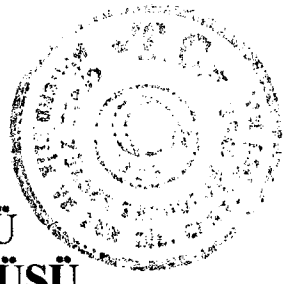


T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇAM (*Pinus sp.*) TÜRLERİNDE GENETİK
POLİMORFİZMİN DNA MARKIR
TEKNOLOJİSİ İLE TANIMLANMASI

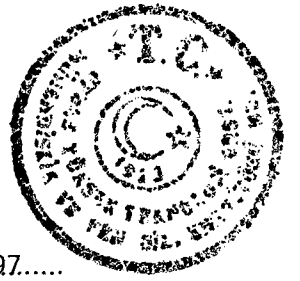
Funda ŞENTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

66014

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Abdülkadir AKÇİN

GEBZE
1997

T.C. GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
DOĞRU KÜTÜPHANE



Bu tez çalışması , GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü ...24.06.1997.....
tarih ve ...97/14..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ...Biyoloji.....
Anabilim Dalı ...Genel.Biyoloji..... programında YÜKSEK LİSANS tezi olarak
kabul edilmiştir .

JÜRİ

ÜYE

(Tez Danışmanı)

: Prof, Dr. Abdülkadir AKÇİN

ÜYE

: Prof.Dr. Ahmet ZEHİR

ÜYE

: Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

ÜYE

:

ÜYE

:

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu 05/07/1997 Tarih ve
97/12 Sayılı Kararı .

İmza / Mühür
Prof.Dr. İbrahim PAZ



ÖZET

Pinus pinaster, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus brutia* ve *Pinus pinea*'nın yapraklarından izole edilen genomik DNA kullanılarak bu çam ağaç türleri arasındaki genetik polimorfizm RAPD analizleri ile belirlendi. RAPD analizlerinde otuzbir tane farklı primer denendi. Bu primerlerden sadece oniki tanesinde çoğaltılmış bantlar elde edildi. GYTE 9 (5' CTGCAGTGGCTTTTCACCTTC 3') primerinin kullanıldığı RAPD analizinde homomorfik bantlar elde edilirken diğer onbir primerle yapılan RAPD analizlerinde heteromorfik bantlar elde edildi. TUB 365 (5' GGACTGGAGT 3') primerinin sağladığı heteromorfik bantlar ile bu beş farklı çam türünü aynı anda moleküler düzeyde birbirinden ayırmak mümkün oldu. Türler arasında en yüksek polimorfizm değerinin, *Pinus nigra* ile *Pinus pinaster* arasında %52.75, en düşük polimorfizm değerinin ise *Pinus nigra* ile *Pinus sylvestris* arasında % 28.25 oranında olduğu hesaplandı.

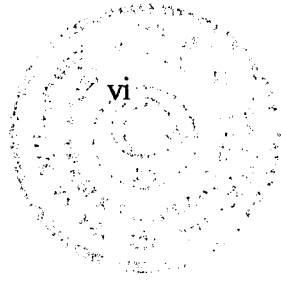
Yapısında fazla miktarda fenolik maddeler bulunan çam yapraklarından DNA izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ve özellikle genetik düzeyde polimorfizmi belirlemede kullanılabilecek uygun primerlerin saptanması, farklı çam genotiplerinde yapılacak moleküler genetik çalışmalarına katkıda bulunacaktır.



SUMMARY

In this study, genetic polymorphism was studied on five different pine species; *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. brutia*, and *P. pinea*. The genomic DNA isolated from needles was used to determine genetic polymorphism among different pine species by using RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) analysis. Thirty-one primers chosen arbitrarily were used to amplify genomic DNA. Among these primers, twelve primers produced expected bands on analytic gel. Primer GYTE 9 (5' CTGCAGTGGCTTTTCACCTTC 3') homomorphic bands for all tested genotypes. However, primer TUB 365 (5' GGACTGGAGT 3') produced polymorphic RAPD bands for these genotypes. Then the rate of polymorphism was calculated. According to results, the highest polymorphism rate was 52.75% between *P. nigra* and *P. pinaster*. The lowest polymorphism was 28.25% between *P. nigra* and *P. sylvestris*.

Developing techniques for DNA isolation from highly phenolic pinus needles and in particular obtaining proper primers which will be used in the determination of polymorphism will provide an essential contribution to the genetic research in the field of Pinus genotypes.



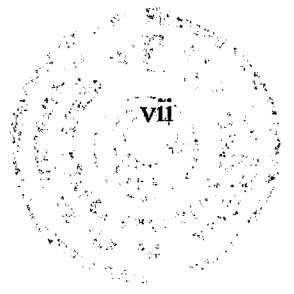
TEŞEKKÜR

Başta Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Rektörü Prof.Dr. Ahmet AYHAN, Fen ve Mühendislik Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof.Dr. İbrahim BAZ, Fen Fakültesi Dekanı Biyoloji Bölüm Başkanı Prof.Dr.Ahmet ZEHİR olmak üzere bu çalışmanın başlangıcından sonuçlandırılmasına kadar hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve desteklerini esirgemeyen RektörYardımcısı Danışman Hocam Prof.Dr. Abdülkadir AKÇİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın tamamını TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Laboratuvarlarında yürütebilmem için gerekli tüm olanakları kullanmamı sağlayan Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Müdürü Prof.Dr. Engin BERMEK'e teşekkür ederim. Bu projenin gerçekleştirilmesi süresince her safhasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, bitmez bir enerjiye sahip olan Proje Koordinatörüm Prof.Dr.Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

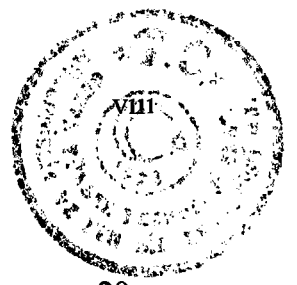
Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'ndeki araştırmacı arkadaşlarıma, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde aynı dönemde birlikte tez çalışmalarımızı yürüttüğümüz Nuray KÖRÜKMEZ ve Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü'ndeki çalışma arkadaşım Bilge DİNÇER'e gösterdikleri ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yaşamımın her döneminde olduğu kadar tez çalışmam esnasında da her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme saygı ve sevgilerimi sunmayı bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR	6
2.1. Genetik Polimorfizm Çalışmalarında İzozim Analizleri	9
2.2. Genetik Polimorfizm Çalışmalarında Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizleri	10
2.3. Genetik Polimorfizm Çalışmalarında Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Analizleri	11
3. MATERYAL VE METOD	13
3.1. Bitki Materyali	13
3.2. Genomik DNA İzolasyonu	13
3.3. RAPD Analizi İle Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması	15
3.3.1. Primerler	15
3.3.2. Enzim	17
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	17
3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi	18
3.4. Polimorfizm Oranlarının Hesaplanması	19

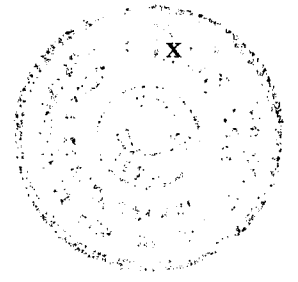


4. BULGULAR	20
4.1. DNA İzolasyon Metodunun Belirlenmesi	20
4.2. PCR Koşullarının Optimizasyonu	20
4.3. Çam Türlerinin Genomik Parmak İzlerinin Çıkarılması	20
4.4. Polimorfizm Değerlerinin Karşılaştırılması	39
5. TARTIŞMALAR	40
5.1. DNA İzolasyon Metodunun Seçimi	40
5.2. RAPD Koşullarının Optimizasyonu	41
5.3. Türler Arasındaki Polimorfizm Oranları	42
6. SONUÇLAR	44
7. KAYNAKLAR	45
8. ÖZGEÇMİŞ	55



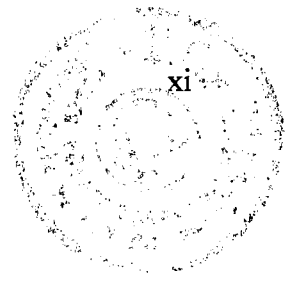
SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP	Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AP-PCR	Rastgele Primerli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction)
°C	Santigrad Derece
DAF	DNA Çoğaltılmış Parmak İzi (DNA Amplification Fingerprinting)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
Genomed A.Ş.	Genomed Sağlık Bilimleri Anonim Şti.
GYTE	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü
mA	Miliamper
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	Hidrojen İyon Konsantrasyonu
pg	Pikogram
QTL	Kantitatif Karakterleri Taşıyan Lokuslar (Quantitative Trait Loci)
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
RNaz	Ribonükleaz
TÜBİTAK, MAM	
GMBAE	Türkiye Bilimsel Teknik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi, Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü
UV	Ultraviyole
V	Volt



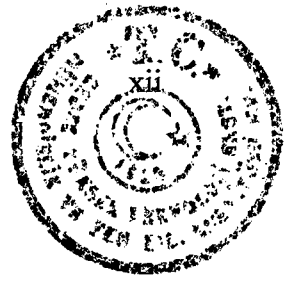
ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
Şekil 4.1. Çam yapraklarından DNA izolasyonu	21
Şekil 4.2. Primer GYTE 3 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	22
Şekil 4.3. Primer GYTE 6 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	23
Şekil 4.4. Primer GYTE 8 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	24
Şekil 4.5. Primer GYTE 9 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	25
Şekil 4.6. Primer TUB 341 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	26
Şekil 4.7. Primer TUB 357 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	27
Şekil 4.8. Primer TUB 365 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	28
Şekil 4.9. Primer TUB 392 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	29
Şekil 4.10. Primer MAM 1 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	30
Şekil 4.11. Primer MAM 2 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	31
Şekil 4.12. Primer MAM 3 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	32
Şekil 4.13. Primer MAM 4 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri	33



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar	15
Çizelge 3.2. RAPD analizlerinde kullanılan primerler	16
Çizelge 3.3. RAPD analizlerinde kullanılan bileşenler	17
Çizelge 3.4. Termalsaykırda RAPD analizi için programlama süreleri	18
Çizelge 3.5. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar	19
Çizelge 3.6. λ DNA'sının Hind III enzimi ile kesimi	19
Çizelge 4.1. Şekil 4.2.'de GYTE 3 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	34
Çizelge 4.2. Şekil 4.3.'te GYTE 6 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	34
Çizelge 4.3. Şekil 4.4.'te GYTE 8 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	34
Çizelge 4.4. Şekil 4.5.'te GYTE 9 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	34
Çizelge 4.5. Şekil 4.6.'da TUB 341 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	35
Çizelge 4.6. Şekil 4.7.'de TUB 357 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	35
Çizelge 4.7. Şekil 4.8.'de TUB 365 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	35
Çizelge 4.8. Şekil 4.9.'da TUB 392 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	35
Çizelge 4.9. Şekil 4.10.'da MAM 1 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	36
Çizelge 4.10. Şekil 4.11.'de MAM 2 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	36
Çizelge 4.11. Şekil 4.12.'de MAM 3 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı	36



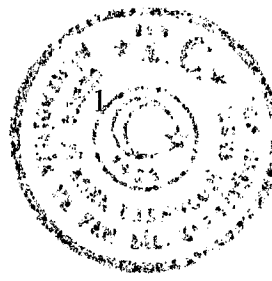
Çizelge 4.12. Şekil 4.13.'te MAM 4 primeri ile belirlenen RAPD
markırlarının çam türlerine göre dağılımı

36

Çizelge 4.13. RAPD markırlarının değerlendirilmesi ile beş çam
türü arasında hesaplanan polimorfizm oranları (%)

39





I. GİRİŞ

Dünyada her yıl hızla artan nüfus sonucu yeni tarım, sanayi ve yerleşim alanlarına olan ihtiyaç hızla artmaktadır. Tarım ve mera alanlarının sınırına dayanıldığına göre, doğan ihtiyacı karşılayacak kaynak sadece orman alanlarıdır. Orman kaynaklarına olan baskının tarihi, insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanoğlunun teknolojik gücü arttıkça, üretim alanları geliştikçe ormanların azalması hızlanmıştır. Tarım öncesi dönemden bugüne orman kaynaklarının % 20-25 oranında azaldığını görmekteyiz. Azalma hızla devam etmektedir. Bu azalmadan kuzey yarı kürenin yapraklı ve iğne yapraklı ormanları % 32-35 oranında etkilenmiştir (Ayberk, 1992).

Yurdumuzda mevcut 19.1 milyon hektar orman alanı ağaç türleri bakımından ibrelili ve yapraklı ağaçlardan meydana gelmektedir. Ormanlarımızda tür olarak % 54.4 ibrelili ve % 45.6 yapraklı ağaçlar mevcuttur. İbrelili ağaçlardan olan sarı çam, kara çam, kızıl çam toplam % 38.5 katılma oranıyla en yüksek değere sahiptir. Yine koru ormanlarında kızıl çam % 19.3, kara çam % 16.9, sarı çam %7.6'lık katılma paylarına sahiptir (Uslu, 1988).

Takson zenginliği açısından yalnız *Coniferae*'ler arasında değil, *Gymnospermae* bitki dünyasında da en başta gelen *Pinus* (çam)'lar her zaman yeşil, uzun boylu ulu ağaçlar, ender olarak *Pinus mugo*, *P. pumila* ve *P. uncinata* gibi kısa boylu çalı, hatta yerde sürünen çalılar halinde odunsu bitkilerdir. Çamlar asıl yayılışını kuzey yarı küresinde yapmakta, ancak Sumatra'nın doğusunda Sunda adalarında *Pinus merkusii* türü ile, ekvatorun güneyine geçebilmektedir. Bu geniş yayılış alanlarında sahil kumluklarından, yukarı orman ve ağaç sınırlarına değin çıkmaktadır.

Günümüzde yüzü aşkın taksonu ile kuzey yarı küresinde yayılan *Pinus* cinsini, taksonomik açıdan çeşitli seksiyon ve gruplara ayırarak incelemek daha kolay olmaktadır. Bu sınıflandırmalarda dikkate alınması gereken en önemli özellikler, kozalak yapısı, özellikle pullarının biçimi, iğne yaprak sayıları, iğne yaprakların enine kesitlerinde bir ya da iki iletim demeti bulundurması, öte yandan iğne yaprağın enine kesitinde bulunan reçine kanallarının epidermisin hemen altında (marjinal), yaprağın mezofil dokusu içinde (medial), ya da yaprağın, iletim borusu demetinin çevresinde

(internal) olması gibi özelliklerdir. Çamlar genel olarak iğne yapraklardaki iletim demetlerinin sayısına göre iki alt cinse ayrılarak incelenmektedir: Diploksilon (iki iletim demetli, çıralı, sert) çamlar ve Haploksilon (tek iletim demetli, yumuşak) çamlar.

Sahil çamı (*P. pinaster*) Akdeniz ülkelerinin ağacıdır. Genel coğrafi yayılışına Fransa ve Portekiz'in Atlantik sahillerinden başlar, Güney Avrupa kıyılarından Yunanistan'a değin uzanır. Bu geniş yayılış alanında birbirinden ayrılan coğrafi ırkları vardır. Sahil çamı ülkemizde doğal olarak yetişmez. Ancak ağaçlandırmalarda, özellikle kumsal sahil alanların ağaçlandırılmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Sahil çamının odunu başta reçine üretimi olmak üzere, selüloz ve kağıt hamuru elde edilmesinde kullanılmaktadır. Bu tür, deniz iklimini yeğlemekte, karasal iklimden kaçınmaktadır.

