

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

RAPD MARKERLERİYLE BAZI MANDARİN ÇEŞİTLERİNİN
TANILANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T 1081/1-1

Çiğdem GÖKSEL

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

1999

Antalya

**RAPD MARKERLERİYLE BAZI MANDARİN ÇEŞİTLERİNİN
TANILANMASI**

ÇİĞDEM GÖKSEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANANBİLİM DALI**

1999

**T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RAPD MARKERLERİYLE BAZI MANDARİN ÇEŞİTLERİNİN
TANILANMASI**

Çiğdem GÖKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

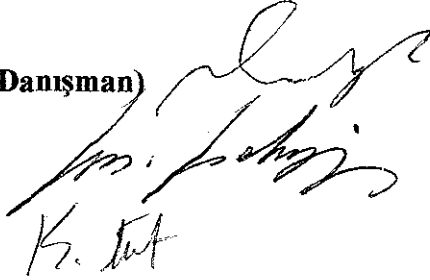
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14.2.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (3.5) not takdir edilerek
oybirliği/ oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU (Danışman)

Prof. Dr. Mustafa PEKMEZCİ

Doç. Dr. Kenan TURGUT



ÖZ

RAPD MARKERLERİYLE BAZI MANDARİN ÇEŞİTLERİNİN TANILANMASI

Çiğdem GÖKSEL

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Haziran 1999, 70 Sayfa

Bu çalışmada, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü koleksiyon parsellerinde bulunan Klemantin, Nova-I, Nova-II, Nova-III, Lee-I, Lee-II, Robinson, Kinnow ve Satsuma mandarinleri ile Minneola tanjelo çeşitlerinde RAPD yöntemi kullanılarak çeşitlerin birbirlerine yakınlık dereceleri belirlenmiştir. Çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Pomoloji Laboratuvarı, Doku Kültürü Laboratuvarı, Bitki Koruma Laboratuvarı ve Fakültenin Tarımsal Biyoteknoloji Labotuvvarında yürütülmüştür.

Turunçgil bitki dokularında bulunan polisakkarit, polifenol ve karbonhidratlar DNA ekstraksiyonuna ve DNA amplifikasyonuna engel olmaktadır. Bu nedenle 3 farklı ekstraksiyon yöntemi denenmiş, mandarin ekstraksiyonuna en uygun yöntemin Dellaporta yöntemi olduğu tespit edilmiştir.

Çeşitler arasındaki genetik farklılıkların saptanmasında en uygun RAPD parametreleri belirlenmiş ve bu parametreler kullanılarak çeşitler arasındaki genetik farklılıklar saptanmıştır. Çeşitler arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde, RAPD reaksiyonları için optimum DNA konsantrasyonu 50 ng, dNTP 5mM, primer 10 pmol, MgCl₂ 2.5 mM, PCR tamponu 2.5 µl (1x10 PCR tamponu) ve taq polimeraz konsantrasyonu ise 1.25 ünite olarak belirlenmiştir.

Çeşitler arasında en yüksek polimorfizm, Satsuma mandarini ile Minneola tanjelo çeşitleri ve Kinnow mandarini ile Minneola tanjelo çeşitleri arasında belirlenmiştir. Ayrıca Nova-III ile Lee- I çeşitleri ve Nova- II ile Robinson çeşitleri ise birbirine en yakın çeşitler olarak saptanmıştır.

Araştırma sonunda turunçgillerde, çeşit bazında genetik farklılıkların saptanmasında RAPD tekniğinin kullanılabileceği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Mandarin, moleküler markerler, RAPD, genetik farklılık

JÜRİ: Doç. Dr. Turgut YEŞİLOĞLU (Danışman)

Prof. Dr. Mustafa PEKMEZCİ

Doç. Dr. Kenan TURGUT

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF SOME MANDARIN VARIETIES BY RAPD MARKERS

Çiğdem Göksel

M. Sc. Thesis, Horticultural Department

June 1999, 70 Pages

In this research, the similarity matrix of Klemantin, Nova-I, Nova-II, Nova-III, Lee-I, Lee-II, Robinson, Kinnow, Satsuma mandarins and Minneola tangelo varieties grown in the University of Akdeniz, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture has been determined by RAPD markers. The studies were carried out in Tissue Culture Laboratory, Pomology Laboratory of the Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Akdeniz and the Laboratory of the Department of Plant Protection and Agricultural Biotechnology Laboratory of the Faculty.

