S-34) amplifikasyon ürünü elde edilemedi. Heteromorfik bantlar veren diğer 8 primer ile (A-9, B-374, O-10, O-19, OD-8, OPC-6, PRA-3 ve UBC-237) uzunlukları yaklaşık 250-5000 baz çifti arasında değişen toplam 109 adet amplifikasyon ürünü elde edildi. Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9' da bu primerlere ait amplifikasyon sonuçlarının agaroz jel üzerinde, U.V. ışık altında gözlenerek çekilmiş fotoğrafları görülmektedir.

Daha sonra Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9' da görülen jel fotoğraflarındaki markırlar değerlendirilerek her bir primer için çizelgeler hazırlandı (Çizelge 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9).

Çizelge 4.2: OPC-6 primeri ile elde edilen RAPD markırlarının dağılımı

	5819 S	Tok R	F ₁	18 S	19 S	21 S	27 S	31 S	40 S	42 R	45 R	54 R	56 R	65 S	72 R	73 R	76 R
M 1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
M 2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
M 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 5	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
M 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
M 7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M 8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
M 9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
M 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M 11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M 12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.3: PRA-3 primeri ile elde edilen RAPD markırlarının dağılımı

	5819 S	Tok R	F ₁	18 S	19 S	21 S	27 S	31 S	40 S	42 R	45 R	54 R	56 R	65 S	72 R	73 R	76 R
M 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
M 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 3	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
M 5	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M 6	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 7	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M 8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M 9	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
M 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M 11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
M 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M 13	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.4: O-19 primeri ile elde edilen RAPD markırlarının dağılımı

	5819 S	Tok R	F ₁	18 S	19 S	21 S	27 S	31 S	40 S	42 R	45 R	54 R	56 R	65 S	72 R	73 R	76 R
M 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M 3	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
M 4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M 9	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
M 10	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
M 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-

Çizelge 4.5: O-10 primeri ile elde edilen RAPD markırlarının dağılımı

	5819 S	Tok R	F ₁	18 S	19 S	21 S	27 S	31 S	40 S	42 R	45 R	54 R	56 R	65 S	72 R	73 R	76 R
M 1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 3	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 4	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
M 5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 6	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M 9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 11	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
M 12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
M 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 15	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
M 16	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
M 17	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 18	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-

Çizelge 4.8: UBC-237 primeri ile elde edilen RAPD markılarının dağılımı

	5819 S	Tok R	F ₁	18 S	19 S	21 S	27 S	31 S	40 S	42 R	45 R	54 R	56 R	65 S	72 R	73 R	76 R
M 1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M 4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
M 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
M 6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M 7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M 9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M 11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M 12	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
M 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
M 16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
M 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Çizelge 4.9: OD-8 primeri ile elde edilen RAPD markılarının dağılımı

	5819 S	Tok R	F ₁	18 S	19 S	21 S	27 S	31 S	40 S	42 R	45 R	54 R	56 R	65 S	72 R	73 R	76 R
M 1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
M 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
M 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
M 8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
M 9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

OPC-6 primeri ile elde edilen RAPD analizi sonucunda 12 adet markır tespit edildi (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2). Bunlardan yaklaşık 1500 bç. uzunluğunda farklı iki markırın (1. ve 2. markır) F_1 ve bazı F_2 ' lerde bulunurken ebeveynlerin hiç birinde bulunmadığı gözlemlendi. Aynı şekilde 5. markır da F_2 ' lerde gözlenirken F_1 ' de ve ebeveynlerde gözlenmedi. 7. markır sadece iki F_2 bireyinde (F_{231} ve F_{245}) gözlemlendi. 9., 10. ve 11. markırlarda da ebeveyn ve F_1 ' de gözlenmeyen, F_2 ' lerin sadece birkaçında gözlenen non-parental bantlar belirlendi.

PRA-3 primeri ile yapılan amplifikasyon reaksiyonlarında 13 tane markır elde edildi (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3). 2. markır ebeveynlerde, F_1 ' de ve kuraklığa hassas iki F_2 bireyinde (F_{218} ve F_{219}) gözlemlendi, diğer F_2 bireylerinde ise gözlenmedi. Aynı şekilde 3. markır da ebeveynlerde, F_1 ' de ve sadece 1 F_2 bireyinde (F_{218}) gözlemlendi. 5. markır hassas ebeveynde (5819), F_1 ' de ve kuraklığa hassas 2 F_2 bireyinde (F_{219} ve F_{240}) gözlemlendi ancak kuraklığa dirençli F_2 bireylerinin hiçbirinde gözlenmedi. 6. markır sadece dirençli ebeveynde (Tokak) ve 2 kuraklığa hassas F_2 bireyinde (F_{227} ve F_{231}) gözlemlendi. 7. markır hassas ebeveynde ve 3 hassas F_2 bireyinde (F_{218} , F_{219} ve F_{240}) gözlenirken F_1 ve diğer F_2 ' lerde görülmedi. 9. markır dirençli ebeveynde, F_1 ' de ve F_2 ' lerin çoğunda görüldü.

O-19 primeri kullanılarak yapılan RAPD analizlerinde 11 tane markır elde edildi (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.4). 3. markır F_1 ' de ve bazı F_2 bireylerinde görüldü, ebeveynlerde ise varlığı belirlenmedi. 4. markır sadece hassas ebeveynde (5819) ve F_1 ' de gözlemlendi. 5., 7. ve 8. markırlar sadece F_{256} ' da (kuraklığa dirençli) gözlemlendi. 11. markır ebeveynlerde veya F_1 ' de görülmezken 3 F_2 bireyinde gözlemlendi.

O-10 primeri ile yapılan amplifikasyon reaksiyonlarında elde edilen 18 adet markırdan ilki sadece F_1 ' de gözlemlendi, diğer bireylerde ise gözlenmedi (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.5). Aynı şekilde 2. markır da sadece dirençli ebeveynde gözlemlendi, F_1 ve F_2 ' lerde gözlenmedi. 3. markır ebeveynlerde, F_1 ' de ve kuraklığa hassas 2 F_2 bireyinde (F_{219} ve F_{227}) gözlemlendi. 5. ve 7. markırlar sadece hassas ebeveynde ve F_1 ' de bulunurken F_2 ' lerin hiçbirinde gözlenmedi. 6. markır dirençli ebeveynde ve F_1 ' de gözlemlendi, diğer bireylerde gözlenmedi. 9. markır sadece dirençli ebeveynde ve F_1 ' de gözlemlendi. 10. ve 12. markırlar sadece hassas ebeveynde gözlemlendi. 11. markır

dirençli ebeveynde, F_1' de ve F_2' lerin bazılarında gözlemlendi. 13. markır sadece F_{272} bireyinde (kuraklığa dirençli) gözlemlendi, diğer bireylerde varlığı saptanmadı. 17. markır sadece dirençli ebeveynde, F_1' de ve F_{218}' de (kuraklığa hassas) gözlemlendi.

B-374 primerinin kullanıldığı amplifikasyon reaksiyonlarında 15 adet markır elde edildi (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.6). Bunlardan 2. markır ebeveynlerde, F_1' de ve kuraklığa dirençli olan iki F_2 bireyinde (F_{245} ve F_{256}) gözlemlendi. 3. markır hassas ebeveynde, F_1' de ve kuraklığa hassas olan 4 F_2 bireyinde (F_{218} , F_{219} , F_{221} ve F_{227}) gözlemlendi. 6. markır sadece ebeveynlerde gözlemlendi, diğer bireylerde gözlenmedi. 8. markır sadece kuraklığa hassas olan F_{2-31} bireyinde gözlemlendi. 9. markır ebeveynlerin birinde (5819) ve F_2' lerin çoğunda gözlemlendi. 11. markır hassas ebeveynde, F_1' de ve tüm F_2' lerde gözlemlendi. 12. markır sadece dirençli ebeveynde (Tokak), F_{219}' da (hassas) ve F_{231}' de (hassas) gözlemlendi. 13. ve 15. markırlar sadece F_{219}' da gözlemlendi. 14. markır ise sadece F_{221} ve F_{227}' de gözlemlendi.

A-9 primeri ile elde edilen RAPD analizi sonucunda 11 tane markır elde edildi (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.7). Bu markırlardan ilki sadece 3 F_2 bireyinde (F_{221} , F_{242} ve F_{272}) gözlemlendi. 2. markır hassas ebeveynde, F_{221}' de (hassas), F_{242}' de (dirençli) ve F_{272}' de (dirençli) gözlemlendi. 3. markır hassas ebeveynde, F_1' de ve F_{221}' de (hassas) gözlemlendi. 4. markır ebeveynlerde ve F_1' de görülmezken F_2' lerin bazılarında gözlemlendi. 5. markır sadece hassas ebeveynde ve F_{221}' de (hassas) gözlemlendi. 7. markır ebeveynlerden birinde, F_1' de ve F_2' lerin bazılarında gözlemlendi. 8. markır ebeveynlerden birinde ve bazı F_2 bireylerinde gözlemlendi. 9. ve 10. markırlar ebeveynlerden birinde, F_1' de ve tüm F_2 bireylerinde gözlemlendi. 11. markır ise sadece dirençli ebeveynde gözlemlendi.

UBC-237 primeri ile elde edilen RAPD analizi sonucunda 20 adet markır tespit edildi (Şekil 4.8 ve Çizelge 4.8). Bunlardan 1. ve 2. markırlar sadece ebeveynlerden birinde (5819) ve F_1' de görüldü. 5. markır ebeveynlerde ve F_1' de görülmezken F_2' lerin bazılarında görüldü. 7. markır sadece dirençli ebeveynde ve F_{256}' da (dirençli) gözlemlendi. 8. markır sadece F_{276}' da görüldü. 9. ve 11. markırlar ebeveynlerde ve F_1' de görülürken F_2' lerden sadece birinde (F_{256}) gözlemlendi. 10. markır sadece F_{265}' de gözlemlendi. 13. ve 15. markırlar F_2' lerin bazılarında gözlemlendi.

ancak ebeveynlerde ve F_1' de gözlenmedi. 17. markır sadece ebeveynlerde ve F_1' de gözlendi. 18. markır ebeveynlerde, F_1' de ve 2 F_2 bireyinde (F_{256} ve F_{276}) görüldü. 19. markır sadece 1 F_2 bireyinde (F_{245}) gözlendi. Aynı şekilde 20. markır da sadece F_{256} bireyinde gözlendi.

OD-8 primeri ile yapılan amplifikasyonlar sonucunda 9 tane markır elde edildi (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.9). 3. markır sadece F_{219} (hassas) ve F_{221} (hassas) bireylerinde gözlendi. 5. markır sadece F_{221} (hassas) bireyinde gözlendi. 6. markır hassas ebeveynde, F_1' de ve F_2' lerin bir kısmında görüldü. 7. markır sadece F_{276} bireyinde gözlendi. 9. markır ise sadece üç F_2 bireyinde (F_{221} , F_{265} ve F_{273}) gözlendi.

4.4. Arpa Bireyleri Arasındaki Polimorfizm Değerlerinin Karşılaştırılması

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) ailesine ait 14 F_2 bireyinin ebeveynlerin her birine benzerlikleri ve ayrıca F_2' lerin kendi aralarındaki benzerlik dereceleri Sokal ve Sneath (1963) tarafından önerilen formüle göre yapıldı. Buna göre elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.10' da ve Çizelge 4.11' de verilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda elde edilen dendogramlar ise Çizelge 4.12 ve 4.13' de görülmektedir.

Yapılan hesaplamalar sonucunda kuraklığa dirençli olan ebeveyn Tokak' a en çok benzeyen bireyin %62,97' lik benzerlik oranı ile kuraklığa hassas olan F_{219} olduğu gözlendi. Benzer şekilde kuraklığa hassas olan F_{218}' in de Tokak' a büyük benzerlik gösterdiği belirlendi (%61,73). Tokak' a en az benzerlik gösteren bireyin ise %36,64' lük benzerlik oranı ile kuraklığa hassas olan F_{240} olduğu görüldü. Bunun yanında kuraklığa dirençli olan F_{273} (%37,95) ve F_{276} (%38,10) bireyleri de dirençli ebeveyne çok az benzerlik gösterdi.

İlginç bir şekilde kuraklığa dirençli ebeveyne (Tokak) en çok benzeyen bireyin (F_{219}) aynı zamanda kuraklığa hassas olan ebeveyn 5819' a da %54,55' lik

oranla en çok benzeyen birey olduğu görüldü. F₂19' u %52,98' lik benzerlik oranı ile F₂-18 bireyinin takip ettiği gözlemlendi. Hassas olan bu iki F₂ bireyine benzer şekilde, diğer hassas F₂ bireylerinin de birbirine yakın oranlarla 5819' a benzerlik gösterdikleri belirlendi. 5819' a en az benzeyen bireyin ise kuraklığa dirençli olan F₂54 bireyi olduğu gözlemlendi (%30,97). Kuraklığa dirençli olan F₂73 (%31,53) ve F₂76 (%32,96) bireyleri de 5819' a çok az benzerlik gösterdiler. Kuraklığa hassas bireyler içinde ise 5819' a en az benzerlik gösterenlerin ise F₂40 (%36,28) ve F₂65 (%36,75) bireyleri olduğu belirlendi.