İspanya, İtalya'nın güneyi, Balkanlar ve Avusturya'da dağılım gösteren kara çamın Türkiye'de bulunan çeşidi Toros kara çamıdır (*P. nigra pallasiana*). Yaklaşık iki milyon hektarlık alanı kaplayan bu çam türü Trakya'da, Kuzey, Batı, Güney ve Orta Anadolu'da yaygındır (Tunçtaner ve ark., 1986). Kuzeyde sarı çam, göknar ve meşe ile, Toroslar'da sedir ve göknar ile karışık ormanlar oluştururken, özellikle Batı Anadolu dağlarında katışıksız ormanlar oluşturur. Orta Anadolu'da bozkırın içine en çok sokulan ağaç türlerinden biridir.

Sarı çam (*P. sylvestris*) en geniş coğrafi yayılış gösteren çam taksonlarından biridir. İskoçya'dan başlayarak tüm Avrupa, Alpler, Pirene, Voj, Karpatlar ile Balkanlar, İskandinavya, Türkiye ve Asya'da çok geniş alanlarda yayılır. Sibiryaya değin uzanır. Sarı çam Türkiye'de saf ve karışık olarak bir milyon hektara yakın bir alanda yayılır. Kuzeydoğu Anadolu'da Ardahan, Oltu, Posof ve Sarıkamış yörelerinde çoğunlukla saf, Yalnızçam dağlarında saf ya da Doğu ladini ve Doğu Karadeniz göknarı ile karışık olarak geniş ormanlar oluşturmaktadır. Batı Anadolu'da kesintili olarak Bursa, Eskişehir, Kütahya yörelerine kadar gelir. Orta Anadolu'da ise Akdağ madeni yakınında büyük, Kayseri-Kahramanmaraş arasında Pınarbaşı, Göksun yörelerinde yedi küçük adacık halinde bulunur. Burada yalnız Türkiye'de değil

dünyadaki yayılışının en güney noktalarından birisine ulaşmış olmaktadır (Kayacık, 1980).

Pinecae familyasına dahil olan Kızıl çam (*P. brutia* Ten.) 20-25 m boy ve 60 cm ye kadar çap yapabilen, genel görünümü ile Halep çamına benzeyen, kalın dallı ve genellikle düzgün olmayan gövdeye sahip önemli bir orman ağacıdır. Kızıl çam asli ağaç türlerimizdendir (Neyişci, 1987). Kızıl çamın genel coğrafi yayılışı Doğu Akdenizdir. Yunanistan'ın doğusundan başlayarak Girit, Kıbrıs, Türkiye, Suriye, Irak, Lübnan ve Ürdün'de yayılır. Türkiye'de en geniş yayılımını yapmaktadır. Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde geniş kesimlerde yayılmakta, ayrıca Karadeniz sahilleri boyunca örneğin, Sinop Çamgölü yöresinde küçük adacıklar halinde bulunmaktadır. Türkiye'de yaklaşık üç milyon hektarlık alanı kaplar (Anşin, 1988).

Fıstık çamı (*P. pinea*) esas yayılışını Anadolu'da yapar. Coğrafi yayılışına Portekiz'den başlar, Suriye'ye değin yayılır. Bir Akdeniz formudur. Fransa, İspanya ve İtalya'da küçük meşcereler kurar. Türkiye'de ortalama yirmi bin hektarlık alana yayılmıştır. Batı Anadolu'da Bergama yörelerinde, Kozak, Aydın, Muğla yakınlarında geniş meşcereler oluşturur. Ayrıca Manavgat sahillerinde, Marmara yöresinde, Gemlik Körfezi kıyılarında, Kahramanmaraş'ta ve Onsan köyünde yayılış göstermektedir. Bu genel yayılışı dışında, Doğu Karadeniz sahil ve iç kesimlerinde çok dar ve parçalı halde Trabzon'un Kalenema deresi Düzköy yöresi ve bundan daha geniş olarak Artvin Çoruh Vadisi'nde bulunmaktadır. Bu çam türünün odunu, her ne kadar sarı çam ve kara çam gibi değerli değilse de, reçine üretimi ve kimi yerel gereksinimlerde kullanılmaktadır. Asıl yararlanma şekli ise, yenen yağlı tohumları olan yan ürünleridir. Aynı zamanda bir park ağacıdır.

Özellikle inşaat ve kağıt sanayii açısından büyük önem taşıyan çamlar, ayrıca terebentin, kolofan, çam ve terebentin esansı, odunkömürü, yakıt gazlar ve çam katranı gibi değerli ürünlerin kaynağıdır; özellikle kızıl çam, Halep çamı, sahil çamı gibi türler bu amaçlar için yetiştirilir. Çam yapraklarından damıtılan yaprak esansı da ilaç olarak kullanılır.

Orman gen kaynakları devamlı olarak tehdit altında bulunmaktadır. Genelde büyük iklim değışikliklerinin bu tehditlerde önemli bir rolü vardır. Bu tehdit oluşum sürecine, bir kaç bin seneden beri insanlar da katılmışlardır. Özellikle insanlar tarafından arzu edilen bazı ekolojik ortamlar, tarım arazisi veya yerleşim yeri olarak açılmıştır. Açılan bu yerlerdeki yerli ağaç türlerinde ya daralmalar meydana gelmiş veya tamamen kaybolmuştur. Bu yolla, son 50-100 yıl içerisinde ekonomik türlerin birçoğu yok olma tehlikesi ile karşılaşmışlardır veya yokolmuşlardır.

Çevre kirliliği, hızla artan dünya nüfusuyla birlikte gelen tarım alanlarının açılması ve ormanlara verilen zarar zengin bitki türlerini içeren alanları dolayısı ile bu bölgelerdeki genetik çeşitliliği yok etmektedir. Bu nedenle, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak doğadan elde edilen bitki materyalinin uzun süreli saklanması (DNA bankaları) düşüncesi ortaya çıkmış ve çoğu bitki türleri için gen bankaları kurulmuştur (Tossel, 1991). Bununla beraber doğal gen kaynaklarının varlığı, tarımsal ilaç kullanımının azaltılması ve yabancı türlerde varolan üstün karakter özelliklerinin gen transferi yöntemleri ile bitkilere aktarılması büyük önem kazanmıştır. Bu şekildeki uygulamalar doğal gen kaynaklarının daha verimli kullanılmasını sağlamaktadır.

Ormancılıkta gen kaynaklarının korunması çalışmalarına, orman ağaçları ıslahı çalışmalarının geliştirilmesi yanında, özel bazı tedbirlerin alınması şekliyle de devam edilmektedir. Amaca yönelik olarak "*in situ*" veya "*ex situ*" gibi gen kaynaklarını koruma yöntemleri ile, tek fert korumasından tohum bahçelerine, genel dağılımdan orijinlere kadar koruma yapmak mümkün olmaktadır. Gen kaynaklarının korunmasında amaç, sistematik düzen ve değerlendirme olmalıdır. *In situ* koruması; meşcerelerin korunması, doğal gençleştirme ve suni gençleştirmeyi *ex situ* koruması; ağaçlandırma, tohum bahçeleri, klon parkları, tohum ve polen saklanması, vejetatif üretme materyalinin saklanması kapsamaktadır (Şimşek, 1993).

Klasik ıslah çalışmalarına alternatif olarak bitki doku kültürü ve gen mühendisliği tekniklerinin uygulanması ile hızlı büyüyen, ortam koşullarına uyum sağlayan, patojenlere dirençli, selüloz lif kalitesi yüksek orman ağaçlarının yetiştirilmesi *in vitro* koruma ile mümkün hale gelmiştir. Bu amaçla bitki doku kültürü

sistemleri kurularak, bitkilerin mikroçoğaltımla daha seri ve hızlı üretiminde gerçekleştirilmektedir (Christie,1978; Ahuja, 1983; Coleman and Ernst, 1990).



Bu çalışmada yurdumuzda Gebze/Kocaeli yöresinde yetişen beş farklı çam türünün moleküler düzeyde genetik polimorfizm analizlerinin yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak DNA izolasyonları yapılan örneklerin, DNA bankaları kurulmuş ve bu genetik materyal kullanılarak RAPD tekniği ile oniki farklı primerin sağladığı DNA parmakizleri çıkarılmıştır. Türlerin parmak izleri değerlendirilerek genetik polimorfizm oranları % olarak hesaplanmıştır. Uygulanan bu yöntemlerin çam türleri üzerinde yapılacak moleküler düzeydeki analizler için temel oluşturacağı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar ile genetik çeşitliliğin ölçülmesi, türler arasındaki akrabalık derecelerinin belirlenmesi ve istenilen özelliklerdeki türlerin biyoteknolojik markır yöntemleri ile saptanması mümkün olacaktır.





II. KONU İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR

Yetmişli yılların başında gelişmeye başlayan Gen Mühendisliği, Rekombinant DNA Teknolojisi ya da son yıllardaki deyişimiyle Biyoteknoloji çok hızlı bir gelişim göstermiş ve günümüz biliminde çığır açan bir bilim dalı haline gelmiştir. Biyoteknolojinin sınırları çok geniş bir uygulama alanını içine almaktadır. Bu yeni alan, disiplinler arası bir özelliğe sahip olup birçok sahaya örneğin; tıp, veteriner hekimlik, tarım, orman, gıda, çevre, biyokimya, endüstri vb. başarı ile uygulanabilmektedir.

İslah amacı ile seleksiyon yapılabilmesi için genetik farklılıkların yaratmış olduğu bir varyasyon gereklidir. Gözlem, ölçme ve kimyasal analizlere dayalı karşılaştırmalar, genotip farklılıkları bir ölçüye kadar ortaya koymaktadır. Doğadaki yabancı türlerin toplanarak moleküler düzeyde analizlerinin yapılması, ekonomik açıdan değeri olan türlere yeni ve üstün özellikler kazandırmak açısından önemlidir. Bu türlerin gen verici olarak kullanılması, moleküler yöntemler ile istenilen tiplerin seçimi, klasik ıslah yöntemlerindeki güçlüklerin aşılmasına olanak vermektedir (Bothmer et. al., 1991).

Doğal gen kaynaklarının varlığı ve yabancı türlerde (ya da hatlarda) varolan üstün karakterler, bu karakterlerin gen aktarımı yöntemleri ile diğer türlere aktarımı açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla geliştirilecek olan biyoteknolojik yöntem ve uygulamalar doğal gen kaynaklarının kullanılması ile gerçekleştirilebilir (Laurie et. al., 1992).

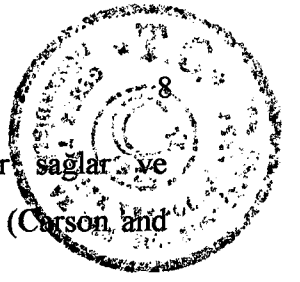
Günümüzde moleküler biyoloji ve moleküler genetik çalışmalarda kullanılan yapı tamamen genetik materyaller (DNA ve RNA) olmuştur. Çok sayıda örnekle çalışılırken örneğin popülasyon çalışmalarında dokulardan DNA izolasyonu basit, hızlı, ucuz ve etkin yöntemler gerektirir (Webb and Knapp, 1990). Çeşitli bitki türlerinde bitkinin farklı dokularından (yaprak, gövde, kök, tohum vb.) DNA izolasyonu için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bitki DNA'sının ekstraksiyonu için çok sayıda yöntem (Dellaporta et. al., 1983; Keim et. al., 1988; Rogers and Benedich,

1985; Saghai-Maroofo et. al., 1984; Wagner et. al., 1987) kullanılmaktadır. *P. brutia*'nın haploid megagametofitlerinden DNA izolasyonu (Kaya, 1993), *P. elliotti* var. *elliotti* yapraklarından DNA izolasyonu (Kamm et. al., 1996), *P. radiata* tomurcuk protoplastlarından DNA izolasyonu (Gorman et. al., 1992), *P. sylvestris*'te haploid megagametofitlerinden DNA izolasyonu (Szmidt et. al., 1996), *P. pinaster*'de haploid megagametofitlerden DNA izolasyonu (Plomion and Omalley, 1996) literatürlerde bildirilmektedir. Özellikle yapısında polifenolik maddeleri bulunduran bitkilerden saf bitki DNA'sı izolasyonu zordur. İzolasyon için yaşlı yaprakların kullanılması ile de küçük bir miktar DNA elde edilir fakat yaprakların ilk ezme aşamasında zorlanılır (Couch and Fritz, 1990; Baribault et. al., 1989).

Orman ağaçları genetik analizlerinde zorluk çekilen materyallerdir. Uzun generasyon süresi, dış döllenme sistemlerinin olması, sağlanan genetik bilgilerin eksikliği bu türlerin ortak olan sınırlayıcı özellikleridir. Çamların genom boyu gen haritalama ve gen klonlamada engel olmaktadır. Wakamiya ve arkadaşları (1993) ondokuz değişik çam türünde genom boylarını tespit etmişlerdir. Bu değer haploid megagametofit dokularda 21-31 pg arasındadır. Şeker çamı (*Pinus lambertiana*) 1 C DNA hacminde, 31.7 pg veya yaklaşık 30.000 mb DNA'ya sahiptir. Bu miktar domates bitkisinin genomundan 40 kat daha büyüktür. *Pinus* ve diğer *Gymnospermae*'ler, tohumlarında haploid megagametofitlere sahiptirler. Bu dokulardan izole edilen DNA ile yeterli bir genetik markır haritalaması yapılabilir (Devey et. al., 1995).

DNA parmak izi; bireyin kimlik tayini, türler arası akrabalık, bağlantı haritaları, insan genom analizi, hastalıkların prenatal tanısı, hastalık lokuslarının yerleşimi, genetik çeşitlilik, moleküler arkeoloji, adli tıpta kimlik tespiti, epidemiyoloji araştırmalarında kullanılmaktadır (Watkins, 1988; Landegren et. al., 1988). DNA parmak izi çalışmasının başarısı, kullanılan DNA'nın miktar ve kalitesi kadar PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) şartlarının uygunluğuna da bağlıdır (Caetano-Anolles et. al., 1992).

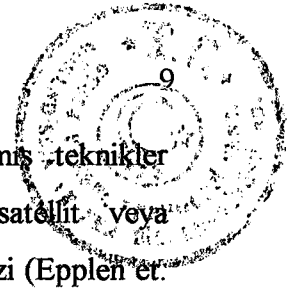
DNA kaynaklı moleküler markırlar, bireylerin genetik materyali olan DNA'daki farklılıklarını ortaya çıkarırlar. Bu teknoloji geleneksel ıslah yöntemlerini kullanarak



gerçekleştirdiğimiz orman ağacı ıslah çalışmalarına büyük katkılar sağlar ve günümüzde ağaç ıslah programlarında yaygın biçimde uygulanmaktadır (Carson and Richardson, 1995).