Citrus tissues are rich in polysaccharides, polyphenols and carbonhydrates, these compounds interfere with DNA during extraction process. 3 different extraction methods, therefore were examined. At the end, Dellaporta's method was found to be most suitable DNA extraction method.

The most suitable RAPD parameters, which is used in the determination of genetic variation among varieties, were optimized and genetic variation among varieties was determined by using these parameters. In the determination of genetical variation among varieties, the optimum DNA concentration for RAPD reaction was 50 ng, dNTP 5mM, primer 10 pmol, $MgCl_2$ 2.5 mM, PCR buffer 2.5 μ l (1x10 PCR buffer) and the concentration of Taq polymerase was 1.25unit.

In the experiment, the highest polymorphisms were obtained between Satsuma and Minneola tangelo, and Kinnow and Minneola tangelo. In addition to this Nova-III

and Lee-I, and Nova-II and Robinson varieties were determined as the closest relative varieties

In conclusion, it was determined that RAPD technique can be used in determination of variation among citrus varieties.

KEY WORDS: Mandarin, Molecular markers, RAPD, Genetic Variation

COMMITTEE: Assoc. Prof. Turgut YEŞİLOĞLU

Prof. Dr. Mustafa PEKMEZCİ

Assoc. Prof. Kenan TURGUT

ÖNSÖZ

Ülkemiz Turunçgil yetiştiriciliğinin geliştirilmesi ve milli ekonomiye olan katkısının daha yüksek düzeye ulaştırılması, herşeyden önce sahip olduğumuz turunçgil gen potansiyelinin belirlenmesi, korunması ve değerlendirilmesine yönelik olarak yapılacak çalışmalara gereken önemin verilmesiyle mümkündür.

Islah çalışmalarında bitki genetik kaynaklarının etkin biçimde korunması ve kullanılması büyük önem taşır. Son yıllarda bu amaçla moleküler marker yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler yöntemlerden RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tür ve çeşitlerin birbirlerine yakınlıklarını ve çeşitler arasındaki varyasyonu tespit etmede kullanılan önemli bir tekniktir. Bu yöntem ıslah programlarının süresini önemli ölçüde kısaltmaktadır. Ayrıca bu teknik, diğer moleküler tekniklere göre ucuz, kolay ve güvenilirdir.

Bitki ıslahı ve genetiği açısından büyük önem taşıyan bu çalışmamın her aşamasında değerli bilgileriyle beni yönlendirip yardım ve desteğini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Turgut Yeşiloğlu' na, araştırma ile ilgili çalışma olanakları sağlayan Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. Mustafa PEKMEZCİ' ye, tez çalışmamın başından sonuna kadar yol gösterici uyarıları ve yardımları ile beni hep destekleyen sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Naci ONUS' a, araştırmanın moleküler çalışmalar kısmında yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Kenan TURGUT ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin BASIM' a, tüm çalışmalarım boyunca bana destek olan Uzman Hamide GÜBBÜK, Araş. Gör. Gülhan ERCAN, Araş. Gör. Melih TAŞKIN, Araş. Gör. Bilge KAYA' ya, tezimin jel fotoğraflarının çekimini gerçekleştiren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Araş. Gör. İbrahim AÇIKBAŞ' a, bu araştırmayı maddi yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığına ve çalışmalarım sırasında büyük bir özveri ve sabırla her yönden bana destek olan aileme, en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER	VII
KISALTMALAR	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
1 GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	5
2. 1. DNA İzolasyonu ve PCR ile İlgili Kuramsal Bilgiler	5
2. 1. 1. DNA İzolasyonu ile ilgili kuramsal bilgiler	5
2. 1. 2. Polimeraz zincir reaksiyonu RAPD ile ilgili çalışmalar	13
3. MATERİYAL ve METOT	25
3. 1. Bitki Materyali	25
3. 1. 1. Çeşitler	25
3. 2. Genomik DNA İzolasyonu	33
3. 2. 1. DNA miktarının spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesi	36
3. 3. RAPD yöntemi ile mandarin çeşitlerinin analizi	38
3. 3. 1. Primer	38
3. 3. 2. Enzim	39
3. 4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	39
3. 5. Agoroz Jel Elektforezi	40
3. 6. RAPD Çalışmalarında Kullanılan İstatiksel Analizler	41
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	42
4. 1. RAPD Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar	42
4. 1. 1. DNA ekstraksiyonu ve konsantrasyonuna ilişkin sonuçlar	42
4. 1. 2. RAPD parametrelerinin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar	44
4. 1. 3. Değişik mandarin çeşitleri arasında varyasyonların saptanmasına ilişkin sonuçlar	48
5 SONUÇ	60
6 ÖZET	62
7 SUMMARY	64
8 KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

ng	Nanogram
rpm	Devir/ dakika
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromol
μ g	Mikrogram
mM	Milimolar
pmol	Pikomol
nm	Nanometre
mm	Milimetre
gr	Gram
mg	Miligram
L	Litre
ml	Mililitre
M	Molar
kb	Kilobase
bp	Basepair
cm	Santimetre
°C	Santigrad derece
V	Volt
A	Amper
MgCl ₂	Magnesium klorür
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür

Kısaltmalar

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
A-T	Adenin- Timin
BME	β - Mercaptoetanol
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	De oxyriborueleoside 5' - triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetracetate
G-C	Guanin- Sitozin
PCR	Polimeraz chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
Rnase	Ribonülease
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSR	Simple Sequence Repeat
STMSs	Anchored- microsatellite sites
TAE	Tris asetat-EDTA tamponu
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris- EDTA tamponu
UPGMA	Unweighted pair group method of arithmetic analysis
UV	Ultra viole ışınları
VNTRS	Variable number tandem repeats

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar	35
Çizelge 3.2.	RAPD analizinde kullanılan 10 nükleotid uzunluğundaki primerler	38
Çizelge 3.3.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu' nda kullanılan RAPD parametreleri	39
Çizelge 3.4.	Agoroz Jel elektroforezinde kullanılan tamponlar	41
Çizelge 4.1.	Değişik mandarin çeşitlerine ait DNA örneklerinde A_{260} nm'de okunan absorbans değerleri ve çeşitlere göre saptanan DNA miktarları	43
Çizelge 4.2.	Değişik Mandarin çeşitlerinde, farklı primerlerle saptanan toplam bant sayıları	50
Çizelge 4.3.	PCR amplifikasyonu sonucu değişik mandarin çeşitlerinde Sigiura ve ark. (1988)' na göre oluşturulan benzerlik indeksi değerleri(%)	52
Çizelge 4.4.	Değişik mandarin çeşitlerine ait benzerlik indeksi dikkate alınarak hesaplanan polimorfizm değerleri	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1. Materyal olarak genç yaprakların alındığı Satsuma ağacının görünümü 27
- Şekil 3.2. Materyal olarak genç yaprakların alındığı Klemantin ağacından bir görünüm 29
- Şekil 3.3. DNA ekstraksiyonunda kullanılan yaprakların alındığı genç sürgünler 34
- Şekil 3.4. DNA ekstraksiyonunda sıvı azot uygulamadan önceki genç yaprakların görünümü 36
- Şekil 4.1. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A02 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (soldan- sağa; , Marker (Hae III), 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, 10: Satsuma) PCR ürünleri % 1.5 agoroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforezis 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir 55
- Şekil 4.2. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A11 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (soldan -sağa; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Minneola tanjelo, 5: Kinnow, 6: Lee-II, 7: Nova-II, 8: Nova-I, Marker (1 kb DNA ladder)) PCR ürünleri % 1.5 agoroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforezis 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir 56
- Şekil 4.3. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A04 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (sağdan- sola; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, Marker (1 kb DNA ladder)) PCR ürünleri % 1.5 agoroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforezis 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir 56
- Şekil 4.4. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A06 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (sağdan -sola; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, 10: Satsuma, Marker (1 kb DNA ladder)) PCR ürünleri % 1.5 agoroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforezis 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir 57

Şekil 4.5	Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A13 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (soldan- sağa; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, 10: Satsuma, Marker (Hae III)) PCR ürünleri % 1.5 agoroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforezis 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir.....	57
Şekil 4.6.	RAPD amplifikasyonu ürünlerinden Cluster (UPGMA) analizi kullanılarak oluşturulan değişik mandarin çeşitlerine ait dendogram	58

1. GİRİŞ

Turunçgillerin bol miktarda vitamin ve yararlı besin maddeleri içermeleri yanında, meyvelerinin çok yönlü olarak kullanılabilmesi nedeniyle dünyada üretim ve tüketimleri gün geçtikçe artmakta ve ticaret hacmi bakımından 1 sırayı almaktadırlar. Dünyanın toplam turunçgil üretimi 1997 yılında 84.717.000 ton dolayında olup, Türkiye 1.877.900 ton ile Dünyada 9 sırada, Akdeniz ülkeleri içerisinde 7 sırada yer almaktadır. Ülkemiz, Turunçgil üretiminin % 88,38 i Akdeniz bölgesi, % 10,93 ü Ege bölgesi, % 0,69 u da diğer bölgelerimiz özellikle Doğu Karadeniz bölgesinden karşılanmaktadır (ANONİM 1996, ANONYMOUS 1997).