F₂ bireyleri kendi aralarında karşılaştırıldığında birbirine en çok benzeyen bireylerin kuraklığa hassas olan F₂18 ve F₂19 (%71,47) bireyleri olduğu gözlemlendi. F₂19 bireyi kuraklığa hassas olan F₂21 bireyine de büyük oranda (%70,65) benzerlik gösterdi. Aynı şekilde kuraklığa hassas olan F₂27 ile F₂40 bireyleri de birbirlerine benzerlik gösterdiler (%70,65). Kuraklığa hassas bireyler arasında birbirine en az benzeyen bireylerin ise %43,41' lik benzerlik oranı ile F₂21 ve F₂40 bireyleri olduğu gözlemlendi.

Dirençli bireyler incelendiğinde birbirine en çok benzeyenlerin %67,16' lık benzerlik oranı ile F₂42 ile F₂72 olduğu gözlemlendi. F₂73 ve F₂76 bireyleri de birbirlerine %66,96 oranında benzerlik gösterdiler. Kuraklığa dirençli bireyler arasında birbirine en az benzeyen bireylerin %43,43' lük bir oranla F₂56 ve F₂73 bireyleri olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde F₂45 ve F₂76 bireyleri de birbirine çok az benzerlik gösterdi (%44,76).

Kuraklığa dirençli bireylerle kuraklığa hassas olan bireyler arasındaki en yüksek benzerliğin F₂40 (hassas) ve F₂54 (dirençli) bireyleri arasında %67,29 oranında, F₂31 (hassas) ve F₂42 (dirençli) arasında %66,66 oranında ve F₂65 (hassas) ve F₂72 (dirençli) arasında %65,59 oranında olduğu gözlemlendi. Birbirine en az benzeyen bireylerin ise %38,05 oranı ile F₂21 (hassas) ve F₂76 (dirençli), %39,65 oranı ile F₂21 (hassas) ve F₂73 (dirençli) ve %39,86 oranı ile F₂19 (hassas) ve F₂56 (dirençli) bireylerinin olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA

5.1. Uygun DNA İzolasyon Yönteminin Seçilmesi

Bu çalışmada kullanılan DNA materyalinin izolasyonunda ilk önce Spiers ve ark. (1981) tarafından önerilen yöntem denendi. Ancak bu yöntem ile yeterli miktarda ve saflık derecesinde DNA izole edilemedi. Daha sonra denenen, Lodhi ve ark. (1994) tarafından önerilen yöntem ise başarılı sonuçlar verdi. Bu yöntemin diğer yöntemlere göre bazı üstünlükleri belirtilmiştir. Bunlardan ilki elde edilen DNA miktarının yüksek olmasıdır (1 gr yaprak dokusu başına yaklaşık olarak 1 mg DNA). PCR’ da kullanılabilen, restriksiyon endonükleazları ile kesilebilen daha fazla miktarda temiz DNA sağlayan ve Doyle ve Doyle (1990) tarafından önerilen yöntemin modifiye edilmiş şekli olan bu yöntem aynı zamanda CsCl santrifujlemesini de gerektirmez. Hızlı ve basit olan bu yöntem ile tek bir günde 30-40 DNA örneği elde edilebilir. Ancak bu yöntem uygulanırken dikkat edilmesi gereken bir nokta uygun yaprak dokusunun seçilmesidir. Yapılan çalışmalar çok genç veya tam olarak büyümüş yaprak dokularında DNA izolasyon veriminin düşük olduğunu göstermiştir (Lodhi et. al., 1994).

Bitki DNA’ sının izolasyonunda karşılaşılan bir güçlük, hücrenin bozulması sonucu serbest bırakılan ve DNA’ nın yapışkan jelimsi matrikse gömülmesine ya da kahverengi ürünlerin oluşmasına sebep olan polisakkaritler veya polifenoller gibi ikincil yapıtaşlarıyla nükleik asitlerin kompleks oluşturmasıdır. Böyle bir DNA genellikle PCR amplifikasyonları için uygun değildir (Guillemaut and Maréchal-Drouard, 1992). Ancak polimerazlar, ligazlar ve restriksiyon endonükleazları gibi pek çok biyolojik enzime karışarak (Shioda and Marakami-Muofushi, 1987; Richards, 1988) DNA’ nın amplifikasyonuna engel olan bu polisakkaritlerin DNA’ dan uzaklaştırılması kolay değildir (Murroy and Thompson, 1980). Fang ve ark. (1992) 1 M NaCl’ ün polisakkaritlerin uzaklaştırılmasını, onların etanoldeki çözünürlüklerini artırarak kolaylaştırdığını, böylelikle de bunların DNA ile birlikte çökmediğini bulmuştur. Bununla beraber Lodhi ve ark. (1994) tarafından tarif edilen yöntemde NaCl’ ün daha yüksek konsantrasyonlarının

daha etkili olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak bu yöntemle -20°C’ de saklandığında en az 2 yıl kullanılabilen, yüksek kaliteli, temiz ve daha fazla miktardaki DNA çok daha pratik bir şekilde izole edilmiştir.

5.2. Uygun Genetik Markırın Seçilmesi

Birbiriyle sıkı ilişkili tahılların belirlenmesi için genetik bağlantı haritalarının veya DNA dizisinin belirlenmesi, hızlı ve güvenilir bir şekilde elde edilebilen pek çok polimorfik karakterleri gerektirir. Moleküler polimorfik DNA markırları genetik bağlantı haritalarında etkin bir şekilde kullanılmıştır (Lin et. al., 1996). Bununla beraber bitki yetiştiriciliğinde DNA markır sisteminin seçimi, proje konusuna, popülasyonun özelliğine, araştırılan türlerin genetik çeşitliliğine, markır sisteminin yeteneğine, analiz için gerekli olan zamana ve maddi gereksinime bağlıdır. Aslında her bir markır sisteminin üstün olduğu ve zayıf olduğu özellikleri vardır. Bu yüzden de her bir markır sisteminin yararlılığını kullanmadan belirlemek zordur. Örneğin arpa gibi kendine döllen türlerde gen havuzundaki polimorfizmlerin belirlenmesinde RFLP’ lere nazaran RAPD’ ler daha kullanışlıdır (Staub et. al., 1996). Bitki üreticiliğinde RAPD’ in maliyeti RFLP ile karşılaştırıldığında (Ragot and Hoisington, 1993), RAPD’ in az miktarda örnek gerektiren çalışmalarda zaman ve maliyet açısından daha elverişli olduğu görülmüştür (Fritsch and Reiseberg, 1996). Ayrıca RAPD markırlarının belirlenmesi, sadece PCR ve agaroz jel elektroforezini gerektirdiğinden nispeten basittir. RAPD polimorfizmleri dikkate değer zorluklara ve sorunlara yol açabilen işaretlenmiş radyoizotopların kullanımını gerektirmeden gözlenebilir (Lin et. al., 1996). RAPD’ in diğer önemli üstünlükleri; analiz için sadece küçük bir miktar dokunun yeterli olması, sınırsız sayıda lokus üretebilmesi, genomun nispeten tarafsız olması ve aynı primerlerin herhangi bir organizmaya başarıyla uygulanabilmesidir (Fritsch and Reiseberg, 1996).

Bununla beraber RAPD’ in tüm bu üstünlüklerinin yanında karşılaşılan bazı problemler de vardır. Bunların başında dominant allelik ekspresyon ve bununla ilişkili olarak lokus başına iki allel olduğunun varsayılması gelir. Bu durumda alternatif bir yöntem RAPD parçalarının restriksiyon endonükleazları ile muamele

edilmesi ve çeşitliliğin araştırılmasıdır, bu yolla heterozigotlar belirlenebilir (Fritsch and Reiseberg, 1996).

İkinci problem; kesin lokus homolojisinin belirlenmesinin ekstra çalışma olmaksızın mümkün olmamasıdır. Bu problemin hafifletilmesinde akrilamid jeller yardımcı olabilir çünkü akrilamid jel bant dağılımını artırır (Fritsch and Reiseberg, 1996).

Karşılaşılan bir diğer problem yöntemin özellikle geçmiş yıllarda tekrarlanabilme problemi ile karşılaşmış olmasıdır. Metod magnezyum klorid konsantrasyonuna, DNA' nın saflığına ve reaksiyon karışımında kullanılan primer:DNA oranına yüksek derecede duyarlıdır (Ellsworth ve ark., 1993). Bu yüzden uygun laboratuvar tekniği ve yöntemlerinin ve reaksiyonlarda kullanılan bütün materyallerin doğru bir biçimde optimizasyonu önemlidir. Yöntemin güvenilirliğinin artırılabilmesi için elektronik pipet kullanımı önemle tavsiye edilmektedir. DNA' nın hava ile teması mümkün olduğunca engellenmelidir. Son olarak bozulmayı önlemek amacıyla primerlerin uygun bir şekilde saklanması gerekmektedir. Her bir primer alınışını takiben kesirlere bölünmeli, kurutulmalı ve kullanana kadar donma derecesinin altında saklanmalıdır. Bu yöntemlerin uygulanması, tekrarlanabilir ve kaliteli sonuçlar verecektir (Fritsch and Reiseberg, 1996).

Sonuç olarak dikkatli bir şekilde kontrol edilmiş reaksiyon koşulları altında ve uygun taksonomik düzeylerde, RAPD; populasyon genetiği, sistematik ve ekoloji çalışmalarında, genetik haritaların kurulmasında, özgün fenotipik genlerle bağlantılı genetik markırların üretilmesinde, ebeveyn tayinlerinde ve klonların ve yetiştirilen bitkilerin belirlenmesi gibi pek çok konuda kullanılabilen çok güçlü bir araçtır.

Oldukça basit bir genoma sahip, diploid bir organizma olan arpa (*Hordeum vulgare* L.) ailesine ait döl analizlerinin çıkarılması ve kuraklığa hassas ve dirençli genotipler arasındaki genetik polimorfizmlerin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, zaman ve maliyet açısından elverişli olması, çok küçük miktarlardaki

genomik DNA' nın yeterli olması, işaretli radyoizotopların kullanılmaması, sadece primerin değiştirilmesiyle çok sayıda polimorfizmin elde edilebilmesi gibi üstünlükleri gözönüne alınarak RAPD markırlarının kullanılmasına karar verilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

5.3. RAPD Amplifikasyon Şartlarının Optimizasyonu

RAPD PCR' a dayalı, tek primerli bir tekniktir (Williams et. al., 1990b). Ancak tabi ki pek çok farklı türe uygulanabilen RAPD yönteminde tek bir protokolün tüm durumlar için uygun olması beklenemez. Her bir yeni RAPD uygulaması optimizasyon gerektirecektir (Innis and Gelfand, 1990). Bu optimizasyonlar şu şekilde olabilir:

5.3.1. RAPD Bileşenlerinin Optimizasyonu

5.3.1.1. DNA Konsantrasyonu

Farklı DNA ekstraksiyon metodları farklı saflık derecelerinde DNA' lar verdiğinden, yoğun bantlar veren ve tekrarlanabilen RAPD yönteminin başarılabilmesi için, RAPD' de kullanılacak DNA miktarının optimize edilmesi gerekebilir. Genomik DNA' nın çok fazla olması jelde “smear” yapıların oluşmasına veya temiz ve belirgin bantların yokluğuna sebep olabilir (Williams et. al., 1990a). Meydana gelen bu “smear” yapı genomik DNA' nın konsantrasyonunun azaltılmasıyla giderilebilir (Williams et. al., 1990b). Ancak genomik DNA çok az olduğunda ise tekrarlanamayan modeller oluşur (Williams et. al., 1990a).

Yapılan çalışmada DNA konsantrasyonu 50-100 ng değerleri arasında test edildi ve yapılan optimizasyonlar sonucunda 75 ng DNA konsantrasyonunun en iyi amplifikasyonun sonucunu verdiği belirlendi.

5.3.1.2. Primer Konsantrasyonu

0,1-0,5 μ M arasındaki primer konsantrasyonları genellikle optimumdur. Daha yüksek primer konsantrasyonları yanlış bağlanmalara ve özgün olmayan ürünlerin oluşmasına sebep olabilir ve primer-dimer oluşumu şansını artırır. Bu özgün olmayan ürünler ve primer-dimer oluşumları da enzim için birer substrat olduklarından, arzu edilen ürünle rekabete girerek elde edilen ürün veriminin düşük olmasına sebep olurlar (Innis and Gelfand, 1990). Daha düşük konsantrasyonlarda ise agaroz jelde amplifikasyon ürünlerinin tespit edilmesi zorlaşır (Williams et. al., 1990a).