Genetik markır kavramı yeni değildir (Neale and Williams, 1991; Neale et. al., 1992; Burdon, 1994). Özellikle 1970'li yıllardan sonra biyoteknolojik DNA markır teknikleri çeşitli amaçlar için geliştirilmiş ve günümüzde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Moleküler markırların kullanımı, kantitatif kalıtımın moleküler genetik temelinin analizine olanak sağlayarak özellikle genom yapılarının incelenmesi ve bitki gen haritalarının oluşturulması için yeni bir yöntemdir (Helentjaris et. al., 1988; Bonierbale et. al., 1988; Whitkus et. al., 1992). Bitki gruplarının morfolojileri çevre koşullarından etkilendiğinden bunların fenotipik olarak tanımlanması oldukça zordur ve çoğu kez karışıklığa yol açabilir. Bu nedenle bitki türlerinin moleküler düzeyde tanımlanması, bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi, türlerin net bir şekilde tanımlanabilmesi ve germplazmın devamlılığı açısından önem taşımaktadır (Mori et. al., 1993). Günümüzde DNA markır teknikleri kullanılarak kesin tür tanısı ve bitki gen haritaları yapılabilmektedir. Devey ve arkadaşları (1996) *P. radiata* için genetik bağlantı haritası oluşturmak amacı ile 165 RFLP, 41 RAPD ve 2 mikrosatellit markırın analizlerini kullanmışlardır. Bu harita ve kullanılan markırlar, *P. radiata* ve diğer çam türlerindeki genetik çalışmalarda başvurulabilecek kaynaklar olmaktadır.

DNA markır tekniklerinin gelişimi, polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et. al., 1988) kullanılmasıyla sağlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu, genomda nükleotit dizisi bilinen herhangi bir bölgenin bir çift oligonükleotit (primer) kullanılarak, çok sayıda kopyasının çıkarılması esasına dayanır. Bu teknikte, tekrarlanan döngüler halinde üç farklı sıcaklık derecesi uygulanır. Çift zincirli DNA molekülünün denatürasyonunun sağlanması için 95 °C, oligonükleotitlerin (primer) DNA'ya bağlanması için 55 °C ve Taq DNA polimeraz enziminin reaksiyonu kataliz ederek, hedef DNA bölgelerini sentezlemesi için 72 °C sıcaklık dereceleri kullanılır (Graul, 1989). Teorik olarak, sentezlenen DNA bölgesi her bir döngü sonunda iki kat artarak 30 döngü sonunda yaklaşık 2^{28} kat çoğaltılmış olacaktır.



Bitkilerde DNA parmak izi çalışmalarında çoklukla uygulanmış teknikler arasında genomik RFLP analizi (Tanksley et. al., 1989) minisatellit veya mikrosatellitleri tamamlayan problemlerle çok lokuslu DNA parmak izi analizi (Epplen et. al., 1992; Weising et. al., 1995), tek mikrosatellit lokuslarının PCR ile çoğaltılması (Cregan et. al., 1994), genomda bilinmeyen bölgeleri çoğaltan rastgele ya da yarı özgün primerler kullanılarak yapılan PCR analizi (Williams et. al., 1990; Gupta et. al., 1994) sayılabilir. Bir başka markır teknolojisi olan çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP); kalıp DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle oluşan DNA parçalarının seçilerek çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir ve DNA parmak izi analizinde kullanılmaktadır (Zabeau and Vos, 1993; Vos et. al., 1995).

Moleküler düzeyde karşılaştırma söz konusu olduğunda izozim ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniklerinin ya da bunlara göre daha yararlı olduğu belirtilen RAPD (Random Amplified Length Polymorphic DNA) tekniğinin kullanılması gerekmektedir. Yurdumuzda ilk kez Gürel (1993), iki adet rastgele primer kullanarak, RAPD yöntemi ile yurdumuz kökenli yabancı arpa hatlarındaki polimorfizmi ortaya koymuşlardır.

2. 1. Genetik Polimorfizm Çalışmalarında İzozim Analizleri

İzozimler biyokimyasal markır olarak ağaç ıslah programlarında etkin bir araç olarak kullanılmaktadır. Smith (1988), Doebley ve arkadaşları (1985), ve Wilson (1988) bitki enzimlerinin farklı elektroforetik özelliklerine dayanan biyokimyasal markır teknikleri olarak izozimleri kullanmışlardır. İzozim polimorfizmi (enzimin türler arasındaki farklılıkları) bireylerin parmakizlerini tespit etmede, ıslah oranlarını, polen bulaşma seviyeleri ve kütle tozlaşma yönteminin başarı seviyesini hesaplamada ve soyun tespit edilmesinde kullanılmıştır (Wheeler and Jech, 1992). İzozimlerin genetik ve ıslahta yoğun olarak kullanılması, bu alandaki varyasyonun genetik bir tabanının olduğu ve Mendel kurallarına uygun bir kalıtım gösterdiklerinin anlaşılmasından sonra olmuştur (Hubby and Lewontin, 1966). İzozimler içinde görülen bu varyasyon, kendini kodlayan lokustaki alleli temsil etmekte ve allozim olarak adlandırılmaktadır. Allozim varyasyonu bitkilerde türlerin, çeşitlerin ve

kendilenmiş hatların ayırt edilmesinde (Quiros, 1980; Messeguer and Arus, 1985; Weeden and Emmo, 1985) test tekniği olarak bitki populasyonlarının varyasyon yönünden incelenmesinde (Brown and Weir, 1983; Pinkas et al., 1985; Weeden and Prvidenti, 1988), somatik ve seksüel hibritlerin belirlenmesinde (Wetter and Kao, 1976; Gates and Baulter, 1979; Tanksley and Jones, 1981) yoğun olarak kullanılmıştır. Allozim varyasyonunun incelenmesi sonucunda, bitki türleri gen havuzlarının organizasyonu hakkında daha fazla bilgi ortaya çıkmıştır (Gotlieb, 1981). İzozimlerin kullanıldığı sistemler varyetelerin genetik analizinde yararlı olmalarına karşın, genomda varolan potansiyel varyasyonun ortaya çıkarılmasında yetersiz kalırlar (Weeden and Lamb, 1985). Hızlı ve maliyeti düşük olmasına karşın bu teknik, sınırlı sayıda polimorfizmi belirleyebildiğinden yerini DNA markırlarına bırakmıştır (Bernatsky and Tanksley, 1989). İzozimler *P. radiata* için polimorfizmi belirlemede çok az faydalıdır (Moran and Bell, 1987). Buna karşılık çamda DNA kaynaklı moleküler markırlar çok sayıda ve çeşitlidir. Aynı zamanda çoğunun elde edilebilirliği ve çok çeşitli oluşları ağaç ıslah programlarına ek uygulamalar sağlar. Geçen 40 yıl içinde klasik populasyon ıslah yöntemleri ile *Coniferae* orman üretiminde önemli genetik ilerleme sağlanmıştır ve gelecekte sürekli bir gelişme olacaktır. Yeni Zelanda Orman Araştırma Entitüsü'nde kırk yıldan beri *P. radiata*'nın ıslah ve seçimi, klasik populasyon ıslah yöntemlerini kullanarak yapılmaktadır (Shelbourne et. al., 1986; Falconer, 1989; Carson et. al., 1990).

2.2. Genetik Polimorfizm Çalışmalarında Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizleri

İlk kez DNA markırlarının kullanımı ile genetik çeşitliliğin saptanması Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) tekniğinin kullanması ile olmuştur (Botstein et. al., 1980). RFLP, genomun restriksiyon endonükleazlar ile çeşitli uzunluklarda kesilmesi ve radyoaktif işaretli DNA parçaları kullanılarak, homoloji gösteren bölgelerin saptanması esasına dayanmaktadır. Yöntem, bakteriyel restriksiyon endonükleazlarının kesim bölgelerinin olduğu veya ortadan kalktığı DNA varyasyonunu kullanmaktadır (Laurie et. al., 1992). Bununla birlikte, RFLP

markırlarının kullanımı pahalı, zaman alıcı ve teknik açıdan zor olması nedeni ile rutin olarak uygulanamamaktadır (Goodwin and Annis, 1991).

2.3. Genetik Polimorfizm Çalışmalarında Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Analizleri

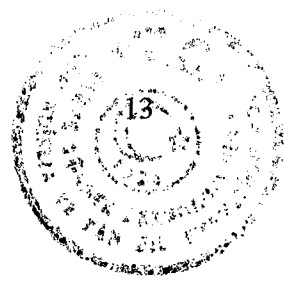
İki ayrı araştırmacı grubu Welsh ve McClelland (1990) ile Williams ve arkadaşları (1990), özgül nükleotit dizisinin bilinmesine gerek duyulmadan polimorfizmin PCR yöntemi ile tek bir primer kullanılarak ortaya konabileceğini göstermişlerdir. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) olarak tanımlanan bu yöntemle çok geniş bir çeşitlilik kısa zamanda kolaylıkla belirlenebilmektedir. Oluşan markırların sayı ve büyüklüğü, primerin nükleotit dizisine ve kalıp DNA'da bu dizinin varlığına bağlı olarak genoma özgü bir parmak izi oluşturmaktadır (Klein-Lankhorst et. al., 1991). PCR analizinin en önemli yanı, pikogram düzeyindeki DNA'nın başlangıç materyali olarak kullanılabilmesidir (Graul, 1989). Bu yöntem bir seri tekrarlanan replikasyon döngülerini içermekte ve her bir döngü farklı sıcaklık derecelerinde gerçekleşen üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; DNA'nın denatürasyonu, primerlerin DNA'ya bağlanması ve yeni DNA zincirlerinin sentezidir. Kalıp olarak DNA molekülünün, primer olarak ise yaklaşık 10 baz içeren rastgele nükleotit dizisine sahip oligonükleotitlerin kullanıldığı analizde, sonuçta sentezlenen DNA bölgesi her bir döngü sonunda iki kat artarak 30 döngü sonunda yaklaşık 2^{28} kez çoğaltılabilmektedir. PCR sonucu oluşan DNA fragmentleri, elektroforezde etidyum bromid ile boyanarak UV altında doğrudan gözlenebilmektedir.

Farklı olarak bu yöntemde uzun nükleotit diziye sahip bir çift primer yerine, farklı DNA bölgelerine bağlanabilen nükleotit dizileri kısa ve rastgele seçilmiş primerler kullanılmaktadır. Bu primerler en az % 50 guanin-sitozin (GC) içeriğine sahiptirler. Primerlerin çok değişik DNA bölgelerine bağlanma olasılığını arttırmak için daha düşük sıcaklık dereceleri (34 °C - 36 °C) kullanılmaktadır (Williams et. al., 1990). RAPD markırları, standart elektroforez teknikleri ile ayırt edilebilmekte ve etidyum bromidle boyanmış jellerde U.V. ışık altında gözlenebilmektedir (Waugh and Powell, 1992).

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) (Williams et. al., 1990), DNA çoğaltılmış parmakizi (DAF) (Caetano-Anolles et. al., 1991), rastgele primerli polimeraz zincir reaksiyonu (AP-PCR) (Welsh and McClelland, 1990; Owen and Uyeda, 1991) temelinde birbirine benzeyen, tek bir primer kullanılarak gerçekleştirilen DNA markır teknolojileridir

Plomion ve arkadaşları (1996) yaptıkları bir çalışmada *P. pinaster* Ait. F₂ dölü tohumlarının boyuna büyümeyle ilişkili olan ayırt edici niteliklere ait QTL (kantitatif karakterleri taşıyan lokuslar) bölgelerini tespit etmek için RAPD analizini kullanmışlardır.

RAPD ekonomik açıdan öneme sahip karakterleri taşıyan bireylerin genotiplerinin belirlenmesi, tohum stoklarının saflığının araştırılması, genetik haritaların çıkartılması ve bağlantıların analizlerinde (Reiter et. al., 1992), hatlar arasındaki filogenetik ilişkinin araştırılmasında (Çobanoğlu, 1994), bitki ıslahında, genlerin analizinde, evrimsel ve taksonomi çalışmalarında (Caetano-Anolles et. al., 1991) geniş ölçüde kullanılan uygun bir yöntemdir.



3. MATERİYAL VE METOD

3. 1. Bitki materyali

Bu çalışmada *Pinus pinaster* (sahil çamı), *Pinus nigra* (kara çam), *Pinus sylvestris* (sarı çam), *Pinus brutia* (kızıl çam), *Pinus pinea* (fıstık çamı) türlerine ait bitkilerden toplanan taze iğne yapraklar araştırma materyali olarak kullanıldı. Yapraklar toplanırken ağaçların uç kısımlarındaki en taze ve en genç olanları seçilerek alındı. 1-2 gr'lık gruplar halinde alüminyum folyolara sarılan materyal önce sıvı azot içinde (-180 °C) donduruldu ve kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-70 °C) saklandı.

3. 2. Metod

3. 2. 1. Genomik DNA izolasyonu

Yapraklardan genomik DNA izolasyonunda Walbot (1988), Wagner ve arkadaşları (1987) ve Saghai-Maroofo ve arkadaşlarının (1984) önerdikleri yöntemler uygulandı.

Her bir türe ait olan yaklaşık 0.5-1 gr bitki yaprağı üzerine sıvı azot eklenerek toz haline getirildikten sonra 12.5 ml ezme tamponu (Tablo 3.1.) kullanılarak soğuk, steril edilmiş porselen havanda homojenize edildi. Daha sonra bu ince bulamaç steril 4 katlı bir sargı bezinden geçirildi. Elde edilen sıvı 1.5 ml'lik steril eppendorf tüplere alınarak oda sıcaklığında 13000 devir/dakikada 15 dakika santrifüj (Eppendorf 5415 C) edildi.

Sıvı faz atıldıktan sonra tüplerdeki çökeltiler 100 µl yıkama tamponu (Tablo 3.1.) kullanılarak süspanse edildi. Her bir tüpün içeriği tek bir tüpte toplanarak bu süspansiyona final konsantrasyonu % 1 (ağırlık/hacim) olacak şekilde N-laril sarkozin konuldu. Oda sıcaklığında 15 dakika bıraktıktan sonra yine final konsantrasyonu % 1 (ağırlık/hacim) olan hekzadeziltrimetil amonyumbromid (HTAB)

ve 0.7 M NaCl eklendi. 60 °C'deki su banyosunda 10 dakika tutuldu. Tüplere 1 ml kloroform-oktanol 24:1 (hacim/hacim) eklendi. Tüpler ters çevrilerek solüsyon iyice karıştırıldı. ve oda sıcaklığında 6000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı dikkatli bir şekilde başka bir tüpe alındı ve miktar tayini yapıldı. Bu miktarın 2/3'ü hacimde izopropanol eklendi ve 2-4 kez dikkatli ve çabukça ters çevrilerek karıştırıldı. Çökelmiş DNA, bir cam çengel ile alınarak içinde 1 ml % 70'lik soğuk etil alkol ve 10 mM amonyum asetat bulunan tüpe aktarıldı. 20 dakika bekletilerek DNA'nın yıkanması sağlandı. Etil alkol dikkatlice atılarak çökelti 150 µl steril distile su, 10 mM amonyum asetat ve 0.25 mM EDTA eklenerek çözündürüldü.