Turunçgil meyveleri üretimimizin taze meyve üretimi içerisindeki payı % 15 dolaylarında, toplam meyve ihracatımızdaki payı ise % 80 kadardır. Bu da turunçgil yetiştiriciliğinin Ülkemiz ekonomisindeki önemini daha açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Türkiye turunçgil üretiminin 890.000 tonu portakal, 450.000 tonu mandarin, 401.000 tonu limon, 75.000 tonu altıntop ve 3.750 tonu turunçtur (ANONİM 1996).

Turunçgillerin ilk defa M. Ö. 500' lü yıllarda kültüre alındığı sanılmaktadır (Anonim 1975). Bugüne kadar geçen binlerce yıllık süre içerisinde turunçgil türleri seleksiyon, doğal hibritleme ve spontan mutasyonlar vasıtasıyla karışmış, yeni tür ve çeşitler ortaya çıkmıştır. Bunlar da turunçgillerde geniş bir tat, asitlik, renk, şekil ve irilik çeşitliliği sağlamıştır.

Turunçgiller taksonomisinde birkaç tane hipotez vardır. Swingle 16 dan fazla tür bulunmadığını, Tanaka ise 159 tür bulunduğunu iddia etmektedir (Luro 1992, Swingle 1943). Barret ve Rhodes ile Scora 146 numerik, fenotipik özellik ve izoenzim analizlerine dayanarak turunçgilleri iki ana gruba ayırmaktadırlar. Buna göre I. Grup *C. aurantium*, *C. grandis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* ve *C. sinensis* olmak üzere 5 türü; II. Grup ise *C. aurantifolia*, *C. lemon* ve *C. medica* olmak üzere 3 türü kapsamaktadır. Bu araştırmacılar ayrıca turunçgillerin ana vatanında bulunduğu için Ağaç kavunu (*C. medica*), Şadok (*C. grandis*) ve Mandarin (*C. reticulata*) türlerini gerçek tür diğerlerini ise hibrit kabul etmektedir (Green 1986, Luro 1992, Torres 1978, Yamamoto 1993).

Turunçgillerde yaygın olarak kullanılan aşılama ve nüseller embriyonu ile vejetatif çoğaltmada, bitkinin somatik hücreleri aynı yapıda olduğundan, oluşan bitkilerin genotipi mutasyon olmamışsa ebeveyn ile aynıdır. Buna karşılık, yeni gen kombinasyonları veya değişimleri ebeveyn ile döller arasında genetik farklılıkların nedenleridir. Bir bitkinin gelişimi sırasında, somatik hücrelerin genetik benzerliğine karşın, çevre koşulları nedeniyle doku ve organ farklılıkları görülebilmekte ve kalıcı olmayan değişikliklerden dolayı kalıtsal değişimlerin analizleri güçleşmektedir. Ortam koşulları, tohumdan çoğaltmayı izleyen uzun gençlik kısırlığı dönemi ve virüs hastalıkları, karakterlerde önemli değişiklikler yapabildiği için yeni bir çeşidin genetik evaluasyonu çeşitli yörelerde uzun süreli gözlemlere gereksinim göstermektedir (Cameron 1968).

Islah yöntemlerinden biri olan seleksiyon ıslahına turunçgillerde 1980' li yıllardan itibaren çok önem verilmektedir. Verimlilik unsuru yanında, çeşide özgü özelliklerin korunmasında aşı gözü seleksiyonu önemlidir. Mutasyonların turunçgil ağaçlarında çok sık meydana gelmesi nedeniyle, iyi ve kötü yönde olanların izlenmesi ve iyi olanlardan yararlanma yoluna gidilmesi, üzerinde titizlikle durulması gereken bir konudur.

Turunçgillerde mutasyon meydana gelme sıklığının diğer meyvelere göre fazla olması nedeniyle bir çeşitte bile mutasyon sonucu birçok farklı tip oluşabilmektedir. Bundan dolayı, oluşan mutantların fenotipine bakarak gen kaynakları konusunda bir fikre varılması oldukça güçtür ve uzun zaman almaktadır.