Yapılan bu çalışmada çeşitli primer konsantrasyonları denendi ve bunların sonucunda en iyi amplifikasyonun, primer konsantrasyonu 50 ng olduğunda elde edildiği görüldü.

5.3.1.3. dNTP Konsantrasyonu

Genellikle 20-200 μ M arasındaki dNTP konsantrasyonları verim ve özgünlük açısından optimal dengeyle sonuçlanır (Innis and Gelfand, 1990). Bu konsantrasyonlarda yaklaşık 6,5-25 μ g DNA sentezlenebilir (Saiki, 1990). Yanlış eşleşmelerden doğacak hataları en aza indirmek için dNTP'lerin her biri (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) eşit olacak şekilde dengelenmelidir. Düşük dNTP konsantrasyonları hedef olmayan bölgelerdeki yanlış bağlanmaları en aza indirir ve yanlış nükleotid bağlanmasını azaltır (Innis et. al., 1988). Kişi hedef dizinin kompozisyonuna ve uzunluğuna bağlı olarak uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonunu belirlemelidir, örneğin 100 μ l'lik reaksiyon içine her bir dNTP' den 20 μ M konulması, teorik olarak 2,6 μ g'lık DNA'nın sentezi için yeterlidir (Innis and Gelfand, 1990). Yapılan bu çalışmada ise en yüksek amplifikasyon verimi dNTP'lerden her birinin 5 mM kullanılması sonucu elde edildi.

5.3.1.4. MgCl₂ Konsantrasyonu

Diğer bileşenlerde olduğu gibi, tekrarlanabilir RAPD ürünleri elde edebilmek için magnezyum iyon konsantrasyonunun da optimize edilmesi gerekir (Williams et. al., 1990a). Magnezyum konsantrasyonu; primer bağlanmasını, hem kalıbın hem de PCR ürünlerinin zincirlerinin denatürasyon ısını, ürün özgünlüğünü, primer-dimer oluşumlarını ve enzim aktivitesini etkileyebilir. Taq DNA polimeraz, kalıp DNA, primer ve dNTP ile olan bağın tepesinde serbest magnezyuma ihtiyaç duyar. Buna bağlı olarak tüm amplifikasyon reaksiyonları 0,5-2,5 mM magnezyum içermelidir (Innis and Gelfand, 1990).

Yapılan çalışmada en iyi amplifikasyon şartlarının elde edilebilmesi için MgCl₂' ün çeşitli konsantrasyonları (1.5, 2, 3 ve 4 mM) denendi ve magnezyum konsantrasyonu 2mM olduğunda en yüksek verimin elde edildiği görüldü.

5.3.1.5. Tampon Konsantrasyonu

PCR reaksiyonları için tavsiye edilen tampon genellikle 20°C' de ölçüldüğünde 10-50 mM Tris-HCl' dir (pH=8,3-8,8). Tris; dipolar iyonik bir tampondur ve PCR döngü şartları boyunca 20°C' deki gerçek pH değeri 7,8 ile 6,8 arasında değişir (Innis and Gelfand, 1990).

Yaygın olarak tavsiye edilen tampon konsantrasyonuna benzer şekilde bu çalışmada da 10 mM Tris-HCl (25°C' de pH=8,8), 50 mM KCL ve %0,01 Nonidet P40 içeren 10X PCR tamponunu kullanıldı ve başarılı amplifikasyon sonuçları elde edildi.

5.3.1.6. Enzim Konsantrasyonu

Daha önceki yıllarda PCR reaksiyonlarında *Escherichia coli*' den izole edilen ve ısıya duyarlı olan DNA polimeraz I (Klenow parçası) kullanılmaktaydı.

DNA' nın yeni sentez edilmiş zincirlerini birbirinden ayırmak için gerekli olan denatürasyon basamağındaki sıcaklık yüzünden her döngü sırasında yeniden taze enzim eklenmesi gerekmektedir. Ancak bugün ısıya duyarlı olan Klenow parçası yerine termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*' tan izole edilen ve 90-95°C' lere dayanabilen Taq DNA polimerazın kullanılması bu güçlüğü ortadan kaldırmıştır (Gelfand, 1989). Bu ısıya dayanıklı polimeraz denatürasyon basamağından etkilenmediğinden her döngüde yenilenmesi gerekmemektedir. Bu düzeltme sadece yöntemi kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda da özgünlük, verim ve duyarlılık sağlamak ve amplifiye edilen ürünlerin boyunu arttırmak yoluyla da reaksiyonun genel performansını yükseltir (Saiki et. al., 1988). Ancak yine de başarılı bir amplifikasyon için, her yeni uygulamada, diğer bileşenlerde olduğu gibi, Taq polimeraz enziminin de optimize edilmesi gerekir. Taq DNA polimerazın optimal konsantrasyonu yaklaşık 2ü/100 µl' dir. Genel bir kural olarak, 4 ünitenin üzerindeki konsantrasyonlar özgün olmayan ürünlerin sentezi ile sonuçlanır. 1 ünitenin altındaki konsantrasyonlar ise arzu edilen ürünün verimini düşürür (Saiki, 1990).

Bu çalışmada 0,5 ü/µl Taq DNA polimeraz kullanıldı ve enzim, yarı ömrünü uzatmak amacıyla, ilk denatürasyon basamağından sonra eklendi. Yürütülen amplifikasyon reaksiyonları sonucunda bu enzim konsantrasyonunun da başarılı bir amplifikasyon için yeterli olduğunu belirlendi.

5.3.2. RAPD Koşullarının Optimizasyonu

RAPD, örneklerin amplifikasyon döngüsündeki üç basamağı (denatürasyon, primer bağlanması ve primer uzaması) temsil eden üç farklı sıcaklıklarda reaksiyona sokulmasıyla yürütülür (Saiki, 1990). Reaksiyon bileşenlerinin yanı sıra bu basamakların her birinin ve ayrıca toplam döngü sayısının optimizasyonu da başarılı bir amplifikasyon için gereklidir.

5.3.2.1. Denatürasyon Zamanı ve Sıcaklığı

Amplifikasyon reaksiyonlarında görülen en büyük başarısızlık sebebi kalıp DNA' nın ve/veya PCR ürünlerinin denatürasyonlarının tamamlanmamasıdır. Tamamlanmamış denatürasyon, DNA zincirlerinin yeniden kapanmasına ve böylece de ürün veriminin düşük olmasına sebep olur. Bunun tersi olarak, çok yüksek ve/veya çok uzun olan denatürasyon basamakları da enzim aktivitesinin gereksiz yere kaybına sebep olur. Tipik denatürasyon şartları 95°C' de 30 saniye veya 97°C' de 15 saniyedir, bununla beraber daha yüksek sıcaklıklar özellikle G+C içeriği zengin olan hedef diziler için uygun olabilir (Innis and Gelfand, 1990).

5.3.2.2. Primer Bağlanması

Primer bağlanması için gerekli olan sıcaklık ve zaman uzunluğu; primerin baz kompozisyonuna ve uzunluğuna bağlıdır. Uygulanan bağlanma sıcaklıkları genellikle amplifikasyon primerlerinin gerçek T_m değerlerinin 5°C altıdır. 55-72°C arasındaki bağlanma sıcaklıkları genellikle en iyi sonuçları verir. Tipik primer konsantrasyonlarında (0,2 μ M) bağlanma sadece birkaç saniye sürer. Bağlanma sıcaklığının artırılması yanlış bağlanan primerlerin ayrılmasını artırır ve primerin 3' ucuna yanlış nükleotidlerin bağlanmasını indirger (Innis and Gelfand, 1990).

5.3.2.3. Primer Uzaması

Uzama süresi hedef dizinin uzunluğuna ve konsantrasyonuna bağlıdır. Geleneksel olarak 72°C' de 1 dakikalık uzama süresi 2 kb uzunluğa kadar olan ürünlerde yeterlidir. Bununla beraber, başlangıçtaki döngülerde eğer substrat konsantrasyonu çok düşükse ve eğer son döngülerde ürün konsantrasyonu enzim konsantrasyonundan fazlaysa, daha uzun bağlanma zamanları uygulanabilir (Innis and Gelfand, 1990).

5.3.2.4. Döngü Sayısı

Optimum döngü sayısı, diğer parametreler optimize edildiğinde, başlangıçtaki hedef DNA' nın konsantrasyonuna bağlıdır. Çok fazla döngünün yapılması genel bir hatadır çünkü çok fazla döngü özgün olmayan ürünlerin miktarını arttırabilir. Tabi ki çok az döngü sayısı da çok az ürün verecektir (Innis and Gelfand, 1990).

Bu çalışmada, arpa genomik DNA' sı 34 döngü boyunca 94°C' de 30 saniyelik denatürasyon basamağına tabi tutuldu. Daha sonra 35°C' de 1 dakikalık primer bağlanma basamağını takiben 72°C' deki 1 dakika 45 saniye süren primer uzama reaksiyonlarını yürütüldü. En son basamakta tamamlanmamış polimerizasyonların tamamlanmasını sağlamak amacıyla örnekler 72°C' de 8 dakika bekletildi ve tüm bu döngüler sonucunda farklı bant modelleri ortaya koyan polimorfizmler elde edildi.

5.4. Uygun Elektroforez Yönteminin Seçilmesi

Farklı fakat eşit uzunluktaki DNA parçalarındaki dizi çeşitliliğinin belirlenmesinde pek çok farklı metod tarif edilmiştir. Bunların arasında denatüre edici jel elektroforezi (DGGE=Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; Fischer et. al., 1983), sıcaklık derece jel elektroforezi (TGGE=Temperature Gradient Gel Electrophoresis; Rosenbaum and Riesner, 1987) ve tek zincirli konformasyonel polimorfizm (SSCP=Single-Strand Conformational Polymorphisms; Orita et. al., 1989) sayılabilir. Bütün bu metodlar uygun elektroforetik koşulların belirlenmesi için poliakrilamid jele ve özel donanım ihtiyacı duyar ve ön deneyleri gerektirir. Ayrıca bu metodlarda kısmen küçük DNA parçaları (500 baz çiftine kadar) ayrılabilir. Ancak daha sonraki yıllarda agaroz jeli kullanan, özel bir donanım ihtiyacı duymayan ve daha büyük DNA parçalarının ayrılmasına olanak tanıyan basit ve hızlı bir metod olan agaroz jel elektroforez yönteminin geliştirilmesi DNA dizi çeşitliliğinin belirlenmesini büyük oranda kolaylaştırmıştır (Wawer et. al., 1995). Bu yöntemde elektroforez; polietilen glikol (PEG) 6000' in uzun zincirlerine kovalent bağlanan DNA ligand bisbenzimidid içeren agaroz jellerde yapılır (Müller et. al.,

1981). Agaroz jellerin hazırlanmasındaki kolaylığın yanında, ayrıca işaretleme ve jelden DNA' nın izole edilmesi de, poliakrilamid jellere göre daha basittir. Elektroforez süresinin genişletilmesiyle daha da iyi bir ayırma sağlanabilir (Wawer et. al., 1995).

Kuraklığa hassas ve dirençli genotiplerdeki arpa bireyleri arasındaki polimorfizmlerin belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışmada özel bir donanım veya ön deneylere ihtiyaç duymayan ve oldukça basit olan agaroz jel elektroforezi kullanılarak başarılı sonuçlar elde edildi.

5.5. RAPD Markır Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada kuraklığa dirençli ve hassas genotiplerdeki bireyleri içeren arpa ailesinin (*Hordeum vulgare L.*) RAPD markırları aracılığıyla döl analizlerinin çıkarılması ve kuraklığa hassas ve dirençli genotipler arasındaki genetik polimorfizmlerin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla uzunlukları 10-19 baz arasında değişen 28 farklı oligonükleotid primer kullanıldı. Ancak kullanılan bu 28 primerin 20 tanesi ile (A-5, A-17, A-18, BC-302, E-3, F-13, G-2, K-8, K-10, K-15, O-02, OPA-1, OPC-15, OPC-19, OPE-10, P-394, PRA-1, PRA-2, R-1 ve S-34) yapılan amplifikasyon reaksiyonlarının, elektroforez analizi sonucunda ürün vermediği görüldü. Bunun sebebinin, nükleotid dizisi rastgele seçilmiş olan bu primerlerin kalıp DNA' da tamamlayıcısı oldukları herhangi bir bölgenin bulunmaması olduğu düşünülmektedir.