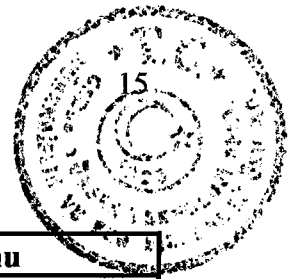
Walbot'un yönteminin bir kısmı, diğer yöntem uygulanırken DNA'nın çökmesinin olmadığı veya çok az olup cam çengelle 1 ml %70'lik etil alkol ve 10mM amonyum asetat bulunan tüpe alınamadığı durumlarda devreye konuldu. İzopropanol içindeki DNA 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı. 1 ml %70'lik soğuk etil alkol konuldu. 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Etil alkol, çökeltiden dikkatlice atıldı. Çökelmiş DNA, vakumda 20-30 dakika kurutulduktan sonra 150 µl steril distile su, 10 mM amonyum asetat ve 0.25 mM EDTA eklenerek çözündürüldü.

Bu DNA solüsyonlarındaki DNA miktarı tayini ve polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarına uygun sulandırım oranlarının hesaplanması için UV spektrofotometre (Milton Roy 601)'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Distile su ile yapılan 1/200'lük sulandırmaların UV spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonu hesaplandı. Bu hesaplamada ;

$$OD_{260} \times 50 \times \text{Seyreltme katsayısı (oranı)}$$

(Maniatis ve ark., 1982) formülü kullanıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu için uygun sulandırmaları yapılan genomik DNA örnekleri -20 °C 'de dondurucuda saklandı.



Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar

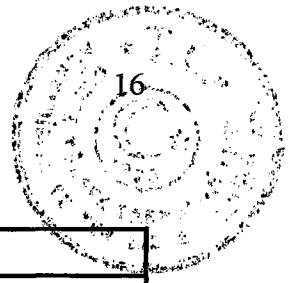
Tampon adı	İçeriği	Konsantrasyonu
Ezme Tamponu	Tris, pH 8 EDTA D-Sorbitol Polietilen glikol (MW 8000) Spermidin 2-Merkaptoetanol	50 mM 5 mM 0.35 M % 10(w/v) % 0.5 % 0.1
Yıkama Tamponu	Tris, pH: 8 EDTA D-Sorbitol Spermidin 2-Merkaptoetanol	50 mM 25 mM 0.35 M % 0.5 % 0.1

3.3. RAPD Analizi İle Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması

Çam yapraklarından elde edilen genomik DNA'lardan Williams ve ark. (1990) ile Welsh ve McClelland (1990) tarafından önerilen RAPD yöntemi ile genomdaki rastgele bölgeler çoğaltılarak genomik parmak izleri çıkartıldı ve analizleri yapıldı.

3.3.1. Primerler

Çalışmada TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde sentezlenen 10 nükleotit uzunluğundaki 19 farklı primer ile Genomed A.Ş.'den satın alınan 10-22 nükleotid uzunluğundaki 14 farklı primer kullanıldı. Stok primerler dondurucuda (-20 °C) saklandı. Kullanılan primerlerin nükleotit dizileri rastgele seçilmiş olup guanin sitozin (GC) içeriği % 40-70 arasında idi.



Çizelge 3.2. RAPD analizlerinde kullanılan primerler

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5'....3')
TUB* 341	TGAGTGGGTG
TUB 352	GTAGACCCGT
TUB 354	TTCCCCCGCT
TUB 357	TGCTCTGCCC
TUB 359	GTCCACACGG
TUB 364	CATCCCCCTG
TUB 365	GGACTGGAGT
TUB 370	CAAACGTCGG
TUB 374	CAATCGCCGT
TUB 376	CAGCACCCAC
TUB 379	GGTCCCTGAC
TUB 380	GAAACGGGTG
TUB 385	GTGAGGCGTC
TUB 386	GGGGGTCTTT
TUB 388	GATGACCGCC
TUB 392	CTCACCGTCC
TUB 393	TGTCTGGGTG
TUB 396	AAGCCTCGTC
TUB 397	TGCGTGCTTG
GYTE*1	TGCAGGACTAGCATTGGA ACTC
GYTE2	CTGGGAGGCAACTATCCAAAAG
GYTE3	GAAAAAAGTTTGCCCAGCAT
GYTE4	CATGCTTCATTTGATGCAATTG
GYTE5	GATCTCCTCCAACACCAGAAAA
GYTE6	CTGCAGGTTCTGTTGTCCCG
GYTE7	CTACTGCCGCTTCCGAATTAAG
GYTE8	TGCAGTTGGAACACTTACTCG
GYTE9	CTGCAGTGGCTTTCACCTTC
GYTE10	TGCAGATTGTACAGGGCTGG
MAM* 1	CAATCGCCGT
MAM 2	TCGGCGGATAG
MAM 3	CCTTGACGCA
MAM 4	TGGACCGGTG

* TUB (TÜBİTAK) primerleri TÜBİTAK-MAM GMBAE laboratuvarlarında, GYTE (Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü) ve MAM (Marmara Araştırma Merkezi) primerleri ise Genomed A. Ş.'nde sentezlendi.

3.3.2. Enzim

Yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilen, termostabil bir enzim olan ve pH 9'da, 72 °C'de en yüksek aktiviteyi gösteren Taq DNA polimeraz (Promega) enzimi kullanıldı. Bu enzim -20 °C'de dondurucuda saklandı.

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu 0.5 ml'lik mikro tüplerde 25 µl'lik toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi.

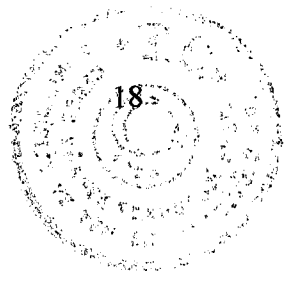
Çizelge 3.3.'deki bileşenler belirtilen miktarlar ve sırasıyla tüplere eklendi.

Çizelge 3.3. RAPD analizlerinde kullanılan bileşenler

Bileşen	İçeriği	Reaksiyon Konsantrasyonu
Steril bidistile su	-	-
Polimeraz inkübasyon Tamponu (10X)	Tris-HCl (PH 8.3) KCl Jelatin	10mM 50 mM % 0.01
MgCl ₂	-	2mM
dNTP	dATP dTTP dCTP dGTP	2.5 M 2.5 M 2.5 M 2.5 M
Primer	-	100 ng
Genomik DNA	-	100 ng
Taq DNA Polimeraz	-	1 Ünite

Daha sonra iyice karıştırılan tüplere eşit hacimde mineral yağ eklendi.

RAPD için termalsaykır (MJ Research Inc., PTC100) şu şekilde programlandı.



Çizelge 3.4. Termalsaykırda RAPD analizi için programlama süreleri

İlk 4 döngü
94 °C'de 1.5 dakika
35 °C'de 1.5 dakika
72 °C'de 2 dakika
Sonraki 26 döngü
94 °C'de 1 dakika
35 °C'de 1 dakika
72 °C'de 1.5 dakika
Son olarak 1 döngü
72 °C'de 10 dakika

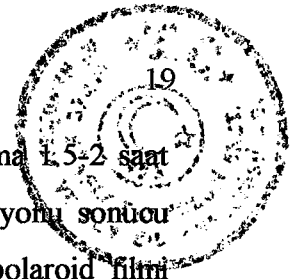
olarak gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri analizleri yapılarına kadar -20 °C 'de saklandı.

3.3.4. Agaroze Jel Elektrofözezi

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri % 1.2 ve % 1.5'lik agaroze jeller kullanılarak analiz edildi. 1.2 gr veya 1.5 gr agaroze tartılıp 100 ml 1×Tris-Borat tamponu (Tablo 3.5.) içinde iyice eritildi. Tamponun sıcaklığının yaklaşık 55-50 °C'ye düşmesi beklendi. DNA'nın UV ışık altında gözlenebilmesi için 5 µl etidyum bromid (10 mg/ml) eklenerek elektroföze tankına döküldü. 20-30 dakika sonra donan jel, içinde 1X Tris-borat tamponu bulunan elektroföze tankına alındı.

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini içeren mikrotüplere, DNA'ların kuyulara çökmesini sağlamak için 5 µl elektroföze yükleme tamponu 6X (Tablo 3.5.) kondu. Mineral yağın altında bulunan polimeraz zincir reaksiyonu ürünü ve yükleme tamponunun iyice karışması sağlandıktan sonra jel kuyularına 20 µl-25 µl kadar yükleme yapıldı.

Hazırlanan jelle örneklerle beraber Hind III kesimi yapılmış λ DNA da yüklendi (2µl λ DNA'sı + 8µl bidistile su +1µl elektroföze yükleme tamponu) (Tablo 3.6.).



Elektroforez, sabit 70 V ve 110 mA serbest akım altında ortalama 1.5-2 saat yapıldı. UV ışık altında (TFX-20M) gözlenen, polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda meydana gelen bantların fotoğrafı DS 34 Polaroid kamera ile 667 polaroid filmi kullanılarak çekildi.

Çizelge 3.5. :Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar

Tamponun İsmi	İçeriği	Konsantrasyonu
Tris-borat Tamponu (10 X)	Tris bazı Borik asit EDTA, pH 8.2	90 mM 90 mM 2 mM
Elektroforez Yükleme Tamponu	Brom fenol mavisi Sukroz	% 0.25 % 40 (w/v)

Çizelge 3.6. λ DNA'sının Hind III enzimi ile kesimi

λ DNA'ya Hind III Kesimi	
λ DNA(0.5 µg/µl)	10µl
Hind III (10 U/µl)	2 µl
Restriksiyon Tamponu B	3 µl
Destile su	15 µl

3.4. Polimorfizm Oranlarının Hesaplanması

Çam türlerinde DNA düzeyindeki farklılıkları hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Nei ve Li, 1979). İlk olarak benzerlik oranı bulundu.

$$F = \frac{2M_{XY}}{M_X + M_Y}$$

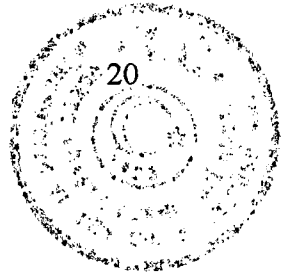
F : Benzerlik Oranı

M_{XY} : İki tür içinde aynı uzunluktaki toplam RAPD fragmenti sayısı

M_X : X türündeki RAPD fragmenti sayısı

M_Y : Y türündeki RAPD fragmenti sayısı

Daha sonra polimorfizm oranı ise; **Polimorfizm oranı = 1-F** eşitliği kullanılarak bulundu. Bulunan sonuçlar % olarak tablo halinde verildi (Çizelge 4.13.).



4. BULGULAR

4. 1. DNA İzolasyon Metodunun Belirlenmesi

Çam yapraklarından DNA izolasyonu, Wagner ve arkadaşları (1987) ile Saghai-Maroofo ve arkadaşlarının (1984) yöntemlerinin birleştirilerek uygulanması sonucu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.). Bazı materyalin izolasyonunda, bu yöntemler uygulanırken DNA'nın çöktürüldükten sonra etil alkole alınması sırasında zorluk olduğunda Walbot (1988)'un etil alkol işlemlerinin kullanılması uygun olmuştur.

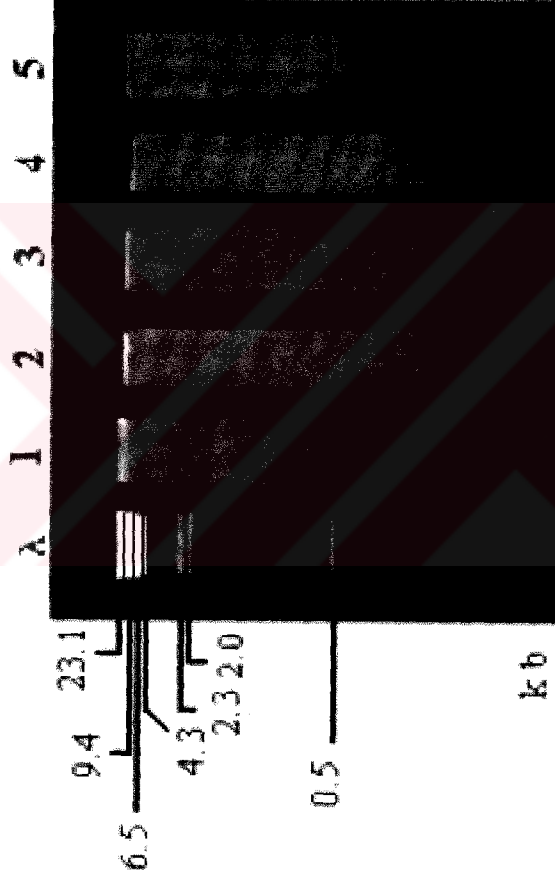
4. 2. PCR Koşullarının Optimizasyonu

PCR analizinde kullanılan DNA'nın miktarı, $MgCl_2$ 'ün konsantrasyonu ve primerlerin miktarlarında optimizasyon yapıldı. En uygun konsantrasyonların DNA için 100 ng, $MgCl_2$ için 2 mM, primer miktarı olarak 100 ng olduğu belirlendi.

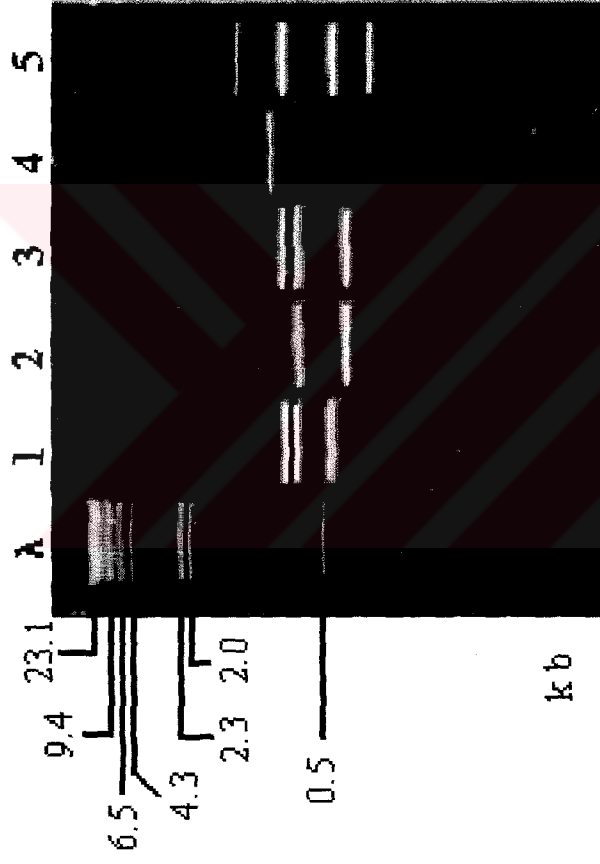
4.3. Çam Türlerinin Genomik Parmakizlerinin Çıkarılması

Çalışmada 31 ayrı primer kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile RAPD analizi yapıldı. Elektroforez analizi sonucunda 19 primer (TUB 352, TUB 354, TUB 359, TUB 364, TUB 370, TUB 374, TUB 376, TUB 379, TUB 380, TUB 385, TUB 386, TUB 388, TUB 393, TUB 396, GYTE 2, GYTE 5, GYTE 10) ile çoğaltılmış bantlar gözlenmedi. Çalışılan türlere ait DNA'larla diğer 12 primerle RAPD analizi sonucunda çeşitli bantlar elde edildi. Bu primerlere ait PCR ürünlerinin elektroforez analizi sonucunda GYTE 9 primeri dışında diğer primerlerin polimorfik bantlar verdiği gözlemlendi. GYTE 9 primeri ile homomorfik bantlar elde edildi. Şekil 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6., 4.7., 4.8., 4.9., 4.10., 4.11., 4.12 ve 4.13.'te RAPD analizi sonunda elde edilmiş olan PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde, UV ışık altında gözlenerek çekilmiş fotoğrafları görülmektedir.