Turunçgil çeşitleri arasındaki farklılığı tespit etmek için birçok araştırmada yaprak eterik yağlarının gaz kromatografisindeki analizleri, flavanonların kalitatif analizleri, flavanon glikozitlerin likit kromatografideki analizleri ve izoenzim analizleri yapılmıştır. Bununla beraber, bu analizler ebeveynleri arasında benzerlik bulunan bitkilerin ayırd edilmesinde başarılı olmamaktadır (Torres 1978, Sugawara 1995). Başarıyı yakalayabilmek için bitki ıslahı ve bitki genetiğinin çeşitli alanlarında DNA markerleri kullanılmaktadır. DNA markerleri kantitatif biyoloji içerisinde pek

çok sorunun cevaplamasında önemli bir araç olmuştur (Onus 1996). Moleküler düzeyde DNA markerleri organizmalar arasındaki genetik ilişkiyi anlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tüm ıslah yöntemlerinde amaç genetik ilerlemedir. Bu ilerleme çeşitlerin genlerinin moleküler düzeyde saptanmasıyla daha kolay ve kısa sürede sağlanabilir. Ayrıca bu şekilde, değişik ıslah yöntemleri ve doğal olarak bugüne kadar elde edilmiş tür, çeşit ve tiplerin genotipleri ve ebeveynleri hakkında kesin bilgiler elde edilmektedir. Turunçgillerde bu amaçla Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Variable Number of Tandem Repeat (VNTR), Simple Sequence Repeat (SSR), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Sequence- Tagged Microsatellite Sites (STMSs), Minisatellite, CAPS ve Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) gibi yöntemler kullanılmış ve bu yöntemlerle tür ve çeşitlere bağlı olarak başarılar elde edilmiştir (Luro 1992, Rafalski 1993, Yamamoto 1993, Deng 1995, Sugawara 1995, Machado 1996, Russo 1996).

Bu teknikler, ayrı genotipe sahip bireylerin gen haritalarının çıkartılmasında, türler arasındaki akrabalığın ortaya konmasında, çeşit ayırımında, doku kültürü ile çoğaltılan bitkilerde meydana gelen somaklonal varyasyonların ve polimorfizmin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Deng 1995, Machado 1996). RFLP ve RAPD teknikleri moleküler düzeyde en fazla kullanılan tekniklerdir. Genetik çeşitliliğin saptanmasında, DNA markerlerinin kullanımı ilk kez 1980' li yıllarda Restriksiyon Fragmenti Büyüklük Polimorfizmi (RFLP) tekniğinin geliştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. RAPD tekniği ise ilk olarak Williams ve ark. tarafından 1990 yılında bulunmuştur.

RFLP markerleri germplasmin değerlendirilmesi için RAPD markerlerine göre bazı avantajlara sahiptir. RFLP kodominantdır böylece her iki ebeveyn allelleri belirlenebilir. RAPD fragmentleri ise dominant davranır ve sadece tek bir ebeveynin alleli belirlenebilir. Bu farklılığın bir sonucu olarak RFLP ile heterozigot rekombinantlar ebeveynlerden ayırt edilirken RAPD ile ayırt edilemezler (Ercan 1998). RAPD fenotipinin kullanımında karşılaşılan bir güçlükte gözlenen bant yoğunluğudur.

Bu dezavantajların yanında RAPD tekniğinin RFLP' ye göre birçok avantajları bulunmaktadır (Cartens 1990). RAPD tekniğinde nanogram düzeyinde, RFLP' de ise mikrogram düzeyinde genomik DNA' ya ihtiyaç duyulmaktadır. Deneysel açıdan RFLP tekniği RAPD tekniğine göre daha zordur. RAPD tekniğinde primerler tesadüfi olarak seçilmekte, RFLP' de ise primerlerin seçiminde belirli bir sekans bilgisine gereksinim duyulmaktadır. RAPD tekniğinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünleri agarose jel üzerinde ayrıştırılarak etidyum bromid ile boyandıktan sonra ultraviyole (UV) ışık kaynağı altında görüntülenmekte, RFLP' de ise DNA problemlerinin radyoaktif madde ile işaretlenmesi gerekmektedir. Non radyoaktif madde ile de işaretlenebilir, fakat bu maliyeti daha da arttırmaktadır. RAPD tekniğinin uygulanması aşamasında, RFLP' ye göre daha az teknik bilgiye gereksinim duyulmakta ve daha kısa zamanda sonuçlandırılmaktadır (Rafalski ve Tingey 1993).