Her bir bireyin ayırdilmesini sağlayan heteromorfik bantlar veren diğer 8 primerle (A-9, B-374, O-10, O-19, OD-8, OPC-6, PRA-3 ve UBC-237) uzunlukları yaklaşık 250-5000 baz çifti arasında değişen toplam 109 adet amplifikasyon ürünü elde edildi. Daha önceden yapılan çalışmalar da çeşitli bitki türlerinde homomorfik ve heteromorfik bantların oluşabileceğini göstermiştir (Koller et. al., 1993; Mori et. al., 1993). Yüksek oranda homomorfik bantlar bireylerin birbirlerine benzerliklerini, heteromorfik bantlar ise bireyler arasındaki polimorfizmleri tayin etmede kullanılabilir (Caetano-Anollés et. al., 1991a).

Amplifikasyon ürünü veren 8 primerin ortaya koyduğu bantlar incelenirken özellikle kuraklıkla ilgili olabilecek bantların varlığı araştırıldı. Bu araştırma sırasında aranılan özellik; sadece kuraklığa dirençli ebeveynde, F_1 ' de ve kuraklığa dirençli F_2 ' lerde gözlenen ya da bunun tam tersi olarak sadece kuraklığa hassas ebeveynde, F_1 ' de ve kuraklığa hassas F_2 ' lerde gözlenen bir bantın varlığıydı. Çünkü dirençli özellik gösteren bireylerde böyle bir bantın varlığı, bu bantın kuraklığa direncin sağlanması ile ilgili olabileceğinin, hassas özellik gösteren bireylerde böyle bir bantın varlığı ise bu bantın kuraklığa hassasiyete sebep olabileceğinin bir göstergesi olabilir. Yaptığımız çalışmada bu tarife uygun olan üç farklı markır bulundu. Bunlardan ilki GC içeriği %60 olan, 10 baz uzunluğundaki B-374 primeri (5'-GGT CAA CCC T-3') ile elde edilen ve yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki 3. markırdır (Şekil 4.6, Çizelge 4.6). Hassas ebeveynde, F_1 ' de ve kuraklığa hassas olan yedi F_2 bireyinin dördünde (F_{218} , F_{219} , F_{221} ve F_{227}) bulunan, kuraklığa dirençli bireylerin ise hiçbirinde bulunmayan bu markırın kuraklıkla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Benzer özellik gösteren ikinci markır, GC içeriği yine %60 olan, 10 baz uzunluğundaki PRA-3 primeri (5'-CCA TCG CCG T-3') ile elde edilen 5. markırdır (Şekil 4.3, Çizelge 4.3). Hassas ebeveynde, F_1 ' de ve kuraklığa hassas olan iki F_2 bireyinde (F_{219} ve F_{240}) gözlenen bu markırın da kuraklıkla ilgili olduğu düşünülebilir. Ancak kuraklığa dirençli bireylerde bulunmamasına rağmen, kuraklığa hassas olan yedi F_2 bireyinden sadece iki tanesinde bulunması bu markırın kuraklıkla ilgili olabilme olasılığını azaltmaktadır. Aynı şekilde GC içeriği %70 olan 10 nükleotidlik A-9 primeri (5'-GGG TAA CGC C-3') ile yapılan amplifikasyon sonucu sadece hassas ebeveynde, F_1 ' de ve kuraklığa hassas olan F_{221} bireyinde bulunan bir markırın daha varlığı (3. markır) belirlendi (Şekil 4.7, Çizelge 4.7). Ancak bu markırın da kuraklıkla ilgili olabilme olasılığı, sadece bir F_2 bitkisinde bulunduğundan, düşüktür.

Bunların dışında nükleotid dizisi 5'-TCA GAG CGC C-3' olan O-10 primeri ile yapılan amplifikasyonlar sonucunda dirençli ebeveynde, F_1 ' de ve kuraklığa dirençli olan altı F_2 bireyinde (F_{242} , F_{245} , F_{254} , F_{272} , F_{273} ve F_{276}) bulunan bir markır elde edilmiştir (11. markır, Şekil 4.5, Çizelge 4.5). Ancak bu markır kuraklığa

hassas olan üç F_2 bitkisinde daha (F_{219} , F_{227} ve F_{240}) bulunmaktadır, bu da markırın kuraklıkla ilgili olma olasılığını azaltmaktadır. Buna benzer şekilde A-9 primeri ile elde edilen 7. markır dirençli ebeveynde, F_1 ' de ve kuraklığa dirençli olan dört F_2 bireyinde (F_{242} , F_{245} , F_{254} ve F_{273}) bulunmaktadır (Şekil 4.7, Çizelge 4.7). Bu markırın kuraklığa hassas olan F_2 bireylerinde de (F_{218} , F_{219} , F_{227} , F_{231} ve F_{265}) bulunması, bunun kuraklıkla ilgili olma olasılığını azaltmaktadır.

Amplifikasyonlar sonucunda elde edilen ve kuraklıkla ilgili olabilecek bir diğer markır PRA-3 primeri ile elde edilen 7. markırdır (Şekil 4.3, Çizelge 4.3). Bu markır hassas ebeveynde ve kuraklığa hassas olan üç F_2 bireyinde (F_{218} , F_{219} ve F_{240}) görülmektedir. Ancak bu markırın F_1 bireyinde bulunmaması, markırın kuraklıkla ilişkili olma ihtimalini azaltan bir etkidir.

Yapılan amplifikasyonlar sonucunda elde edilen ve kuraklıkla ilgili olabileceği düşünülen markırların dışında, F_1 ve F_2 ' lerde bulunurken ebeveynlerin ikisinde de bulunmayan (örneğin OPC-6 primeri, 1. markır), ebeveynlerde ve F_1 ' de gözlenmezken sadece bazı F_2 bireylerinde gözlenen (örneğin OPC-6 primeri, 9. markır) veya sadece F_1 bireyinde bulunurken diğer bireylerin hiçbirinde bulunmayan (örneğin O-19 primeri, 4. markır) bazı bantların da varlığı belirlenmiştir. Bu "non-parental" bantların sebebi yeni bağlanma bölgelerinin oluşması, mutasyon sonucunda meydana gelen nükleotid dizisi değişimleri veya RAPD' in doğasından kaynaklanan hatalar olabilir.

5.6. Arpa Bireyleri Arasındaki Polimorfizm Oranlarının Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada diploid, kendine döllen ve oldukça basit bir genoma sahip olan arpa (*Hordeum vulgare* L.) ailesine ait kuraklığa hassas ve dirençli genotiplerdeki bireyler arasındaki farklılıkların genetik düzeyde belirlenmesi amacıyla bunlar arasındaki polimorfizm değerleri belirlenmiştir. Bunun için ilk önce F_2 bireylerinin ebeveynlerle olan benzerlikleri, daha sonra da F_2 bireylerinin kendi aralarındaki benzerlikleri hesaplanmıştır. Arpa ebeveynleri ile bunlara ait benzerlik

oranları ve oluşturulan dendogram sonuçları Çizelge 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13' te sunulmuştur.

Bu sonuçlara göre dirençli ebeveyn (Tokak) ile F_2 bireylerinin ilişkisi incelendiğinde benzerlik oranının 0,366 (Tokak- F_{240}) ile 0,626 (Tokak- F_{219}) arasında değiştiği görülmektedir. Bu ebeveyne en çok benzeyen birey olan F_{219} ' un kuraklığa hassas olması ilginç bir sonuçtur. Aynı şekilde F_{218} (hassas) bireyi de dirençli ebeveyne çok yüksek düzeyde benzerlik göstermiştir (0,617). Dirençli bireyler içinde Tokak' a en az benzeyenlerin F_{273} (0,379) ve F_{276} (0,381) olduğu belirlenmiştir.

Hassas ebeveyn (5819) ile F_2 bireylerinin ilişkisi incelendiğinde ise benzerlik oranının 0,309 (5819- F_{254}) ile 0,545 (5819- F_{219}) arasında değiştiği ve diğer ebeveyne paralellik gösterdiği görülmektedir. Tokak' a da en çok benzeyen birey olan F_{219} ' un 5819' a olan benzerlik oranının diğerinden düşük olması yine ilginç bir sonuçtur. Kuraklığa hassas olan bireyler içinde 5819' a en az benzeyenlerin F_{240} (0,362) ve F_{265} (0,367) bireyleri olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlarla ilgili en dikkat çekici özellik her iki ebeveyne de F_2 ' lerin benzerlik oranlarının son derece yakın olmasıdır. Aslında araştırmada ebeveyn olarak kullanılan arpa çeşitleri birbirinden farklıdır. Bununla beraber bunların aynı familya ve türe ait çeşitler olması nedeniyle köken olarak yakın bireyler olduğu da bir gerçektir. Her ne kadar ebeveynlerin kuraklığa dayanıklılıkları farklı ise de aslında arpa genomu göz önüne alındığında dayanıklılıktan sorumlu gen bölgeleri genomda küçük bir bölgeyi kapsar, diğer DNA bölgeleri ise her iki ebeveynde de büyük bir benzerlik gösterir. Dolayısıyla nükleotid dizisi rastgele seçilmiş primerlerle yapılan RAPD analizleri sonucunda her iki ebeveyne eşit oranda benzer F_2 bantlarının bulunması (F_{219} ' da olduğu gibi) değerlendirmeye alınan bant bölgelerinde ebeveynlerin benzer olduğunun ve iki bireyin kuraklık geni dışındaki bölgelerde birbirine çok yakın olduğunun bir göstergesidir.

F₂ bireyleri birbirleriyle karşılaştırıldığında ise 0,716 benzerlik oranı ile F₂18 ve F₂19 birbirine en yakın bulunurken, 0,380 oranı ile F₂21 ve F₂76 en uzak kombinasyonları oluşturmuştur. Kuraklığa hassas bireyler içinde birbirine en az benzeyenler ise F₂21 ve F₂40 (0,434) bireyleridir. Dirençli bireyler arasında birbirine en çok benzeyenler F₂42 ve F₂72 (0,671) bireyleri, birbirine en az benzeyen dirençli bireyler ise 0,434' lük benzeme oranıyla F₂56 ve F₂73 bireyleridir.

İlişkiler dendogram düzeyinde gözönüne alındığında her F₂ bireyinin birbirine ve ebeveynlere olan uzaklıkları benzerlik oranlarına paralel olarak dağılım göstermiştir (Çizelge 4.12 ve 4.13). Dendogramlar incelendiğinde 5819-F₂' lerin ve Tokak- F₂' lerin dağılımlarının iki ana grup altında toplandığı görülmektedir. Bu iki ana grup da kendi içersinde alt dallara ayrılmaktadır. Buna göre herbir ana çeşit ve bunlara ait 3 F₂ bireyi (F₂18, F₂19 ve F₂21) bir grupta toplanırken, diğer 11 F₂ bireyi ikinci grupta toplanmaktadır. F₂' lere ait ikili grup oluşturan F₂18-F₂19, F₂27-F₂40 ve F₂56-F₂65 benzerlik oranlarında olduğu gibi, dendogram düzeyinde de yakın ilişkili bulunmuştur. Bununla beraber F₂31-F₂45, F₂42-F₂72 ve F₂73-F₂76 grupları birbirlerine nispeten daha düşük benzerlikte dallanmalar göstermişlerdir.

Genetik yapının F₂ generasyonunda daha homozigot yapıya dönüştüğü bilinmektedir. F₂ bireylerinin ebeveynlere olan yakınlıkları, melezleme esnasında mayozda meydana gelen "krossing-over"da anne ve babaya ait bir çok bölgenin hibritlerde korunmuş olduğunu göstermektedir. Ayrıca elde edilen bu sonuçlar RAPD analizlerinin doğru yürütüldüğünün de bir kanıtıdır. Çünkü kuraklığa dayanıklılıktan sorumlu genler genomda küçük bir bölgeyi kapladığından, daha spesifik uygulamalara gidilmedikçe (Bulk ayrılma analizleri gibi) RAPD tekniği ile bu bölgelerin yakalanması ve buna göre aynı kökene sahip bireyler arasındaki farklılıkların belirlenmesi beklenmeyecek bir sonuçtur. Bu durumda araştırmada elde edilen sonuçlarda olduğu gibi, F₂' lerin ebeveynlere ve birbirlerine yakın benzerlik göstermesi beklenen bir sonuçtur.

Yapılan benzer bir çalışmada (Özden, 2000) buğday (*Triticum aestivum* L.) ailesine ait F₂ bireyleri ile ebeveynler arasındaki ve F₂' lerin kendi aralarındaki benzerlik oranları, bu çalışmada elde edilen sonuçlardan daha yüksek çıkmıştır.