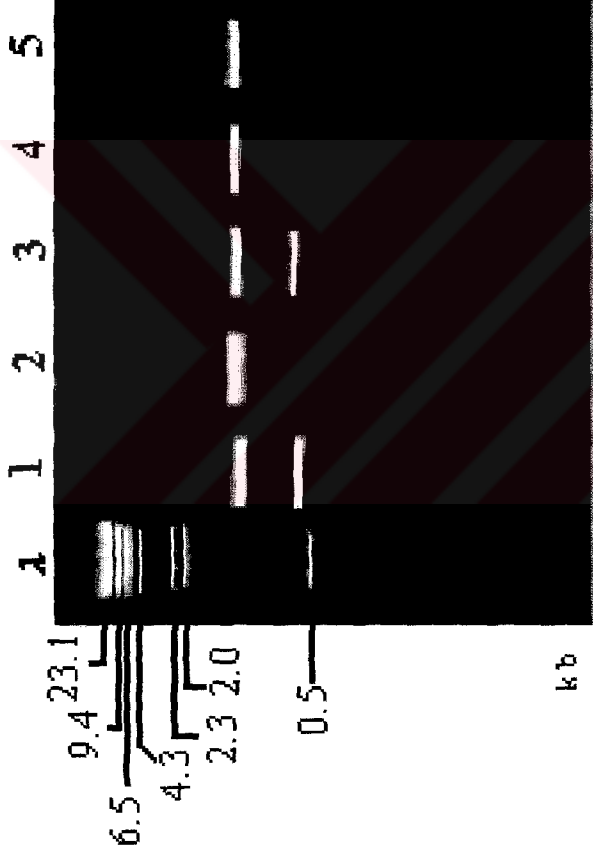
Agaroz jel elektroforezi ile elde edilen markırların sonuçları çizelge 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6., 4.7., 4.8., 4.9., 4.10., 4.11. ve 4.12.'de gösterilmiştir.



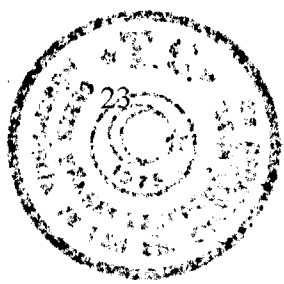
Şekil 4.1. Çam yapraklarından DNA izolasyonu; λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

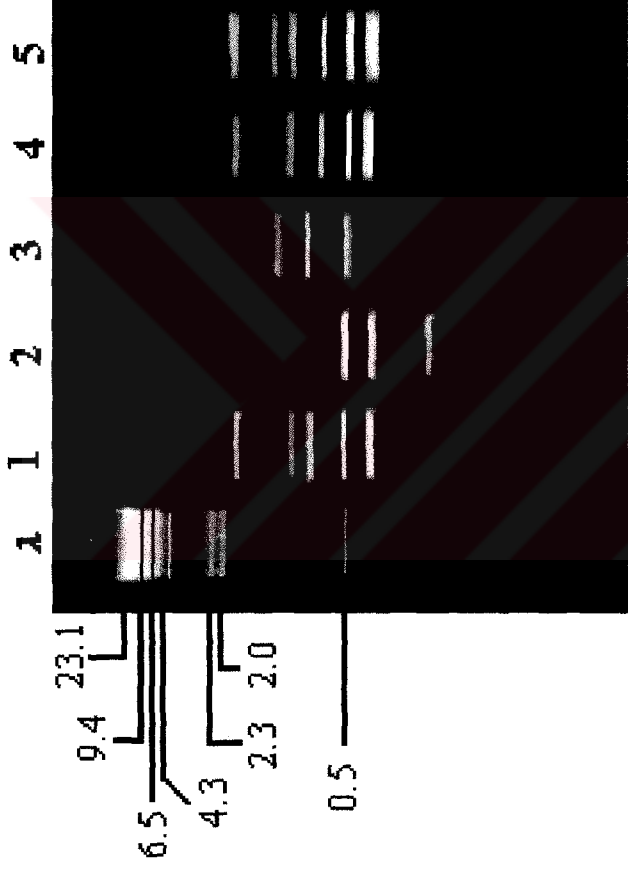


Şekil 4.2. Primer GYTE 3 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

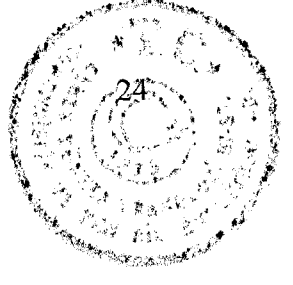


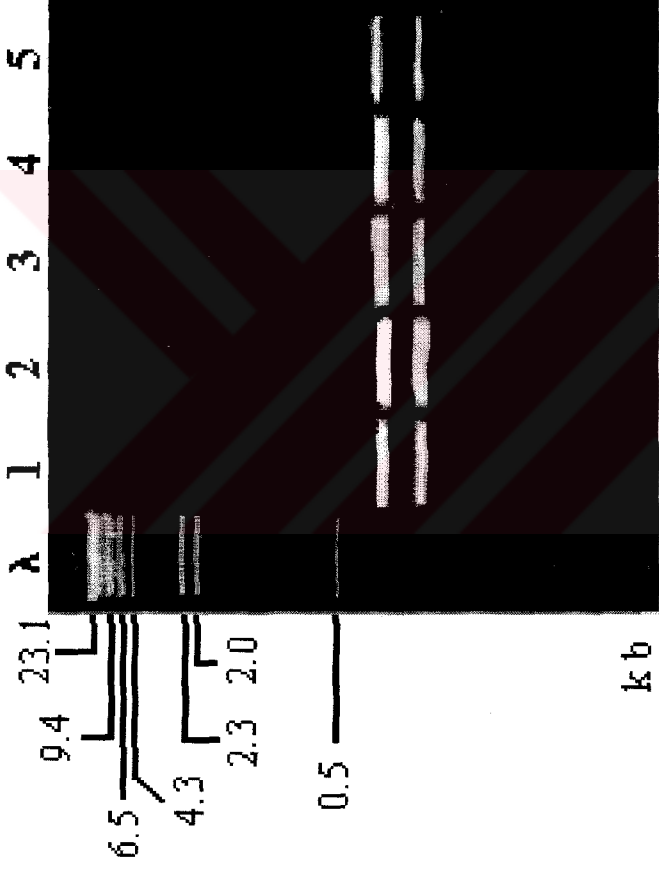
Şekil 4.3. Primer GYTE 6 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer , 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*



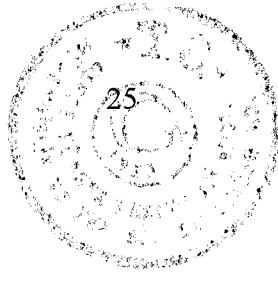


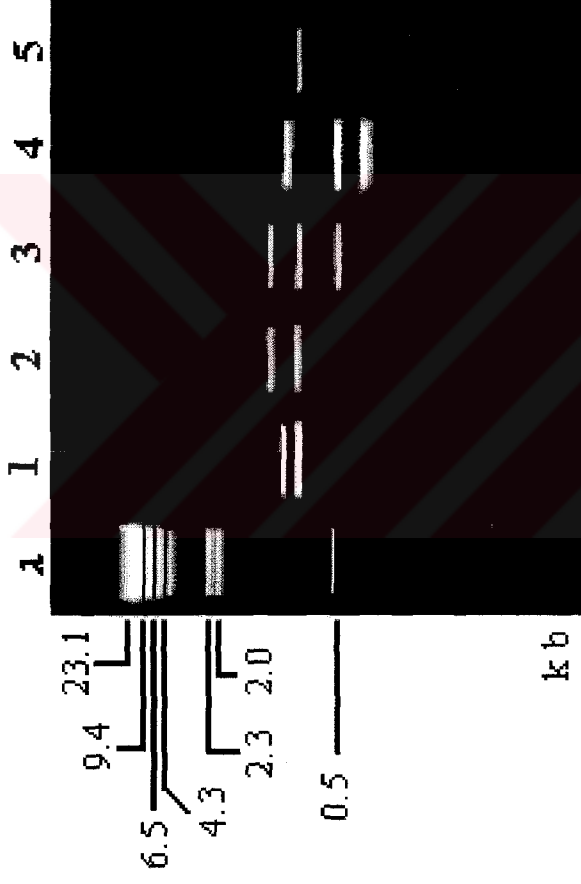
Şekil 4.4. GYTE 8 primeri kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer , 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*



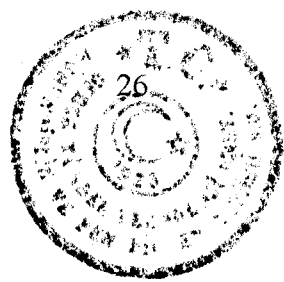


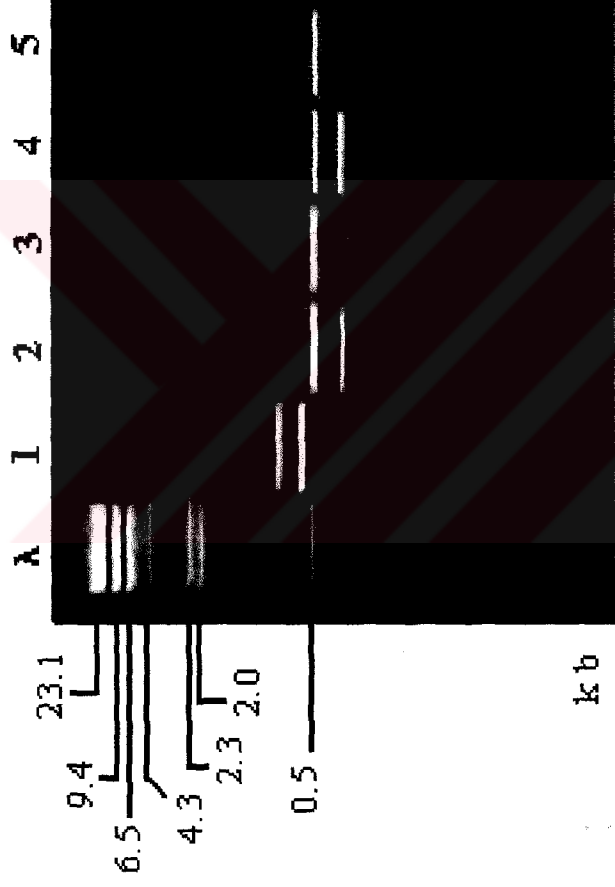
Şekil 4.5. Primer GYTE 9 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*



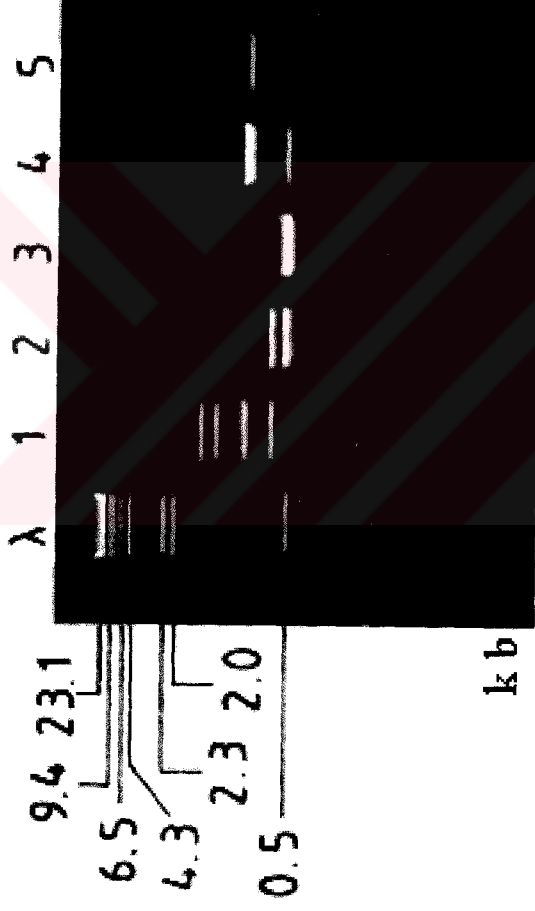


Şekil 4.6. Primer TUB 341 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

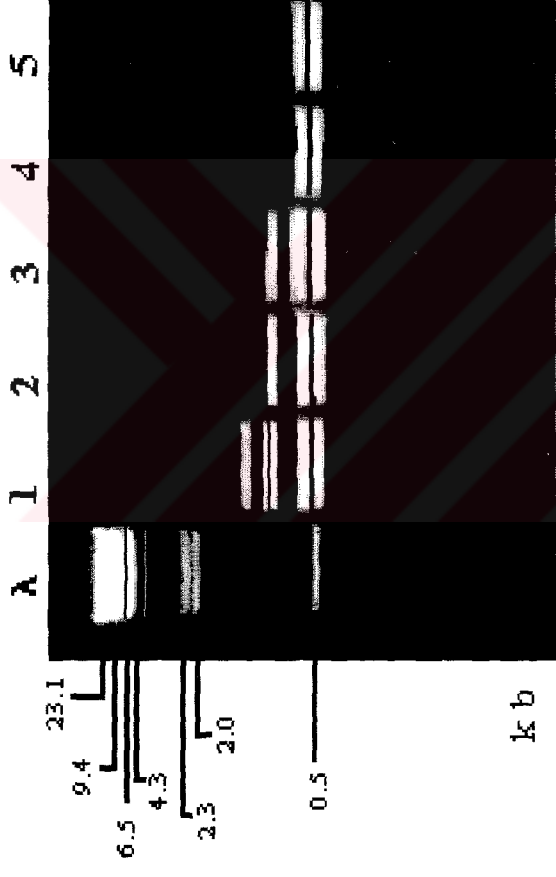




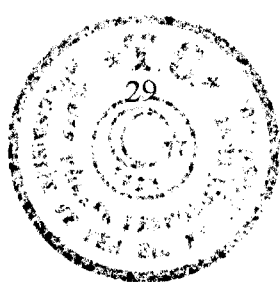
Şekil 4.7. TUB 357 primeri kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. PCR; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz ile gerçekleştirildi. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