Hekzaploid ekmeklik buğdayın ($2n=42$) kromozom sayısı diploid arpalara nazaran ($2n=14$) 3 kat daha büyüktür. Taranan genom büyüklüğünün artması, primerin ebeveyn ve F_2 ' lerde benzer olan bölgeleri yakalama şansını da arttırmaktadır. Dolayısıyla buğday F_2 ' lerinde mayoz esnasında korunan bölgelerin oranı arpalarinkine nazaran artmıştır. Buna bağlı olarak da buğdaydaki benzerlik oranları artmaktadır. Arpada ise kromozom sayısının az olması nedeniyle primerin benzer bölgeleri yakalama şansı, dolayısıyla da bireyler arasındaki benzerlik oranları azalmaktadır. Her iki çalışmada elde edilen sonuçların bu açıklamaları doğrular nitelikte olması, tekniğin uygulamadaki güvenilirliğinin bir göstergesidir.

6. SONUÇLAR

Arpa genç yapraklarından Lodhi ve ark. (1994) tarafından önerilen yöntemle göre genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen genomik DNA' ların U.V. spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılarak miktarları ve saflık dereceleri kontrol edildi. Bu ölçümler sonucunda yeterli miktarda ve saflıkta olduğu belirlenen genomik DNA' lar kullanılarak RAPD analizleri gerçekleştirildi.

Kuraklığa hassas ve dirençli genotipler arasındaki polimorfizmlerin belirlenmesi ve döl analizinin çıkarılması amacıyla yapılan RAPD analizlerinde nükleotid dizileri rastgele olarak seçilmiş 28 farklı oligonükleotid primer kullanıldı. Bunlardan 20 tanesi ile yapılan amplifikasyonlar sonucunda ürün elde edilemedi. Diğer 8 primerle yapılan amplifikasyonlar ise uzunlukları yaklaşık 250-5000 baz çifti arasında değişen, toplam 109 farklı amplifikasyon ürünü ile sonuçlandı. Elde edilen bu markırlardan bazılarının kuraklıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir (özellikle B-374 primeri ile elde edilen, yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki markır). Ayrıca elde edilen markırlar değerlendirilerek bireyler arasındaki polimorfizm oranları da hesaplandı ve buna göre F₂ bireylerinin genel olarak dirençli ebeveyne daha çok benzerlik gösterdiği, kuraklığa hassas olan bireylerin de, kuraklığa dirençli olanlara göre, birbirlerine daha çok benzerlik gösterdikleri belirlendi.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, özellikle kuraklıklığa direncin sağlanması ve dolayısıyla da kuraklığa dirençli bitkilerin yetiştirilmesi ile ilgili moleküler ve biyoteknolojik çalışmalara katkılar sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. ALBAYRAK, (ÇOBANOĞLU) G., KARAER, S., TOPOHAN, G., GEMİCİ, B., CAN, Ö ve GÖZÜKIRMIZI, N., RAPD markırları ile DNA parmakizi çıkarılması. Tarla Bitkileri Bilimi Derneği E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bölümü, TÜBİTAK-MAM, İ.Ü. Biyogem ve TÜBİTAK. “Biyoteknoloji ve Bitki Islahı” Bildiriler. Can Ofset, Bornova, İzmir. 157-162, 17-19 Nisan 1995.
2. ALTINKUT, A., İPEKÇİ, Z., TÜRET, M. ve GÖZÜKIRMIZI, N., Arpa ve Buğdayda Kuraklığa Dirençli Genotiplerin Fizyolojik ve Genetik Parametrelerle Seçilmesi. XIV. Ulusal Biyoloji Kongresi, Samsun. Cilt: 2, 64-74, 7-10 Eylül 1998.
3. ARI, Ş., BİLGİN, G., ÇOBANOĞLU, G., GÜREL, F. ve GÖZÜKIRMIZI, N., Arpa Melezlerinin Moleküler Markır Yöntemleriyle Tanımlanması. Tarla Bitkileri Kongresi, Bitki Islahı Bildirileri. E.Ü. Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi. Bornova, İzmir. Cilt: 2, 89-92, 25-29 Nisan 1994.
4. ARMOUR, J.A.L., WONG, Z., WILSON, V., ROYLE, N.J. and JEFFREYS, A.J., Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeat elements. Nucleic Acids Research. Vol: 17, 4925-4935, 1989.
5. ATANASSOV, A., TODOROVSKA, E., TRIFONOVA, A., MARINOVA, E. and PETROVA, M., Workshop Biyoteknoloji ve Bitki Islahı:DNA polymorphisms in barley somaclonal variants. Tarla Bitkileri Bilimi Derneği E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bölümü, TÜBİTAK-MAM, İ.Ü. Biyogem VE TÜBİTAK. “Biyoteknoloji ve Bitki Islahı” Bildiriler. Can Ofset, Bornova, İzmir. 126-137, 17-19 Nisan 1995.
6. AYLIFFE, A.A., LAWRENCE, G.J., ELLIS, J.G. and PRYOR, A.J., Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. Nucleic Acids Res. Vol: 22, 1632-1636, 1994.

7. BECKMANN, J.S. and SOLLER, M., Restriction fragment length polymorphism and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica*. Vol: 35, 11-14, 1986.
8. BIDOCHKA, M.J., McDONALD, M.A., St. LEGER, R.J. and ROBERTS, D.W., Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* Vol: 25, 107-113, 1994.
9. BLAKE, T.K., RFLP analysis in barley: Making the technology accessible. *Agric. Can. Biocrop Network RFLP Workshop*. Manitoba, Canada, p4 (abstr), 1990.
10. BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SCOLNICK, M. and DAVIS, R.W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* Vol: 32, 314-331, 1980.
11. BUGAWAN, T.L., SAIKI, R.K., LEVENSON, C.H., WATSON, R.W. and ERLICH, H.A., The use of non-radioactive oligonucleotide probes to analyse enzymatically amplified DNA for prenatal diagnosis and forensic HLA typing. *Bio/Technology*. Vol: 6, 943-947, 1988.
12. CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J. and GRESSHOFF, P.M., DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* Vol: 9(4), 294-307, 1991a.
13. CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J. and GRESSHOFF, P.M., DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*. Vol: 9, 553-557, 1991b.
14. CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J. and GRESSHOFF, P.M., Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol. Gen. Genet.* Vol: 235, 157-165, 1992.

15. CHEN, F.O., PREHN, D., HAYES, P.M., MULROONEY, D., COREY, A. and VIVAR, H., Mapping genes for resistance to barley stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*). Theor. Appl. Genet. Vol: 88, 215-219, 1994.
16. CORNALL, R.J., AITMAN, T.J., HEARNE, C.M. and TODD, J.A., The generation of a library of PCR-analysed microsatellite variants for genetic mapping of the mouse genome. Genomics. Vol: 10, 874-881, 1991.
17. ÇOBANOĞLU, G., GÜREL, F., ARI, Ş., ARICAN, E. ve GÖZÜKIRMIZI, N., Arpa Germplazmalarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması. Tarla Bitkileri Kongresi, Bitki Islahı Bildirileri. E.Ü. Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi. Bornova, İzmir. Cilt: 2, 93-98, 25-29 Nisan 1994.
18. DEHMER, K.J., GRANER, A. and WENZEL, G., Screening by PCR for defined DNA sequences in minimal amounts of Barley tissue. Plant Breeding. Vol:107, 70-72, 1991.
19. DEMİR, İ., Tarla Islahı Ders Kitabı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 235. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi Bornova. Sayfa 120-141, 1983.
20. DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L., Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. Vol: 12, 13-15, 1990.
21. DWEIKAT, I., MACKENZIE, S., LEVY, M. and OHM, H., Pedigree assesment using RAPD-DGGE in cereal crop species. Theor. Appl. Genet. Vol: 85, 497-505, 1993.
22. ELLSWORTH, D.L., RITTENHOUSE, K.D. and HONEYCUTT, R.L., Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechniques. Vol: 14(2), 214-218, 1993.

23. ERLICH, H.A., (ed.). PCR Technology, Principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press. New York, London, Tokyo, Melbourne, Hong Kong, 1989.
24. FANG, G., HAMMER, S. and REBECCA, R., A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. BioTechniques. Vol: 13, 52-56, 1992.
25. FISCHER, S.G. and LERMAN, L.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol: 80, 1579-1583, 1983.
26. FRITSCH, P. ve RIESEBERG, L.H., The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Conservation Genetics in: Smith T.B., Wayne R.K.(Ed.). Molecular Genetic Approaches in Conservation, Oxford University Press, 1996.
27. GELFAND, D.H., Taq DNA polymerase. In: PCR technology: principles and applications for DNA polymerase (ed. H.A. Erlich). p: 17-22. Stockton, New York, 1989.
28. GOLENBERG, E.M., GIANNASI, D.E., CLOGG, M.T., SMILEY, C.J., DURBIN, M., HENDERSON, D. and ZURAVSKI, G., Chloroplast DNA sequence from a miocene *Maglania* species. Nature. Vol: 344, 656-658, 1990.
29. GÖZÜKIRMIZI, N., ARI, Ş., GÜREL, F., ÇOBANOĞLU, G., RÜSTEMOVA, P., BİLGEN, G., CAN, Ö. ve EKİZ, H., *Hordeum* (Arpa)'da genetik stabilite, germplazm örneklerinde polimorfizm ve genetik haritalama için RAPD yöntemi ile parmakizi çalışmaları ve arpa ıslahına etkileri. Tarla Bitkileri Bilimi Derneği E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bölümü, TÜBİTAK-MAM, İ.Ü. Biyogem ve TÜBİTAK. "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildiriler. Can Ofset, Bornova, İzmir. 149-156, 17-19 Nisan 1995.

30. GRANER, A., JAHOOOR, A., SCHONDELMAIER, J., SIEDLER, H., PILLEN, K., FISCHBECK, G., WENZEL, G. and HERRMANN, G., Construction of an RFLP map of barley. Theor. Appl. Genet. Vol: 83, 250-256, 1991.
31. GRANER, A. and BAUER, E., RFLP mapping of the *ym4* virus resistance gene in barley. Theor. Appl. Genet. Vol: 86, 689-693, 1993.
32. GRANER, A., LUDWIG, W.F. and MELCHINGER, E., Relationships among European barley germplasms: II. Comparision of RFLP and pedigree data. Crop Science. Vol: 34, 1199-1205, 1994.
33. GUILLEMAUT, P. and MARÉCHAL-DROUARD, L., Isolation of Plant DNA: A Fast, Inexpensive, and Reliable Method. Plant Molecular Biology Reporter. Vol: 10(1), 60-65, 1992.
34. GÜREL, A.F., Arpa' da Çeşitliliğin Moleküler Düzeyde Tanımlanması. Master tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34459, Vezneciler, İstanbul, 1993.
35. GÜREL, F., ARI, Ş. ve GÖZÜKIRMIZI, N., Identification of Variation In Barley At The Molecular Level. XV: International Botanical Congress. P: 142-152. Yokohama-Japan, 28 Ağustos-3 Eylül 1993.
36. HADRYIS, H., BALICK, M. and SCHIERWATER, B., Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. Vol:1, 55-63, 1993.
37. HAGELBERG, E., GRAY, I.C. and JEFFREYS, A.J., Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. Nature. Vol: 352, 427-429, 1991.
38. HALLDÉN, C., HANSEN, M., NILSSON, N-O., HJERDIN, A. and SALL, T., Competition as a source of errors in RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. Vol: 93, 1085-1092, 1996.

39. HALLDÉN, C., SALL, T., OLSSON, K., NILSSON, N.-O. and HJERDIN, A.,
The use of bulked segregant analysis to accumulate RAPD markers near a locus
for beet cyst nematode resistance in *Beta vulgaris*. Plant Breed. Vol: 116, 18-22,
1997.
40. HAMILL, J.D., ROUNSLEY, S., SPENCER, A., TODD, G. and RHODES,
M.J.C., The use of polymerase chain reaction in plant transformation studies.
Plant Cell Reports. Vol: 10, 221-224, 1991.
41. HANSEN, M., HALLDÉN, C., NILSSON, N.-O. and SALL, T., Marker assisted
selection of restored male-fertile *Brassica napus* plants using a set of dominant
RAPD markers. Mol. Breed. Vol:3, 449-456, 1997.
42. HANSEN, M., HALLDÉN, C. and TORBJÖRN, S., Error rates and
polymorphisms frequencies for three RAPD protocols. Plant Mol. Biology
Reporter. Vol: 16, 139-146, 1998.
43. HARTL, L., WEISS, H., ZELLER, F.J. and JAHOOR, A., Use of RFLP markers
for the identification of alleles of the *Pm3* locus conferring powdery resistance in
wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. Vol: 86, 959-963, 1993.
44. HEARNE, C.M., GHOSH, S. and TODD, J.A., Microsatellites for linkage
analysis of genetic traits. Trends Genet. Vml: 8, 288-294, 1992.
45. HEUN, M., Mapping quantitative powdery mildew resistance of barley using a
restriction fragment polymorphism map. Genome. Vol: 35, 1019-1025, 1992.
46. HIGUCHI, R., von BEROLDINGEN, C.H., SENSABAUGH, G.F. and ERLICH,
H.A., DNA typing from single hairs. Nature (London). Vol: 332, 543-546, 1988.
47. HINZE, K., THOMPSON, R.D., RITTER, E., SALAMINI, F. and
SHULZE-LEFERT, P., Restriction fragment length polymorphism-mediated
targeting of the *ml-o* resistance lokus in barley (*Hordeum vulgare*). Proc. Natl.
Acad. Sci. Vol: 88, 3691-3695, 1991.

48. HOFFMANN, W., Ein besonderer Fall intermediärer Vererbung bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.) "Zeitschrift für Pflanzenzüchtung". Band 46. Heft 3, s: 285-291, 1961.
49. HU, J. and QUIROS, C.F., Identification of brokoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Report. Vol: 10, 505-511, 1991.
50. INNIS, M.A., MYAMBO, K.B., GELFAND, D.H. and BROW, M.A.D., DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol: 85, 9436-9440, 1988.
51. INNIS, M.A. and GELFAND, D.H., Optimization of PCRs. In: PCR Protocols. A Guide To Methods and Applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. ve White T.J. (ed.). Academic Press. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1990.
52. JAHOOOR, A., JACOBI, A., SCHULLER, C.M.E. and FISCHBECK, G., Genetical and RFLP studies at the *Mla* locus conferring powdery mildew resistance in barley. Theor. Appl. Genet. Vol: 85, 713-718, 1993.
53. JAMAUX, I., STEINMETZ, A. and BELHASSEN, E., Looking for molecular and physiological markers for osmotic adjustment in sunflower. New Phytol. Vol: 137, 117-127, 1997.
54. JEFFREYS, A.J., WILSON, V. and THEIN, S.L., Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature. Vol: 314, 67-73, 1985a.
55. JEFFREYS, A.J., WILSON, V. and THEIN, S.L., Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature. Vol: 316, 76-79, 1985b.
56. KELLY, J.D., Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. HortScience. Vol: 30 (3), 461-465, 1995.

57. KLEINHOF, A., KILIAN, A., SAGHAI, MAROOF, M.A., BIYASHER, R.M., HAYES, P., CHEN, F.Q. LAPITAN, N.I.V., FEUWICK, A., BLAKE, T.K., KANAZIN, V., ANANIEV, E., DAHLEEN, I., KUDRNA, D., BOLLINGER, J., KNAPP, S., LIN, B., SORRELLS, M., HEUN, M., FRANCKOWIAK, J.D., HOFFMAN, D., SKADSEN, R. and STEFFENSON, B.J., A molecular, isozyme and morphological map of the barley genome. Theor. Appl. Genet. Vol: 86, 705-712, 1993.

58. KOGAN, S.C., DOHERTY, M. and GITSCHIER, J., An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Amplification to hemophilia. A.N. Engl. J. Med. Vol: 317, 985-990, 1987.

59. KOLLER, B., LEHMANN, A., McDERMOTT, J. M. and GESSLER, C., Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. Vol: 85, 901-904, 1993.

60. KÜN, E., Serin İklim Tahılları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1032. Ders Kitabı: 299. S: 157-207, 1988.

61. LI, H.H., GYLLENSTEN, U.B., CUI, X.F., SAIKI, R.K., ERLICK, H.A. and ARNHEIM, N., Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature (London). Vol: 335, 414-417, 1988.

62. LIN, J.-J., KUO, J., MA, J., SAUNDERS, J.A., BEARD, H.S., MacDONALD, M.H., KENWORTHY, W., UDE, G.N. and MATTHEWS, B.F., Identification of Molecular Markers in Soybean Comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA Mapping Techniques. Plant Molecular Biology Reporter. Vol: 14(2), 156-169, 1996.

63. LINC, G., KARSAI, I., MOLNAR-LANG, M. and BEDÖ, Z., Comparison of RFLP probes and RAPD primers for studying genetic diversity in barley (*Hordeum vulgare* L.). Cereal Research Communications. Vol: 24(3), 283-290, 1996.

64. LITT, M. and LUTY, J.A., A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* Vol: 44, 397-401, 1989.
65. LODHI, M.A., YE, G.N., WEEDEN, N.F. and REISCH, B.I., A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species. *Molecular Biology Reporter*. P: 6-13, 1994.
66. 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*. Vol: 38, 786-794, 1995.
67. MA, Z.Q., SORRELLS, M.E. and TANKSLEY, S.D., RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes *Pm1*, *Pm2*, *Pm3* and *Pm4* in wheat. *Genome*. Vol: 37, 871-875, 1994.
68. MAILER, R.J., SCARTH, R and FRISTENSKY, B., Discrimination among cultivars of rapessed (*Brassica napus L.*) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* Vol: 87, 697-704, 1994.
69. MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J., *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York, 1982.
70. MARKERT, C.L. and MOLLER, F., Multiple forms of enzymes: Tissues, ontogenic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol: 45, 753-763, 1959.
71. MELCHIAGER, A.E., GRANER, A., SIGTH, M. and MSSMER, M.M., Relationships among European barley germplasm I Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. *Crop. Sci.* Vol: 34, 1191-1199, 1994.
72. MICHELMORE, R.W., PARAN, I. and KESSELI, R.V., Identification of markers linked to a disease resistance genes by bulk segregant analysis: a rapid

method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol: 88, 9828-9832, 1991.

73. MIZUKAMI, H., OHBAYASHI, K., UMETSU, K. and HRAOKA, N., restriction fragment length polymorphisms of medical plants and crude drugs. II. Analysis of *Glehnia littoralis* of different geographical origin. Biol. Phaim. Bull. Vol: 16, 611-612, 1993a.
74. MIZUKAMI, H., OBHAYASHI, K. and OHASHI, H., *Bupleurum falcatum* L. in northern Kyushu and Yamaguchi prefecture are genetically distinguished from other populations, based on DNA fingerprints. Biol. Pharm. Bull. Vol: 16, 729-731, 1993b.
75. MOORE, G., GALE, M.D., KURATA, N. and FLAVELL, R.B., Molecular Analysis of small grain cereal genomes: current status and prospects. Biotechnology. Vol: 11, 584-589, 1993.
76. MORI, M., HOSAKA, K., UMEMURA, Y. and KANEDA, C., Rapid identification of Japanese Potato cultivars by RAPDs. Jpn. J. Genet. Vol: 68, 167-174, 1993.
77. MULLIS, K.B., FALOONA, F.A., SCHARF, S.J., SAIKI, R.K., HORN, G.T. and ERLICK, H.A., Specific enzymatic amplification pf DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol: 51, 263-273, 1986.
78. MULLIS, K.B. and FALOONA, F.A., Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. Vol: 155, 335-350, 1987.
79. MURRAY, M.G. and THOMPSON, W.F., Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. Vol: 8, 4321-4325, 1980.

80. MÜLLER, W., HATTESOHL, I., SCHUETZ, H.-J. and MEYER, G., Nucleic Acids Res. Vol: 8, 95-119, 1981.
81. NAKAI, R., SHOYAMA, Y. and SHIRAISHI, S., Genetic charecterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis. Biol. Pharm. Bull. Vol: 19, 67-70, 1996.
82. NAKAMURA, Y., LEPPERT, M., O'CONNELL, P., WOLFF, R., HOLM, T., CULVER, M., MARTLN, C., FUJIMOTO, E., HOFF, M., KUMLIN, E. and WHITE, R., Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science. Vol: 235, 1616-1622, 1987.
83. NILAN, R.A., The North American barley genome mapping project. Agric. Can. Biocrop Network RFLP Workshop. Manitoba, Canada. P5 (abstr), 1990.
84. NOVY, R.G. and VORSA, N., Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry: implications for pedigree and genetic-relatedness studies and the source of co-dominant RAPD markers. Theor. Appl. Genet. Vol: 92, 840-849, 1996.
85. ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., HAYASHI, K. and SEKIYA, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol: 86, 2766-2770, 1989.
86. ÖZDEN, Y., Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) DNA Parmakizi Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü. Gebze-Kocaeli, 2000.
87. PAABO, S., Ancient DNA extraction, charecterization, molecular cloning and enzymatic amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol: 86, 1939-1943, 1989.
88. PAN, A., HAYES, P.M., CHEN, F., CHEN, T.H.H., BLAKE, T., WRIGHT, S., KARSAI, I. and BEDÖ, Z., Genetic analysis of the components of winter hardness in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. Vol: 89, 900-910, 1994.

89. PATERSON, A.H., De VERNA, J.W., LANINI, B. and TANKSLEY, S.D., Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato. *Genetics*. Vol: 124, 735-742, 1990.
90. PENNER, G.A., BUSH, A., WISE, R., KIM, W., DOMIER, L., KASHA, K., LAROCHE, A., SCOLES, G., MOLNAR, S.J. and FEDAK, G., Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* Vol: 2, 341-345, 1993a.
91. PENNER, G.A., CHONG, J., LEVESQUE-LEMAY, M., MOLNAR, S.J. and FEDAK, G., Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene *Pg3*. *Theor. Appl. Genet.* Vol: 85, 702-705, 1993b.
92. POULSEN, D.M.E., HENRY, R.J., JOHNSTON, R.P., IRWIN, J.A.G. and REES, R.G., The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* Vol: 91, 270-273, 1995.
93. PREUSS, D., Genetic mapping of Arabidopsis centromeres using PCR-based markers. Cold Spring Harbour Arabidopsis Molecular Genetics Course, 1996.
94. PRIOUL, J.-L., PELLESCI, S., SÉNE, M., THÉVENOT, C., CAUSSE, M., de VIENNE, D. and LEONARDI, A., From QTLs for enzyme activity to candidate genes in maize. *Journal of Experimental Botany*. Vol: 50(337), 1281-1288, 1999.
95. RAGOT, M. and HOISINGTON, D.A., Molecular markers for plant breeding: Comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs. *Theor. Appl. Genet.* Vol: 86, 975-984, 1993.
96. RICHARDS, E., Preparation of genomic DNA of plant tissue. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. (eds. F.M. AUSUBEL, R.E. KINGSTON, D.D. MOORE, J.A. SMITH, J.G. SIEDMAN and K. STRUHL), pp. 2.3.2.-2.3.3. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988.

97. ROHLF, F.J., NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1,8. Applied Biostatistics, New York, 1990.
98. ROSENBAUM, V. and RIESNER, D., Biophys. Chem. Vol: 26, 235-246, 1987.
99. SAGHAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.M., JORGENSEN, R.A. and ALLARD, R.W., Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol: 81, 8014-8018, 1984.
100. SAGHAI-MAROOF, M.A., ZHANG, Q. and BIYASHEV, R., Comparison of restriction fragment length polymorphisms in wild and cultivated barley. Genome. Vol: 38, 298-306, 1994.
101. SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N., Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle-cell anemia. Science. Vol: 230, 1350-1354, 1985.
102. SAIKI, R.K., BUGAWAN, T.L., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and ERLICH, H.A., Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature (London). Vol: 324, 163-166, 1986.
103. SAIKI, R.K. GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and ERLICH, H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. Vol: 239, 487-491, 1988.
104. SAIKI, R.A., Amplification of Genomic DNA. In: PCR Protocols. A Guide To Methods and Applications. INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. and WHITE, T.J. (Ed.). Academic Press. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1990.

105. SCHACHERMAYR, G., SIEDLER, H., GALE, M.D., WINZELER, H., WINZELER, M. and KELLER, B., Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* resistance gene of wheat. Theor. Appl. Genet. Vol: 88, 110-115, 1994.
106. SCHULLER, C., BACKES, G., FISCHBECK, G. and JAHOOOR, A., RFLP markers to identify the alleles on the *Mla* locus conferring powdery mildew resistance in barley. Theor. Appl. Genet. Vol: 84, 330-338, 1992.
107. SELANDER, R.K., CAUGANT, D.A. and WHITTAM, T.S., In: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*". Cellular and molecular biology. Neidhardt F.C. (Ed in Chief) ASM. Pp 1625-1648, 1987.
108. SHIN, J.S., CHAO, S., CORPUZ, L. and BLAKE, T., A partial map of the barley genome incorporating restriction fragment length polymorphisms, polymerase chain reaction, isozyme and morphological marker loci. Genome. Vol: 33, 803-810, 1990.
109. SHIODA, M. and MARAKAMI-MUOFUSHI, K., Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Physarum polycephalum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol: 146, 61-66, 1987.
110. SKROCH, P. and NIENHUIS, J., Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. Theor. Appl. Genet. Vol: 91, 1086-1091, 1995.
111. SMITH, S. and CHIN, E., The Utility of Random Primer-mediated Profiles, RFLPs, and Other Technologies to Provide Useful Data for Varietal Protection.in: Crop. Sci. Soc. Amer-Amer. Soc. Hort. Sci. Amer. Genet. ASSN. Joint Plant Breeding Symp. Ser. Minneapolis. Crop. Sci. Amer. Madison Vis. 46-49, 1992.
112. SOGAARD, B. and von WETTSTEIN-KNOWLES, P., Barley: genes and chromosomes. Calsberg Research Communications. Vol:52, 123-126, 1987.