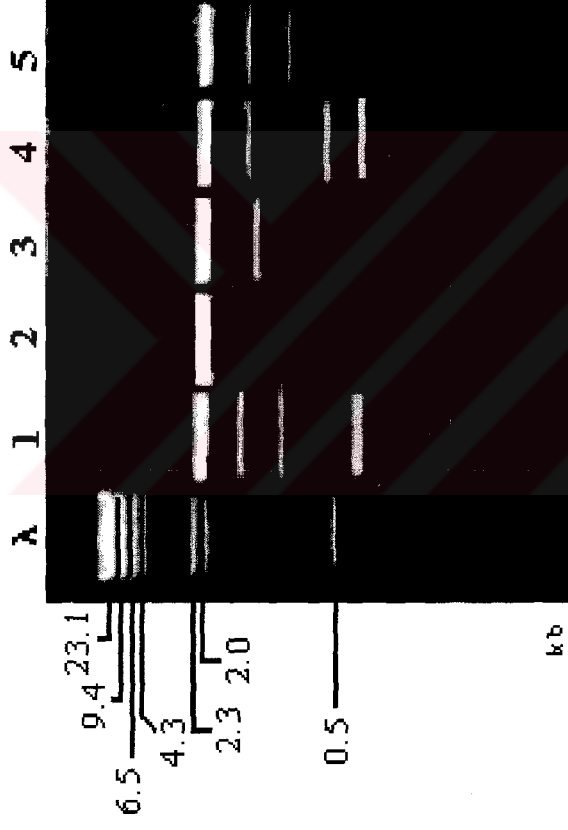


Şekil 4.8. Primer TUB 365 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

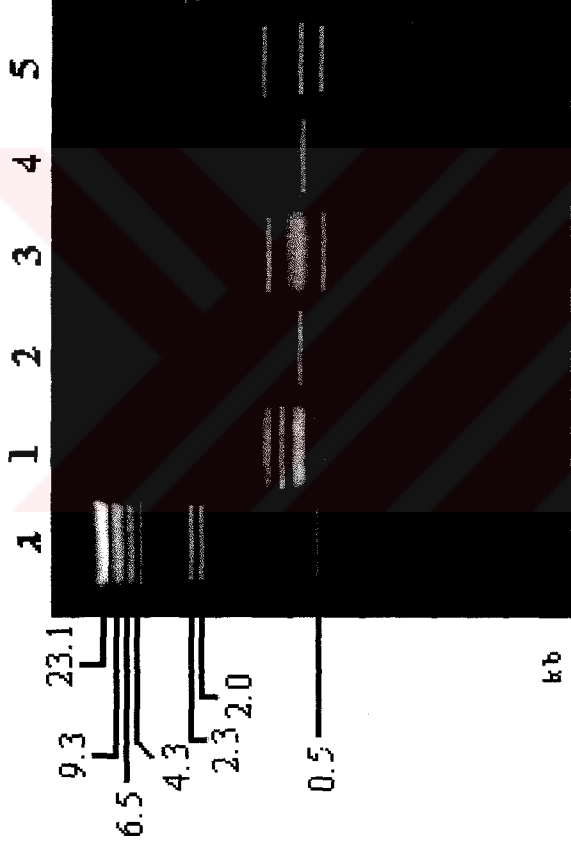


Şekil 4.9. Primer TUB 392 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

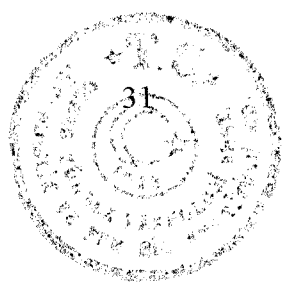


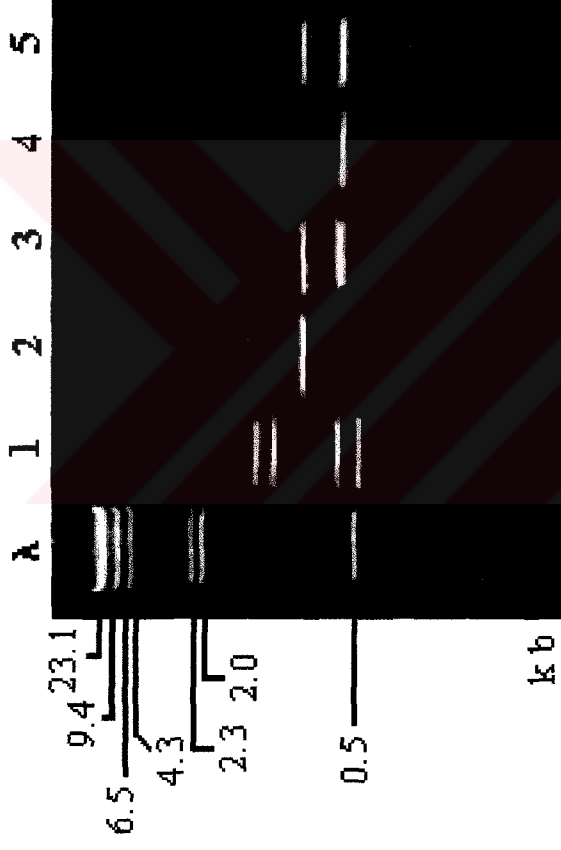


Şekil 4.10. Primer MAM 1 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

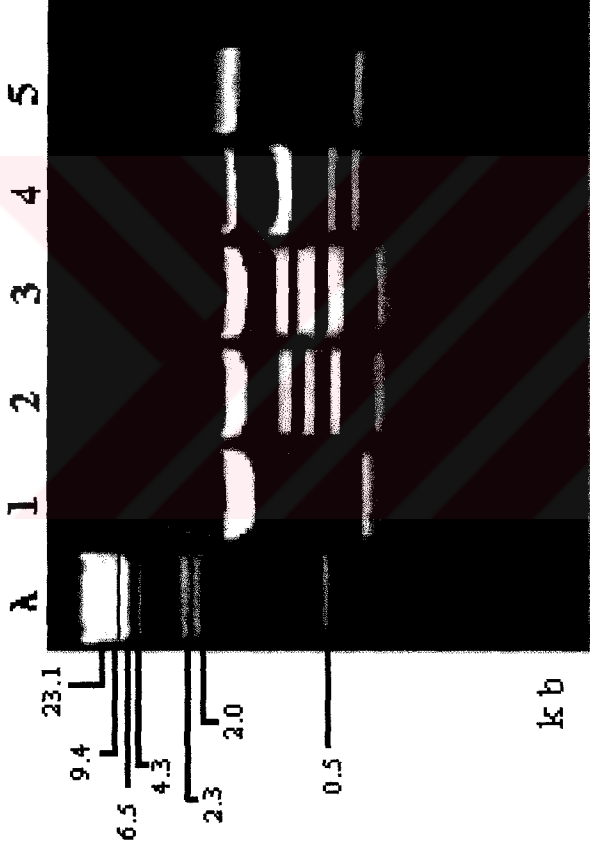


Şekil 4.11. Primer MAM 2 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*

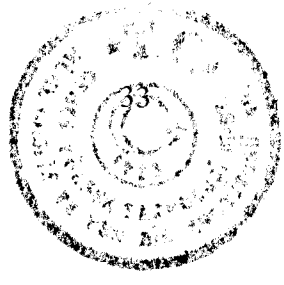




Şekil 4.12. Primer MAM 3 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*



Şekil 4.13. Primer MAM 4 kullanılarak çam türlerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Uygulanan PCR için; 100 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 100 ng primer, 200 µM dNTP karışımı, 1X Taq DNA polimeraz tamponu, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. PCR ürünleri % 1.2'lik agaroz jele 24 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 1.5 saat yürütüldü. λ. Hind III enzimi ile kesilmiş λ DNA, 1. *P. pinaster*, 2. *P. nigra*, 3. *P. sylvestris*, 4. *P. brutia*, 5. *P. pinea*



Çizelge 4.1. Şekil 4.2.'de GYTE 3 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	+	-
3	+	-	+	-	+
4	+	+	+	-	-
5	+	-	-	-	+
6	-	+	+	-	-
7	-	-	-	-	+

Çizelge 4.2. Şekil 4.3.'te GYTE 6 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	+	+	+	+
2	+	-	+	-	-

Çizelge 4.3. Şekil 4.4.'te GYTE 8 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	-	-	+	+
2	-	-	+	-	+
3	+	-	-	+	+
4	+	-	+	-	-
5	-	-	-	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	-	+	+
8	-	+	-	-	-

Çizelge 4.4. Şekil 4.5.'te GYTE 9 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+

Çizelge 4.5. Şekil 4.6.'da TUB 341 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	-	+	+	-	-
2	+	-	-	+	-
3	+	+	+	-	+
4	-	-	+	+	-
5	-	-	-	+	-

Çizelge 4.6. Şekil 4.7.'de 357 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

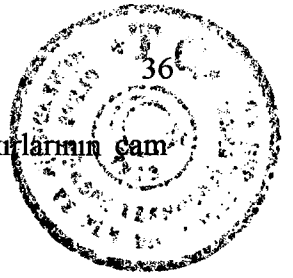
Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	+	+	+	+
4	-	+	-	+	-

Çizelge 4.7. Şekil 4.8.'de 365 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	+	+
4	+	+	-	-	-
5	-	+	+	+	-

Çizelge 4.8. Şekil 4.9.'da TUB 392 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+



Çizelge 4.9. Şekil 4.10.'da MAM 1 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+
3	-	-	+	-	-
4	+	-	-	-	+
5	-	-	-	+	-
6	+	-	-	+	-

Çizelge 4.10. Şekil 4.11.'de MAM 2 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	-	+	-	+
2	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+
4	-	-	+	-	+

Çizelge 4.11. Şekil 4.12.'de MAM 3 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	-	+	+	-	+
4	+	-	+	+	+
5	+	+	-	-	-

Çizelge 4.12. Şekil 4.13.'de MAM 4 primeri ile belirlenen RAPD markırlarının çam türlerine göre dağılımı

Markır	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
1	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	-
4	-	+	+	+	-
5	+	-	-	+	+
6	-	+	+	-	-



GYTE 3 primeriyle yapılan RAPD analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi sonrasında çekilen fotoğraflarında (Şekil 4.2.) 7 heteromorfik markır tespit edildi. 1. ve 7. sıradaki markırlar sadece *P. pinea*'da mevcutken 2. sıradaki markır da sadece *P. brutia*'da gözlemlendi. 3. sıradaki markırın hem *P. pinaster* hem *P. sylvestris* hem de *P. pinea*'da var olduğu gözlemlendi. 4. sıradaki markır *P. pinaster*, *P. nigra* ve *P. sylvestris*'te gözlemlendi. 5. sıradaki markır *P. pinaster* ile *P. pinea*'da gözlemlendi. 6. sıradaki markır ise *P. nigra* ve *P. sylvestris*'te gözlemlendi. Bu primer ile beş türü birbirinden ayırabilmekteyiz.

GYTE 6 primeri ile yapılan RAPD analizi sonucunda 2 farklı markır elde edildi. 1. markırın beş türde de varlığı izlendi. 2. sıradaki markır ise *P. pinaster* ve *P. sylvestris*'te belirlendi.

GYTE 8 primerinin kullanıldığı RAPD analizi sonucunda toplam 8 adet polimorfik markır tespit edildi. 1. sıradaki markır, *P. pinaster*, *P. brutia* ve *P. pinea*'da gözlemlendi. 2. markır *P. sylvestris* ve sıradaki 'da izlendi. 3. sıradaki markır, *P. pinaster*, *P. brutia* ve *P. pinea*'da izlendi. 4. sıradaki markır, *P. pinaster* ve *P. sylvestris*'te gözlemlendi. 5. sıradaki markır, *P. brutia* ve *P. pinea* türlerinde gözlemlendi. 6. markır beş çam türünde de belirlenen monomorfik bantlardır. 7. sıradaki markır, *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. brutia* ve *P. pinea*'da gözlemlendi. Bu primer ile beş çam türünü birbirinden aynı anda DNA düzeyinde ayırmayı sağlayacak markırlar elde edilmiştir.

GYTE 9 primerinin kullanıldığı RAPD analizi sonrasında beş türde de var olan 2 tane homomorfik bant elde edildi.

Yapılan RAPD analizlerinde TUB 341 primerinin kullanılması ile elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi sonrasında elde edilen jel fotoğrafından bu primer ile örneklerin 5 tane heteromorfik bant verdiği tespit edildi. Bu beş markırdan 1. si *P. nigra* ve *P. sylvestris*'te, 2.si *P. pinaster* ve *P. brutia*'da, 3. sü *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. sylvestris* ve *P. pinea*'da, 4. sü *P. sylvestris* ve *P. brutia*'da, 5. si ise sadece *P. brutia*'da gözlemlendi. Bu primerin sağladığı sonuçlarla çalışmada kullanılan

beş çam türünü birbirinden aynı anda DNA düzeyinde ayırmayı sağlayacak markırlar mevcuttur.

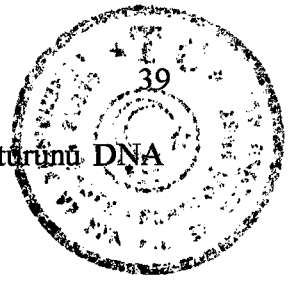
Çalışmada kullanılan TUB 357 primerinin RAPD analizi sonucunda 4 heteromorfik markır elde edildi. 1. ve 2. markırlar sadece *P. pinaster*'de gözlemlendi. 3. markır *P. nigra*, *P. sylvestris*, *P. brutia* ve *P. pinea*'da gözlemlendi. Bu primerle belirlenen bilgilere dayanarak 1. ve 2. markırların DNA düzeyinde *P. pinaster*'i diğer dört çam türünden ayırıcı nitelikte kullanabileceğimizi görmekteyiz.

TUB 365 primerinin kullanıldığı RAPD analizinde beş farklı markır elde edildi. Bu markırların 1. ve 2. si *P. pinaster*'de, 3. markır *P. pinaster* ve *P. pinea*'da, 4. markır *P. pinaster* ve *P. nigra*'da, 5. markır ise *P. nigra*, *P. sylvestris* ve *P. brutia*'da görülmüştür. 365 primeri ile de bu beş türü birbirinden DNA düzeyinde ayırmak mümkün olabilmektedir.

TUB 392 primeri ile yapılan RAPD analizi sonucunda beş farklı markır bulundu. *P. pinaster*'de bu beş markır bulunmaktadır. *P. nigra*'da ve *P. sylvestris*'te 3., 4. ve 5. sıradaki markırların bulunduğu tespit edildi. *P. brutia* ve *P. pinea*'da 4. ve 5. sıradaki markırlar tüm türler için monomorfikti. Bu primerle elde edilen 1. ve 2. markırın varlığı ile *P. pinaster*'i diğer dört çam türünden ayırmak mümkün olmaktadır.

MAM 1 primeri ile yapılan RAPD analizinde altı tane polimorfik markır elde edildi. 1. markır beş çam türünde de bulunmaktadır. 2. markır *P. pinaster*, *P. brutia* ve *P. pinea*'da, 3. markır sadece *P. sylvestris*'te gözlemlendi. 4. markır *P. pinaster* ve *P. pinea*'da, 5. markır sadece *P. brutia*'da, 6. markır *P. pinaster* ve *P. brutia*'da gözlemlendi.

RAPD analizlerinde primer olarak kullanılan MAM 2 ile sağlanan ürünlerin agaroz jel elektroforezi sonrası çekilen fotoğraflarından bu primerin dört tane markır verdiği saptandı. 1. markır *P. pinaster*, *P. sylvestris* ve *P. pinea* çamında, 2. markır sadece *P. pinaster*'de 3. markır tüm beş çam örneğinde, 4. markır ise *P. sylvestris* ve



P. pinea'da gözlendi. 2. markırın *P. pinaster*'de var olması ile bu çam türünü DNA düzeyinde diğer dört çam türünden ayırmak mümkündür.

RAPD analizinde MAM 3 primerinin kullanılması ile beş heteromorfik markır elde edildi. 1. ve 2. markır sadece *P. pinaster*'de, 3. markır *P. nigra*, *P. sylvestris* ve *P. pinea*'da gözlendi. 5. markır ise *P. pinaster* ve *P. nigra*'da belirlendi. *P. pinaster*'i diğer dört çam türünden DNA düzeyinde 1. ve 2. markır kullanarak ayırt edebiliriz.