113. SOMMER, R. and TAUTZ, D., Minimal homology requirement for PCR. *Nucleic Acids Res.* Vol: 17, 6749, 1989.
114. SOUTHERN, E.M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* Vol: 98, 503-517, 1975.
115. SPIERS, J., BRADY, C.J. and AUST, J., *Plant Physiol* Vol: 8, 603-618, 1981.
116. STAUB, J.E., KUHNS, L.J., MAY, B. and GRUN, P., Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* Vol: 107, 405-408, 1982.
117. STAUB, J.E., SERQUEN, F.C. and GUPTA, M., Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience*. Vol: 31(5), 729-741, 1996.
118. STEGEMANN, H., Retrospect on 25 years of cultivar identification by protein patterns and prospects for the future. *Seed Sci. And Technol.* Vol: 15, 20-31, 1984.
119. SOKAL, R.R. and SNEATH, P.N.A., *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, 1963.
120. TANKSLEY, S.D. and ORTON, T.J., *Isozymes in plant genetics and breeding, Parts 1A and 1B*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1983.
121. TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. and BONIERBALE, M.W., RFLP mapping in plant breeding new tools for an old science. *BioTechnology*. Vol: 7, 257-264, 1989.

122. TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W. and MARTIN, G.B., Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. Trends. Genet. Vol: 11, 63-68, 1995.
123. TAUTZ, D., Hypervariability of simple sequences as a general sources for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. Vol: 17, 6463-6472, 1989.
124. THORMANN, C.E. and OSBORN, T.C., Use of RAPD and RFLP Markers for Germplasm Evaluation. In: Crop. Sci. Soc. Amer.-Amer. Soc. Hort. Sci. Amer. Genet. ASSN. Joint Plant Breeding Symo. Ser. Minneapolis. Crop. Sci. Amer. Madison Wis, 1992.
125. TINGEY, S.V., RAFALSKI, J.A. and HANAFEY, M.K., Genetic analysis with RAPD markers. Plant Molecular Biology. NATO ASI Series. Vol: H 81, 491-498, 1993.
126. TRAGOONRUNG, S.V., KANIZIN, P.M., HAYES, S.D. and BLAKE, T.K., Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. Vol: 84, 1002-1008, 1992.
127. VAN DEYNZE, A.E., DUNCOVSKI, J., GILL, K.S., NELSON, J.C., SORRELLS, M.E., DVORAK, J., GILL, B.S., LAGUDAH, E.S., MCCOUCH, S.R. and APPELS, R., Molecular-genetic maps for group I chromosomes of *Triticae* species and their relation to chromosomes in rice and out. Genome. Vol: 38, 45-59, 1994.
128. VAN RENSBURG, L. and KRÜGER, G.H.J., Evaluation of components of ozidative stress metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L. Plant Physiol. Vol: 143, 730-737, 1994.
129. VASSART, G., GEORGES, M., MONSIEUR, R., BROCAS, I.I., LEQUARRE, A.S. and CRISTOPHE, D., A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. Science. Vol: 235, 683-684, 1987.

130. VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN de LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZABEAU, M., AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* Vol: 23(21), 4407-4414, 1995.
131. WANG, G., WHITTAM, T.S., BERG, C.M. and BERG, D.E., RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic acids Res.* Vol: 21, 5930-5933, 1993.
132. WARBURTON, M.L., BECERRA-VELASQUEZ, V.L., GOFFREDA, J.D. and BLISS, F.A., Utility of RAPD markers in identifying genetic linkages to genes of economic interest in peach. *Theor. Appl. Genet.* Vol: 93, 920-925, 1996.
133. WAUGH, R. and POWELL, W., Using RAPD markers for crop improvement. *Tibtech.* Vol: 10, 186-191, 1992.
134. WAWER, C., RÜGGERBERG, H., MEYER, G. and MUYZER, G., A simple and rapid electrophoresis method to detect sequence variation in PCR-amplified DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* Vol: 23(23), 4928-4929, 1995.
135. WEBER, J.L. and MAY, P.E., Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* Vol: 44, 388-396, 1989.
136. WEEDEN, N.F., TIMMERMAN, G.M., HEMMAT, M., KNEEN, B.E. and LODHI, M.A., Inheritance and releability of RAPD markers. In: Hoisington D. ve McNap A. (Eds.) *Proc. Symp. Appl. RAPD Tech. Plant Breeding.* 1992 November 1, Minneapolis MN, USA. *Crop. Sci. Soc. Am.*, Madison WI, USA, pp: 12-17, 1992.
137. WEINING, S. and LANGRIDGE, P., Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* Vol:82, 209-216, 1991.

138. WELSH, J. and McCLELLAND, M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* Vol: 18(24), 7213-7218, 1990.
139. WELSH, J. and McCLELLAND, M., Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Research.* Vol: 19(19), 5275-5279, 1991.
140. WELSH, J., PETERSON, C. and McCLELLAND, M., Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.* Vol: 19(2), 303-306, 1991.
141. WHITKUS, R., DOEBLEY, J. and WENDEL, J.F., Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: L. Phillips and I.K. Vasil, eds. *DNA-based markers in plants*, pp. 116-141. Amsterdam, The Netherlands: Kluwer, 1994.
142. WILLIAMS, J.G.K., RAFALSKI, A.J. and TINGEY, S.V., "Genetic Analysis using RAPD Markers" in: *Methods in Enzymology*, R. Wu, Editor. Academic Press Orlando, FL, 1990a.
143. WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.E., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.C., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* Vol: 18, 6531-6535, 1990b.
144. WILLIAMS, M.N.V., PANDE, N., NAIR, M., MOHAN, M. and BENNET, J., Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from map loci of rice (*Oryza sativa L.*) genomic DNA. *Theor. Appl. Genet.* Vol: 82, 489-498, 1991.
145. WILLIAMS, J.G.K., HANAFEY, M.K., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V., Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* Vol: 218, 705-740, 1993.

146. WONG, Z., WILSON, V., JEFFREYS, A.J. and THIEN, S.L., Cloning of a selected fragment from a human DNA "fingerprint": isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nuc. Acids Res.* Vol: 14, 4607-4616, 1986.
147. WONG, Z., WILSON, V., PATEL, I., POVEY, S. and JEFFREYS, A.J., Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Annu. Hum. Genet.* Vol: 52, 269-288, 1987.
148. WYMAN, A.R. and WHITE, R., A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol: 77, 6754-6758, 1980.
149. YAMAZAKI, M., SATO, A., SHIMOMURA, K., SAITO, K. and MUROKOSHI, I., Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP analysis. *Biol. Pharm. Bull.* Vol: 17, 1529-1531, 1994.
150. YANG, X. and QUIROS, C.F., Construction of a genetic linkage map in celery using DNA-based markers. *Genome.* Vol: 38, 36-44, 1995.
151. YU, K. and PAULS, K.P., Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.* Vol:20, 2606, 1992.
152. ZABEAU, M. and VOS, P., European Patent Application, publication no: EP 0534858, 1993.

8. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İstanbul’ da doğdu. İlköğretimini 1986 yılında Küçükyalı Merkez İlkokulu’ nda, Ortaöğretimini 1993 yılında Özel Ahmet Şimşek Koleji’ nde tamamladı. 1997 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü’ nde Yüksek Lisans öğretime başladı. 1998 yılında Yüksek Lisans tezini TÜBİTAK-MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü’ nde araştırmaya başladı. Halen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü’ nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmakta ve iyi derecede İngilizce ve Almanca bilmektedir.

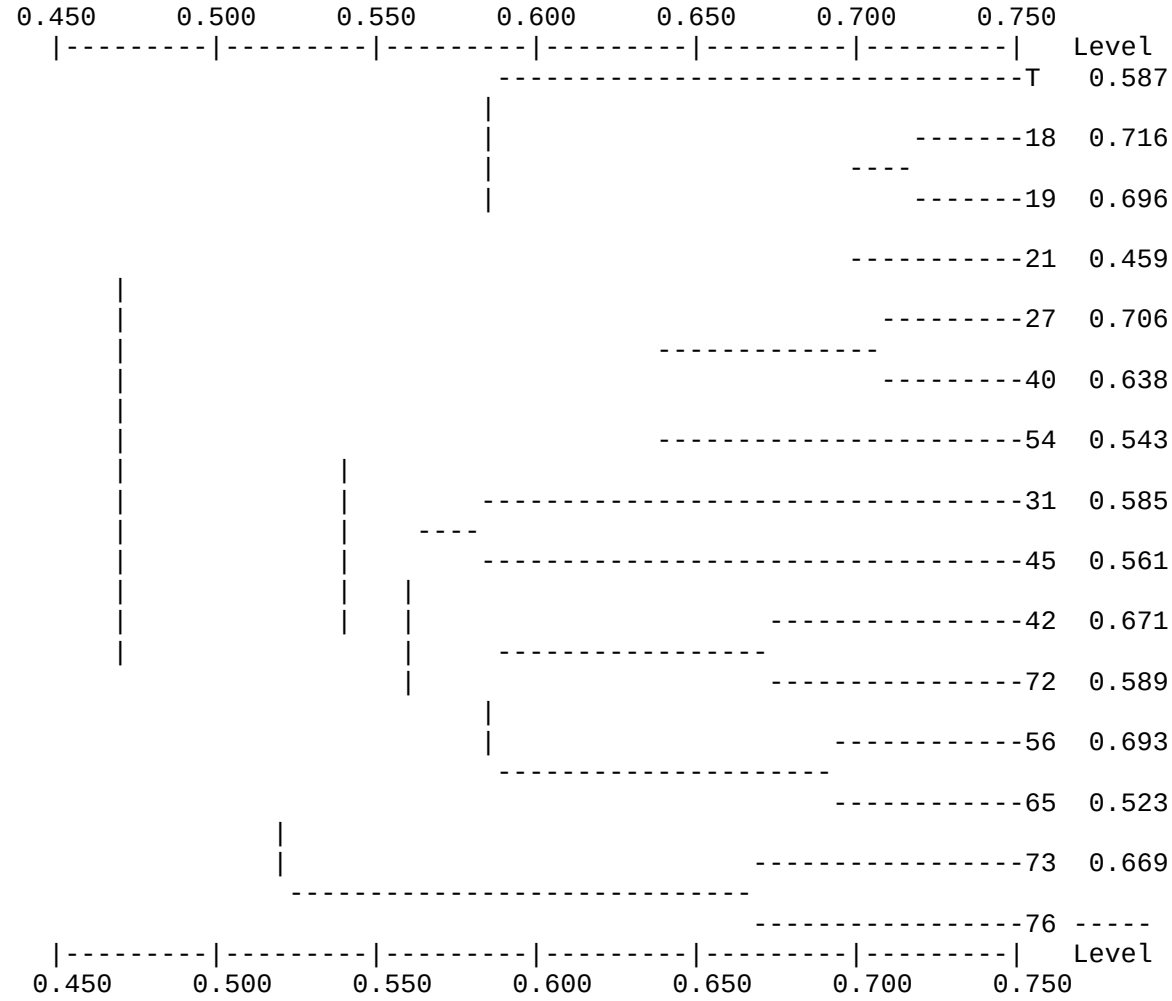
Çizelge 4.11: F₂ bireylerinin Tokak' la (dirençli ebeveyn) ve birbirleri ile olan benzerlik oranları

	Tokak	18	19	21	27	31	40	42	45	54	56	65	72	73	76
Tokak	-														
18	61,73	-													
19	62,67	71,67	-												
21	51,94	67,89	71,47	-											
27	53,64	63,90	61,91	59,98	-										
31	57,83	56,09	56,82	52,98	64,93	-									
40	36,64	52,31	47,67	43,41	70,65	52,45	-								
42	46,45	52,18	49,86	52,75	58,48	66,66	58,39	-							
45	49,15	49,96	56,52	49,39	54,63	58,50	48,36	66,11	-						
54	40,95	47,39	45,83	40,31	60,45	44,13	67,29	57,66	55,60	-					
56	50,06	45,07	39,86	45,18	49,70	48,71	48,50	53,74	51,22	49,11	-				
65	43,86	46,25	48,93	51,14	50,41	55,76	50,83	64,30	62,22	67,57	69,30	-			
72	43,40	41,67	43,22	41,37	51,17	47,80	55,00	67,16	50,21	60,63	51,93	65,59	-		
73	37,95	45,89	42,60	39,65	52,42	53,57	51,98	53,18	47,82	62,92	43,43	60,41	60,79	-	
76	38,10	44,43	40,59	38,05	43,25	43,40	53,88	52,44	44,76	55,90	54,97	54,94	52,75	66,96	-

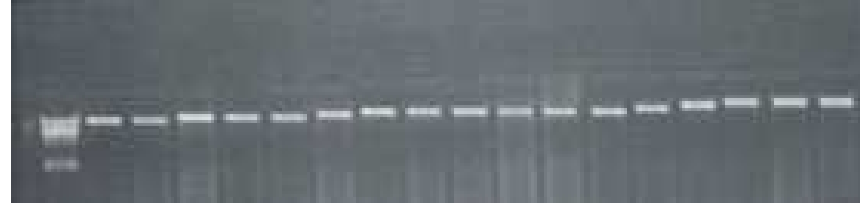
Çizelge 4.10 : F₂ bireylerinin 5819' la (hassas ebeveyn) ve birbirleri ile olan benzerlik oranları

	5819	18	19	21	27	31	40	42	45	54	56	65	72	73	76
5819	-														
18	52,98	-													
19	54,55	71,67	-												
21	51,63	67,89	71,47	-											
27	45,09	63,90	61,91	59,98	-										
31	46,38	56,09	56,82	52,98	64,93	-									
40	36,28	52,31	47,67	43,41	70,65	52,45	-								
42	41,57	52,18	49,86	52,75	58,48	66,66	58,39	-							
45	41,62	49,96	56,52	49,39	54,63	58,50	48,36	66,11	-						
54	30,97	47,39	45,83	40,31	60,45	44,13	67,29	57,66	55,60	-					
56	45,20	45,07	39,86	45,18	49,70	48,71	48,50	53,74	51,22	49,11	-				
65	36,75	46,25	48,93	51,14	50,41	55,76	50,83	64,30	62,22	67,57	69,30	-			
72	40,24	41,67	43,22	41,37	51,17	47,80	55,00	67,16	50,21	60,63	51,93	65,59	-		
73	31,53	45,89	42,60	39,65	52,42	53,57	51,98	53,18	47,82	62,92	43,43	60,41	60,79	-	
76	32,96	44,43	40,59	38,05	43,25	43,40	53,88	52,44	44,76	55,90	54,97	54,94	52,75	66,96	-

Çizelge 4.13. Tokak' la F₂ bireylerinin dendogram şemaları



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



Şekil 4.1: Genomik DNA izolasyonu. 1) Ladder DNA, 2) 5819, 3) Tokak, 4) F₁-51, 5) F₂-18, 6) F₂-19, 7) F₂-21, 8) F₂-27, 9) F₂-31, 10) F₂-40, 11) F₂-42, 12) F₂-45, 13) F₂-54, 14) F₂-56, 15) F₂-65, 16) F₂-72, 17) F₂-73, 18) F₂-76

19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
D D D H D D D D H H H H H F₁ DE HE NK M



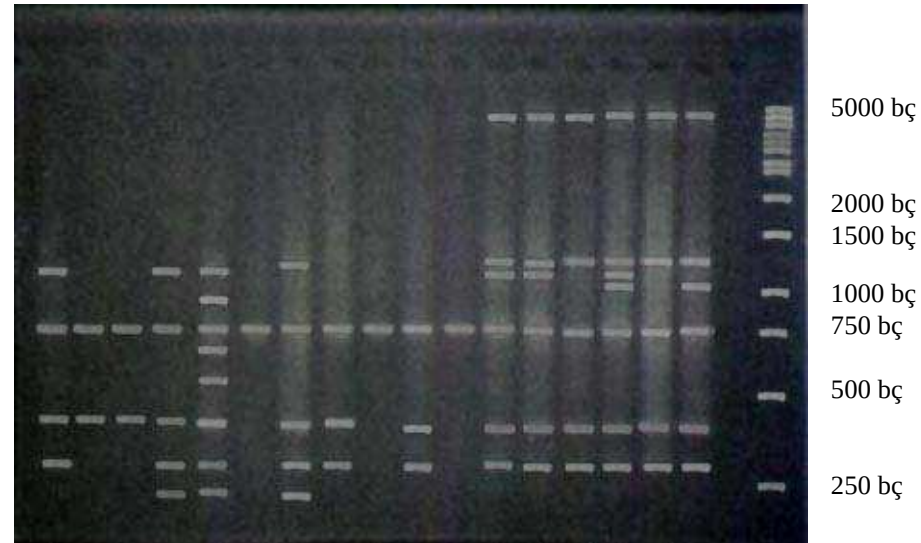
Şekil 4.2: OPC-6 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂-76

19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
D D D H D D D D H H H H H F₁ DE HE NKM



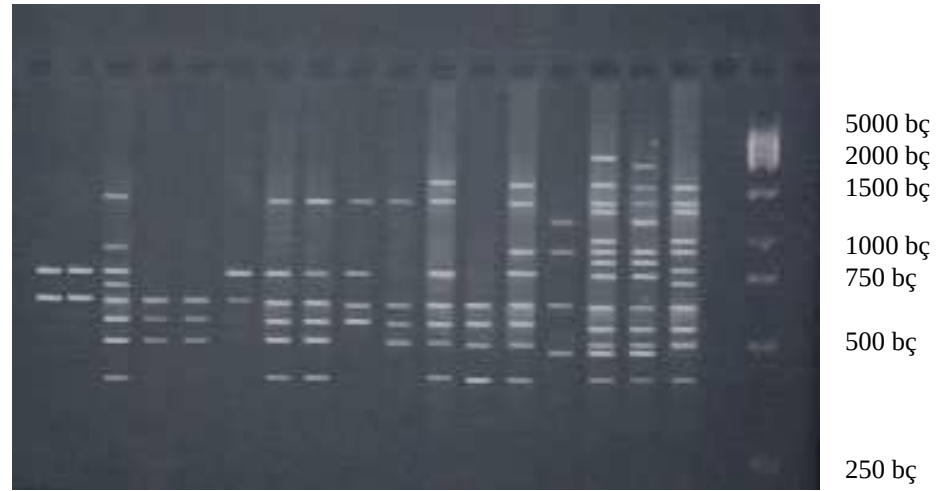
Şekil 4.3: PRA-3 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂-76

19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
D D D H D D D D H H H H H H F₁DE HE NKM

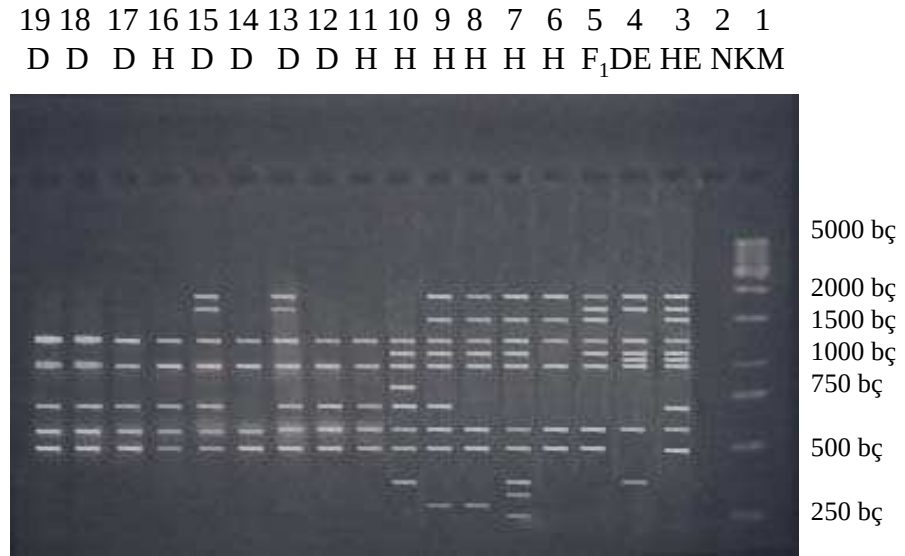


Şekil 4.4: O-19 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂

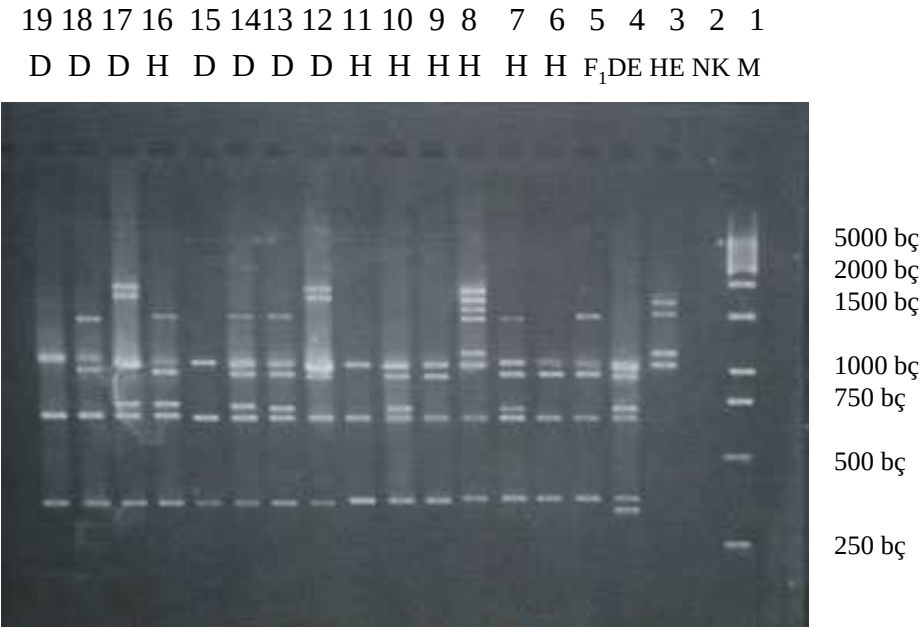
19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
D D D H D D D D H H H H H H F₁ DE HE NKM



Şekil 4.5: O-10 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂-76



Şekil 4.6: B-374 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂-76

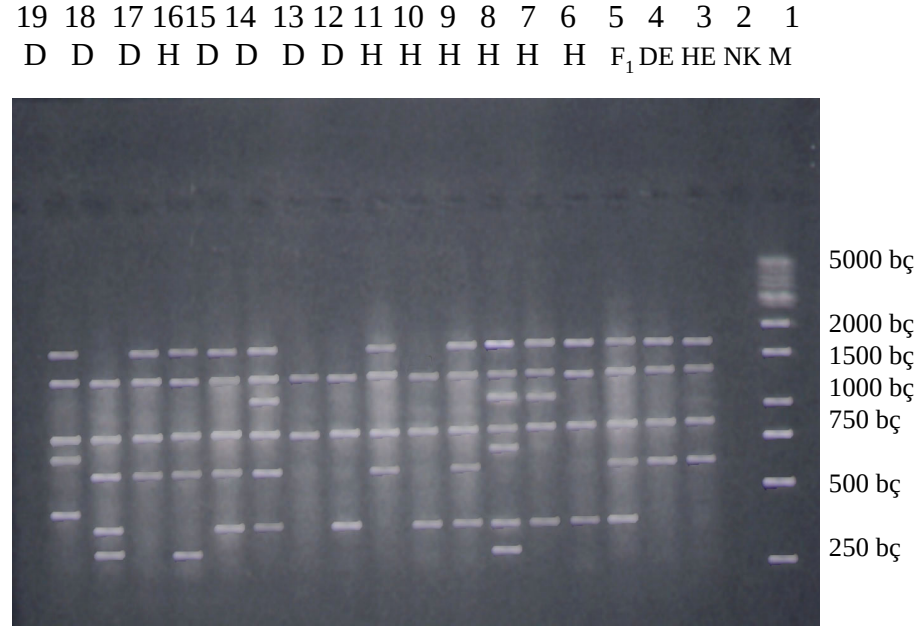


Şekil 4.7: A-9 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂-76

19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
D D D H D D D D H H H H H F₁ DE HE NK M



Şekil 4.8: UBC-237 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂-76



Şekil 4.9: OD-8 primeri ile elde edilen RAPD sonuçları. 1) Ladder DNA (Markır), 2) Negatif Kontrol, 3) 5819 (Hassas Ebeveyn), 4) Tokak (Dirençli Ebeveyn), 5) F₁-51, 6) F₂-18, 7) F₂-19, 8) F₂-21, 9) F₂-27, 10) F₂-31, 11) F₂-40, 12) F₂-42, 13) F₂-45, 14) F₂-54, 15) F₂-56, 16) F₂-65, 17) F₂-72, 18) F₂-73, 19) F₂-76