MAM 4 primeri ile altı heteromorfik markır elde edildi. 1. markır tüm beş çam türünde gözlendi. 2. markır *P. nigra*, *P. sylvestris* ve *P. brutia*'da, 3. markır *P. nigra* ve *P. sylvestris*'te, 4. markır *P. nigra*, *P. sylvestris* ve *P. brutia*'da, 5. markır *P. pinaster*, *P. brutia* ve *P. pinea*'da, 6. markır ise *P. nigra* ve *P. sylvestris*'te gözlendi.

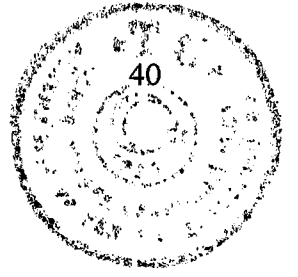
GYTE 3, GYTE 8, TUB 341, TUB 365 ve MAM 1 primerleri ile elde edilmiş olan, farklı konumlarda bulunan markırların varlığı ile beş çam türünde DNA düzeyindeki farklılıklar belirlenmiştir.

4. 4. Polimorfizm Değerlerinin Karşılaştırılması

Türler arasındaki DNA düzeyindeki polimorfizmi hesaplamada Nei ve Li'nin (1979) önerdikleri formül kullanıldı. Bu hesaplama sonrası en yüksek polimorfizm değerinin *P. nigra* ile *P. pinaster* arasında %52.75, en düşük polimorfizm değerinin *P. nigra* ile *P. sylvestris* arasında % 28.25 olduğu bulundu.

Çizelge 4.13. RAPD markırlarının değerlendirilmesi ile beş çam türü arasında hesaplanan polimorfizm oranları (%)

	<i>P. pinaster</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. brutia</i>	<i>P. pinea</i>
<i>P. pinaster</i>	-				
<i>P. nigra</i>	52.75	-			
<i>P. sylvestris</i>	50.50	28.25	-		
<i>P. brutia</i>	49.25	42.75	45.33	-	
<i>P. pinea</i>	37.75	46.92	38.42	36.17	-



5. TARTIŞMALAR

5. 1. DNA İzolasyon Metodunun Seçimi

Bu çalışmada bitki yapraklarından genomik DNA izolasyonu için Walbot (1998) ve Wagner ve arkadaşları (1987) ile Saghai-Maroo ve arkadaşlarının yöntemlerinin birleştirildiği iki farklı metod kullanılmıştır. Çam yapraklarından DNA izolasyonunda sadece Walbot (1988) yönteminin kullanılması ile hiçbir sonuç alınamamıştır. İkinci yöntemle göre yapılan izolasyondan ise 0.25 µg/µl-1 µg/µl arasında verimle DNA izole edilebilmiştir. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltilerde PEG (Polyethylene glykol) ve HTAB (Hexadecyltrimethyl amoniumbromide) 'ın bulunması ile, bitki DNA'larının çöktürülmesi ve saf olarak elde edilmeleri mümkün olmuştur.

Orman ağaçlarından DNA izolasyonunun özellikle polifenolik bileşiklerden dolayı zor olduğu bildirilmiştir (Hughes and Galau, 1988). Bitki dokularında mevcut olan polisakkaritler, izolasyon sırasında DNA'yı kontamine eden maddelerdir (Bendich et. al., 1979; Doyle and Doyle, 1987). DNA izolasyonunda hücreleri birbirinden ayırmak ve nükleik asitleri serbest hale geçirmek için homojenizasyon yapılır. Bu işlemler esnasında nükleik asitler, proteinler ve polisakkaritlerle kompleksler oluştururlar ve bunlardan bazıları yapışkan ve jelatinli matrikste DNA'ya geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar (Varadarajan and Prakash, 1991). Çoğu geleneksel bitki DNA saflaştırma metodları proteinleri uzaklaştırabilmelerine karşın polisakkaritlerin uzaklaştırılmasında etkili olamayabilirler (Edelman, 1975; Bendich et. al., 1979; Murray and Thompson, 1980; Doyle and Doyle, 1987; Ishi et. al., 1987). Aynı şekilde bitki DNA'sını saflaştırma metodları, bazı polisakkarit türlerini uzaklaştırmada etkili olmasına rağmen (Do and Adams, 1991; Demeke and Adams, 1992) kullanılan bu metodlarla uzaklaştırılamayan polisakkaritlerin mevcut olabileceğini Pandey ve Adams (1996) araştırmışlardır. RAPD analizlerinde kullanılacak asidik polisakkarit içeren türlerin DNA'larının saflaştırılmasında Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan), DMSO (Dimehyl Sulfoxide) veya PEG (Polyethylene glycol) kullanılması faydalıdır (Pandey et. al., 1996). Bizim çalışmamıza benzer



şekilde Rowland ve Nguyen (1993), bitki genomik DNA'sının saflaştırılması ve çöktürülmesi için PEG ve HTAB'ın kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Çalışmada izolasyon için çok az miktarda (0.5 g) yaprak alındığında daha iyi sonuçlar alınmıştır. 1 g yapraktan DNA izolasyonu yaptığımızda ezme çözeltisi kullanımından sonra çökelti çok fazla kalıyordu. Bu durumun, sonraki aşamalarda DNA'nın atılmasına, izolasyonun gerçekleşmemesine neden olduğu düşünülmektedir.

5. 2. RAPD Koşullarının Optimizasyonu

RAPD analizinde kullanılan bileşenlerin uygun miktarlarını tespit etmek için ilk olarak optimizasyon deneyleri yapıldı. $MgCl_2$ 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 ve 4 mM konsantrasyonlarında denendi. Primer, 50, 75 ve 100 ng miktarları kullanılarak RAPD analizleri için optimize edilmeye çalışıldı. DNA miktarlarında da 10, 25, 50 ve 100 ng olarak alınarak değişik konsantrasyonları denendi. Yapılan bu optimizasyon deneyleri sonrasında RAPD için uygun $MgCl_2$ konsantrasyonu 2 mM, primer konsantrasyonu 100 ng, DNA konsantrasyonu 100 ng olarak belirlendi. Primerin genomik DNA'ya bağlanma sıcaklığı 36°C olarak alındı. RAPD için belirlenen sıcaklık derecesi daha önce insan, mısır ve maya ile yapılan çalışmalarda da en uygun bağlanma sıcaklığı olduğu belirtilmiştir (Halward et. al., 1992; Klein-Lankhorst et. at., 1991). Bassam ve arkadaşları (1991) RAPD tekniği ile genetik parmak izi çıkarılmasında, PCR reaksiyonu şartlarının optimizasyonun gerekli olduğunu, genellikle, $MgCl_2$, primer ve genomik DNA'nın konsantrasyonlarının PCR üzerinde etkili olacağını bildirmektedir.

GYTE 3, GYTE 8, GYTE 6, TUB 392, TUB 341, TUB 365, TUB 357, MAM 1, MAM 2, MAM 3, MAM 4 primerleri ile polimorfik bantlar elde edildi. Çalışmada kullanılan TUB 365 primeri (5' GGACTGGAGT 3') ile materyal olarak kullanılan beş ayrı çam türünü DNA düzeyinde birbirinden ayırmak için kullanılabilecek polimorfik bantlar, GYTE 9 primeri ile ise homomorfik bantlar elde edildi. Çalışmada kullanılan diğer primerler ile çoğaltılan genomik DNA'lar, elektroforez analizi sonucu bant vermedikleri için değerlendirmeye alınmadılar. Bunun nedeninin, primerlerin kalıp DNA'da tamamlayıcı dizilerinin bulunmaması olduğu düşünülmektedir.



Daha önceden yapılan çalışmalar da çeşitli bitki türlerinde homomorfik ve heteromorfik bantların oluşabileceğini göstermiştir (Koller et. al., 1993; Moritz et. al., 1993). Yüksek oranda homomorfik bantlar organizmaların tür seviyesinde birbirlerine benzerliklerini, polimorfik bantlar ise türler (hatlar) arasındaki polimorfizmi tayin için kullanılabilmektedir (Cateano-Anolles, 1991). Çünkü polimeraz zincir reaksiyonu sonucu oluşan DNA bantlarının varlığı, sayısı ve çeşidinin, kullanılan primerlerin uzunluğuna, kalıp DNA molekülünün boyutuna, primerin taşıdığı dizilere ve tamamlayıcı özellikteki dizilerin genomda bulunmasına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Waugh and Powell, 1992).

Çam DNA örneklerinin çoğaltımında rastgele nükleotit dizisine sahip 31 adet primer kullanıldı. 10-22 nükleotit uzunluğundaki bu primerler % 40-70 Guanin-sitozin (GC) içeriğine sahiptir. Klein-Lankhorst ve arkadaşları(1991) ile Hu ve Quiros (1991) çeşitli sebze türlerinde yaptıkları RAPD çalışmalarında % 50-80 GC içeriğine sahip, 10-20 nükleotit uzunluğunda primerler kullanarak çok sayıda RAPD markırları elde etmişlerdir. Welsh ve McClelland (1990), %50'nin üstündeki GC içeriğinin ve PCR'da kullanılan düşük bağlanma sıcaklığının, primerin kalıp DNA ile yanlış eşleşme oranını arttırdığını ve daha fazla bölgeye bağlandığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada, düşük bağlanma sıcaklığı (36 °C) kullanılarak, PCR ürününün miktarı arttırılmaya çalışılmıştır.

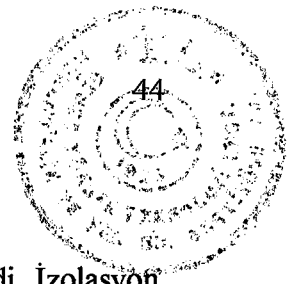
5. 3. Türler Arasındaki Polimorfizm Oranları

Çalışmada kullanılan beş farklı çam türü arasındaki en yüksek polimorfizm değeri % 52.75 ile *P. pinaster* ve *P. nigra* arasında, en düşük polimorfizm değeri ise % 28.25 ile *P. nigra* ile *P. sylvestris* arasında bulunmuştur.

Kaya ve Neale (1993) yaptıkları bir çalışmada *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* ve *Pinus brutia* alt türlerinde RAPD analizini kullanarak genetik polimorfizmin var olduğunu tespit etmişlerdir. Buna göre karaçam için polimorfizm oranı % 52.3, kızıl çamda % 41.6 olarak saptanmıştır. Yine yurdumuzda yapılan bir çalışmada tüm bölgelerimizde yaygın olarak yetişen arpanın yabani hatlarında polimorfizm oranları farklı çalışmalarda % 15-52 olarak belirlenmiş (Gürel, 1993 ; Çobanoğlu ve

ark., 1994 ; Arı ve ark., 1995) ve bu değerler zengin bir gen havuzu oluşturan yabancı Hordeum hatlarının özellikle gen izolasyonunda önemli bir potansiyel olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar da , RAPD markırları ile çam türleri arasında genetik çeşitliliğin varlığını ve oranını görmemizi sağlamıştır.





6. SONUÇLAR

Çam bitkisinin iğne yapraklarından DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon metodunda PEG ve HTAB kullanılması ile çam yaprağında mevcut olan fenolik maddeler ve polisakkaritler uzaklaştırılarak genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA, hem saflık oranı hem de miktarı yönünden RAPD analizlerinin gerçekleştirilmesi için uygun özelliklere sahipti.

Çalışmamızda kullanılan beş çam türünde otuz bir farklı primer kullanılarak RAPD analizleri yapıldı ve türler arası genetik polimorfizm oranları tespit edildi. En yüksek polimorfizm değerinin, *Pinus nigra* ile *Pinus pinaster* arasında %52.75, en düşük polimorfizm değerinin ise *Pinus sylvestris* ve *Pinus nigra* arasında % 28.25 oranında olduğu saptandı. Bu çalışmada çam yapraklarından DNA izolasyonu ve moleküler markır analizleri için geliştirilen yöntemler, çamlar üzerinde yapılacak moleküler çalışmalar ve genom analizleri yönünden katkılar sağlayacaktır.

RAPD analizinde kullanılan TUB 365 (5' GGACTGGAGT 3') primeri ile beş farklı çam türünü tek bir primerin varlığında moleküler düzeyde birbirinden ayırt etmede kullanılabilecek polimorfik bantlar elde edildi.



7. KAYNAKLAR

- Ahuja, M. R. 1983. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. *Silvia Genetica*, **32**, 3-4.
- Anşin, R. 1988. Tohumlu Bitkiler, Gymnospermae (açık tohumlular) Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi. Genel Yayın No: 122, Fakülte Yayın No: 15. Cilt, **130-163**.
- Arı, Ş., Bilgen, G., Çobanoğlu, G., Gürel, F., Gözükmızı, N. 1995. Determination of barley hybrids with molecular markers. *Cereal Research Communications*, **23**: (3) **229-234**.
- Ayberk, S. 1992. Tarımsal Ormancılık Tanımı, Önemi, Uygulama ve Araştırmalardan Örnekler. Kavak ve Hızlı Gelişen Yabancı Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü Dergisi. No: **18**, 7-32.
- Baribault, J. J., Scene, K. G. M., Scott, N. S. 1989. Genetic transformation of grapevine cells. *Plant Cell Reports*, **8**: **137-140**.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting and its potential application for genome analyses. *Current Topics in Plant Molecular Biology*, Vol 1, Ed: P. M. Gresshoff **8-16** Chapman and Hall, Newyork.
- Bendich, A.J., Anderson, R.S, Ward, L.B. 1979. Plant DNA: Long, pure and simple, p.31-33. In C.J.Leaver(E.D.), *Genom Organization and Expression in Plants*. Plenum Press, Newyork
- Bernatsky, R., Tanksley, S. D. 1989. Restriction fragments as molecular markers for germplasm and utilisation. *The use of Plant Genetics Resources*, Ed: A.D.H.Brawn, D.R.Marshall **353-362** Cambridge University Press, Cambridge
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R. L., Tanksley, S. D. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*, **120**: **1095-1103**.

Bothmer, R. von , Jacobsen, N., Baden, C. Laursen, L.I., Jorgensen, R.B. 1991. An ecogeographical study of the genus *Hordeum* systematic and ecogeographic studies on crop gene pools. 7. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, Mi H., Davies, R. W. 1980. Am. J. Human Genet., **32**, 314-331.

Brown, A. H. D., Weir, B. S. 1983. Measuring genetic variability in plant population. In isozymes in plant genetics and breeding. Part A. (Tanksley, S. D. ve Orton, T. J. eds.). Elsevier science publishers B.V., Amsterdam.

Burdon, R.D. 1994. The place of biotechnology in forest tree breeding. Proceedings IUFRO Conference Resolving Tropical Forest Resources Concerns Through Tree Improvement, Gene Conversation and Domestication of the new species. Oct, 9-18, Cali, Colombia **p.2-5**.

Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J., Gresshoff, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis (Review). Plant Mol. Biol. Reporter, **9**: (4) 294-307.

Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J., Gresshoff, P. M. 1992. Primer template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. Mol. Gen Genet., **235**: 157-165.

Carson, M. J., Burdon, R. D., Carson, S. D., Firth, A., Shelbourne, C. J. A., Vincent, T. G. 1990. Realising genetic gains in production forests. Paper 3.1. In breeding and genetic resources: Proceedings, joint meeting of Western Forest Genetics Associates and IUFRO Working Parties. S2.02.05, S2.02.06, S2.02.12, and S2.02.14 on Douglas fir, Controta pine, Sitka spruce, and *Abies* spp., Olympia, Washington, Augst 1990.

Carson, S. D., Richardson, T.E. 1995. Increased gain from tree improvement through DNA marker technology. NZ Institute of Forestry Conference, 3-5 May 1995.

Christie, C. B. 1978. Rapid propogation of aspen and silver poplar using tissue culture techniques. Proc. Int. Plant Prop. Soc., **28**, 255-260.

Coleman, G. D., Ernst, S. G. 1990. Shoot induction competence and callus determination in *Populus deltoides*. *Plant Science*, **71**, 83-92.

Couch, J. A., Fritz, P. J. 1990. Isolation of DNA from plants high in polyphenolic. *Plant Molecular Biology Reporter*, **8**: (1) 8-12.

Cregan, P. B., Bhagwat, A. A., Akkaya, M. S., Rongwen, J. 1994. *Meth. Mol. Cell. Biol.*, **5**: 49-61.

Çobanoğlu, G. 1994. Arpa genomunun moleküler analizi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep; version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1**: 19-21.

Demeke, T., Adams, R. P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques*, **12**: (3) 332- 334.

Devey, M. E., Bell, J. C., Smith, D. N., Neale, D. B., Moran, G. F. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers. *Theoretical Applied Genetics*, **92**: (6) 673-679.

Devey, M. E., Delfino-Mix, A., Kinloch JR., B. B., Neale, D. B. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to agene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 2066-2070.

Do, N., Adams, R. P. 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*, **10**: (2) 162-166.

Doebley, J. F., Goodman, M. M., Stuber, C. W. 1985. Isozyme variation in the races of maize from Mexico. *American Journal of Botany*, **72**: 629-639.

Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities for fresh quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, **19**: 11-15.

Edelman, M. 1975. Purification of DNA by affinity chromatography: Removal of polysaccharide contaminants. *Anal. Biochem.*, **65**: 293-297.

Epplen, J. T., In Chrambach, A., Dunn, N. J., Radola, B. J. 1992. (eds) *Advances in Elektrophoresis*. Vol 5, VCH, Cambridge, p. **59-112**.

Falconer, D. S. 1989. *Introduction to quantitative genetics*. Longman Scientific and Technical Essex., p. **438**.

Gates, P., Baulter, D. 1979. The use of seed isozymes as an aid to the breeding of field beans. *New Phytol.*, **83**: **783-791**.

Goodwin, P. H., Annis, S. L. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: (9) **2482-2486**.

Gorman, S. W., Roberts-Oehlschlager, S. L., Cullis, C. A., Teasdale, R. D. 1992. Producing a P1 bacteriophage library from pine: isolation and cloning of very high molecular weight DNA. *BioTechniques*, **12**: **722-727**.

Gottlieb L. D. 1981a. Electrophoretic evidence and plant population. *Prog. Phytochem.* **7**: **1-46**.

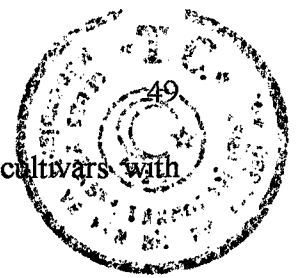
Graul, A. I. 1989. Automated gene amplification based on PCR technique. *Drug News and Perspectives*, **2**: (2) **94-98**.

Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., Owen, J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, **89**: **998-1006**.

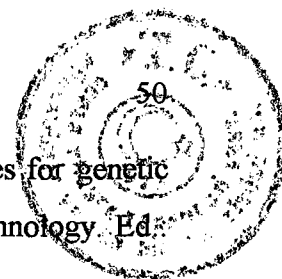
Gürel, F. 1993. *Arpada çeşitliliğın moleküler düzeyde tanımlanması*. Yüksek lisans tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Halward, T., Stalker, T., Larue, E., Kochert G. 1992. Use of single primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Molecular Biology*, **18** **315-325**.

Helentjaris, T., Webe, D., Wright, S. 1988. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analyses of restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, **118**: **353-363**.



- Hu, J., Quiros, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports*, **10**: 505- 511.
- Hubby, J. L., Lewontin, R. C. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **54**: 577-594.
- Ishi, K., Futaki, S., Uchiyama, H., Nagasawa, K., Andoh, T. 1987. Mechanism of inhibition of mammalian DNA topoisomerase 1 by heparin. *Biochem. J.*, **241**, 111-119.
- Kamm, A., Doudrick, R. L., Heslop-Harrison, J. S., Schmidt, T. 1996. The genomic and physical organization of Tyl-copia-like sequences as a component of large genomes in *Pinus elliotti* var. *elliotti* and other gymnosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2708-2713.
- Kaya, Z., Neale, D.B. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polymorphisms in *Pinus nigra subsp. pallasiana* and *Pinus brutia*. *Tr. J. of Agricultural and Forestry*, **29**: 295-306.
- Kayacık, H. 1980. Orman ve park ağaçlarının özel sistematığı, Cilt 1, Gymnospermae (Açık tohumlular), 4.baskı, İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları **2642/281**, Bozak Matbaası, İstanbul.
- Keim, P., Olson, T. C., Shoemaker, R. C. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet. Newsl.*, **15**: 150-152.
- Klein-Lankhorst, R. M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T., Zabel, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.*, **83**: 108-114.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M., Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **85**: 901-904.
- Landegren, U., Kaiser, R., Coskey, C. T., Hood, L. 1988. *Science*, **241**: 229-237.



Laurie, D. A., Snape, J. W., Gale, M. D. 1992. DNA marker techniques for genetic analyses in Barley: Genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. Ed. Shewry, P. R., The Alden Press Ltd. Oxford, p. **115-132**.

Maniatis, T., Fritsch E. F., Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, Newyork.

Messeguer, R., Arus, P. 1985. Electrophoretic identification of carnation cultivars. Can. J. Plant Sci., **65: 985-994**.

Moran, G. F., Bell, J. C. 1987. The origin and genetic diversity of *Pinus radiata* in Australia. Theor. Appl. Genet., **73: 616-622**.

Mori, M., Hasaka, K., Umemura, Y., Kandeda, C. 1993. Rapid identification of Japanese Potato cultivars by RAPDs. Japon J. Genet. **68: 167-174**.

Mullis, K. B., Faloona, F. A. 1987. Methods Enzymol., **155: 335-350**.

Murray, M. G., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nuc. Acids Research, **8: 4321-4325**.

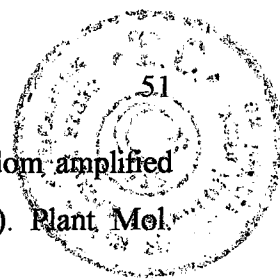
Neale, D. B., Devey, M. E., Jermstad, K. D., Ahuja, M. R., Alasi, M. C., Marshall, K. A. 1992. Use of DNA markers in forest tree improvement research. New Forests, **6: 391-407**.

Neale, D. B., Williams, C. G. 1991. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. Can. J. For. Res., **21: 545-554**.

Nei, M., Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76: 5269-5273**.

Neyişçi, T. 1987. Kızılçam. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları. Muhtelif Yayınlar Serisi: 52, El Kitabı Dizisi: **2. 13-14**.

Owen, J. L., Uyeda, C. M. 1991. Single primer amplification of avian genomic DNA detects polymorphic loci. Ann. Biotech., **2: 107-122**.
p. **23-33**. Forest Research Institute Library New Zealand.



Pandey, R. N., Adams, R. P., Flourney, L. E. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides (Commentary). *Plant Mol. Biology*, **14** (1) 17-22.

Pinkas, R., Zamir, D., Ladizinsky, G. 1985. Allozyme divergence and evolution in genus *Lens*. *Pl. Syst. Evol.*, **151**: 131-140.

Plomion, C., Omalley, D. M. 1996. Recombination rate differences for pollen parents and seed parents in *Pinus pinaster*. *Heredity*, **77**: (4) 341-350.

Quiros, C. F. 1980. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. *Crop Sci.*, **20**: 262-264.

Reiter, R. S., Williams, J. K.G., Feldmann, K. A., Rafalski, J. A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 1477-1481.

Rogers, S. O., Benedich, A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* **5**: 69-76.

Rowland, L. J., Nygen, B. 1993. Use of polyethylene glycol (PEG) for purification of DNA from leaf tissue of woody plants. *Biotechniques*, **14** (5): 734-736.

Saghai-Maroo, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 8014-8018.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

Shelbourne, C. J. A., Burdon, R. D., Carson, S. D., Firth, A., Vincent, T. G. 1986. Development plan for radiata pine breeding. Forest Research Institute, Rotorua, p. 142.

Smith, J. S. C. 1988. Diversity of United States hybrid maize germplasm; isozyme and chromatographic evidence. *Crop Science*, **28**: 63-69.

Szmids, A. E., Wang, X. R., Lu, M. Z. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L) using haploid tissue analysis. *Heredity*, **76**: (49) 412-420.

Şimşek, Y. 1993. Orman Ağaçları Islahına Giriş. Ormancılık Araştırma Enstitüsü yayınları. No: **65.269-286**.

Tanksley S. D., Jones R. A. 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids in tomato. *Hort Sci.* **16**: 179-181.

Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., Bonierbale, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding new tools for an old science. *Biotechnology*, **7**: 258-264.

Tossel, W. E. 1991. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). Annual Report, p. **4-5**.

Tunçtaner, K., Tulukçu, M., Toplu, F. 1986. Gemlik Yarımadasında Yerli ve Yabancı Kara çam (*Pinus nigra* Arnold.) Orjinlerinin Büyüme Yönünden Karşılaştırılmaları. Kavak ve Hızlı Gelişen Yabancı Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü Dergisi. Yıllık Bülten No: **22, 1-19**.

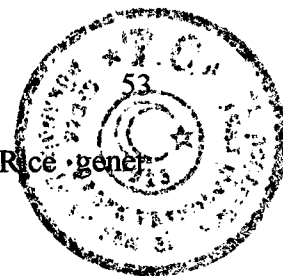
Uslu, S. 1988. Türkiye Ormancılığına Genel Bir Bakış. Kavak ve Hızlı Gelişen Yabancı Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü Dergisi. **1-34**.

Varadarajan, G. S. , Prakash. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from sweet potato and its related species (Protocol). *Plant Molecular Biology Reporter*, **9**: (1) 6-12.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kupier, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.*, **23 (21)** 4407-4414.

Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Maroo, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., Allardi, R. V. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2097-2100.

Wakamiya, I., Price, J., Jonston, S. 1993. *Am. J. Bot.*, **80**: 1235-1241.



- Walbot, V. 1988. Preparation of DNA from single rice seedlings. *Rice gene* Newslett., **5**: 149-151.
- Watkins, P. C. 1988. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) applications in human chromosome mapping and genetic disease research. *Biotechniques*, **6**: 310-320.
- Waugh, R., Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Tibtech*. **10**: 186-191.
- Webb, D. M., Knapp, S. J. 1990. DNA extraction from a previously recalcitrant Plant genus (Protocol). *Plant Molecular Biology Reporter*, **8**: (3) 180-185.
- Weeden N. F., Provvidenti, R. 1988. A marker locus, Adh-1, for resistance to pea enation mosaic virus in *Pisum sativum*. *The Journal of heredity*, **79**: 128-131.
- Weeden, N. F., Emmo A. C. 1985. Isosyme characterization of Kentucky bluegrass cultivars. *Can. J. Plant Sci*, **65**: 985-994.
- Weeden, N. F., Lamp, R. C. 1985. Identification of apple cultivars by isoenzyme phenotypes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **110**: 509-515.
- Weising, K., Nyborn, H., Wolff, K., Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and Fungi. CRC, Boca Raton, FL.
- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**: (24) 7213-7218.
- Wetter L. R., Kao K. N. 1976. The use of isozyme in distinguishing the sexual and somatic hybridity in callus cultures derived from *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **80**: 455-462.
- Wheller, N. C., Jech, K. S. 1992. The use of electrophoretic markers in seed orchard reseach. *New Forests*, **6**: 311-328.
- Whitkus, R., Deobley, J., Lee, M. 1992. Comparative genome mapping of sorghum and maize. *Genetics*,



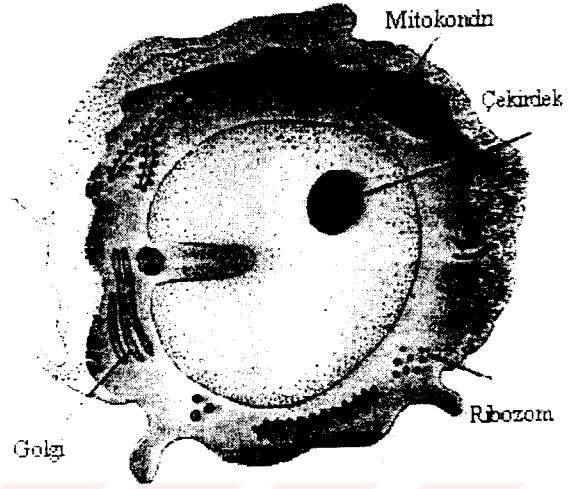
Williams, J. K. G., Kubelik, A. R., Livak, K.J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., 1990.
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Research, **18: (22) 6531-6535**.

Wilson, H. D. 1988. Quinoa biosystematics I: domesticated populations. Economic
botany, **42:461-477**.

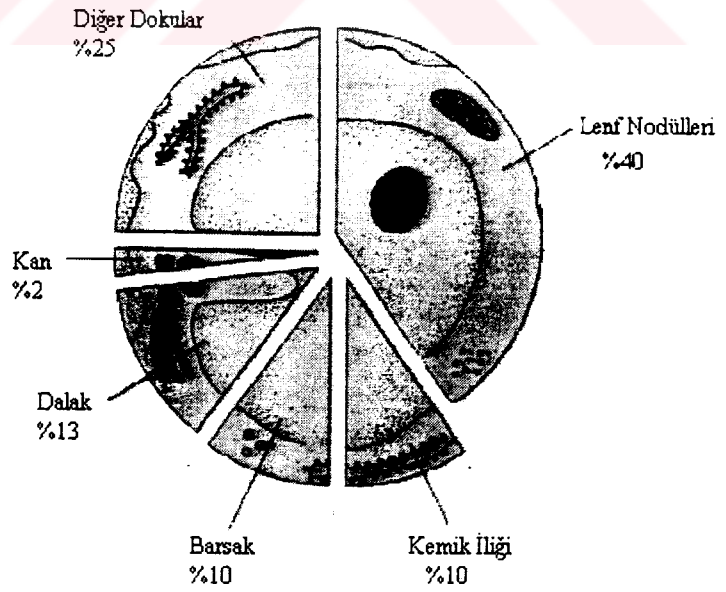
Zabeau, M., Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: A general
method for DNA fingerprintings. European Patent Application. Publ. 0534858A1,
European Patent Office, Paris.



yapan T lenfositleri ve hümmoral bağışıklık sisteminden sorumlu B lenfositleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Noyan, 1989).



a



b

Şekil 2.1.- Bir lenfositin genel yapısı (a) ve bulundukları organlara göre dağılım oranları (b).