Bu araştırmada, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü koleksiyon parsellerinde bulunan Nova I, Nova II, Nova III, Lee I, Lee II, Satsuma, Klemantin (SRA 90), Kinnow ve Robinson mandarinleri ile Minneola tanjelo biyoteknolojik yöntemlerden RAPD tekniği kullanılarak çeşitlerin birbirlerine yakınlık derecelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu tekniğin geliştirilmesi ile ıslah çalışmalarında kolaylık sağlanacağı gibi özellikle üreticilerimiz tarafından Ülkemize girişi yapılmış çeşitler ile mevcut çeşitlerden mutasyon sonucunda meydana gelen farklı farklı tiplerin tanımlanması da yapılabilecektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2. 1. DNA İzolasyonu ve PCR ile ilgili Kuramsal Bilgiler

2. 1. 1. DNA İzolasyonu ile ilgili kuramsal bilgiler

Bitki dokularından saf DNA izolasyonu oldukça zordur. Turunçgil bitki dokuları polisakkaritler, polifenoller ve karbonhidratlarca zengindir ve bu maddeler DNA izolasyonunu güçleştirirler. DNA yeterince saf değilse PCR sonucunda amplifikasyon gerçekleşmez (Luro 1992). Fenol ve kloroformun kullanıldığı yöntemlerle saf DNA elde edilebilmektedir. Fenol iyi bir temizleyicidir. Kloroform ise proteinleri çözmektedir. Kloroformun çözemediği proteinler isoamil tarafından çözülmektedir. Fenolik bileşiklerden tamamen temizlenmemiş DNA' da kahverengileşme meydana gelmektedir. Bunu önlemek için 5-10 mM β - mercaptoetanol (BME) kullanılmaktadır (Deng vd 1996).

Bitki dokularından DNA izole etmek için çok farklı izolasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Her yöntemde kullanılan kimyasallar da birbirinden farklılık göstermektedir. Bu kimyasallar arasında cetyltrimethylmoniumbromide (CTAB) (Deng vd 1995, Machado vd 1996, Galdrisi vd 1998), sarkosyl (Machado vd 1996), polyvinylpyrrolidone (PVP) (Deng vd 1995, Uzun vd 1998), polyethylene glycol (PEG) (Ortiz vd 1997), proteinaz K (Varghese vd 1997) ve Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pammi vd 1994) yer almaktadır.

RNA' yı elimine etmek için RNase enzimi, proteinleri elimine etmek için proteinaz K enzimleri kullanılmaktadır.

Turunçgillerde saf DNA izolasyonu için farklı yöntemler kullanılabilir. Özellikle Doyle ve Doyle (1987), Dellaporta ve ark (1983), Murray ve Thompson (1980)' ın yöntemlerinde yapılan küçük modifikasyonlarla DNA izolasyonu kolaylıkla yapılabilir.

Gawel ve Jarret (1991), muzlarda DNA ekstraksiyonu ile ilgili olarak çalışmış ve ekstraksiyon tamponu olarak % 2 CTAB, 100 mM Tris- HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl,

20 mM EDTA, % 1 BME kullanmışlardır. Araştırma sonunda, yaprakların oldukça genç olmasının ve orta damarının alınmış olmasının DNA ekstraksiyonunda başarıyı etkilediği saptanmıştır.

Luro vd (1992), Citrus, Fortunella ve Poncirus cinsine ait 18 farklı bitki üzerinde PCR yapmışlardır. Toplam DNA turuncgil bitkilerinden alınan taze yapraklardan Doyle ve Doyle (1987) metoduna göre ekstrakte edilmiştir. DNA ekstraksiyonu turuncgiller gibi polisakkarit veya polifenollerce zengin bitkilerde oldukça güç olmasına rağmen bu zorluklar uygun ekstraksiyon yöntemi tespit edilerek aşılmıştır.

Yang ve Quinos (1992), Hu ve Quiros' un yöntemiyle kereviz çeşitlerinden alınan taze yaprak materyalini ekstrakte etmişlerdir. DNA konsantrasyonu Beckman spektrofotometresiyle 260 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Pammi vd (1994), Süpürge darısı (*Sorghum bicolor ssp bicolor*) genotiplerinden BTx623 ve IS3620C' yi melezlemiş ve F₁, F₂, F₃ populasyonlarını elde etmişlerdir. Genç yapraklar 15 günlükken hasat edilmiş, sıvı azotta dondurulmuş ekstraksiyona kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA Gustincich ve ark (1991)' nin yöntemine göre izole edilmiştir. Ezilen yaprakların üzerine % 8' lik ekstraksiyon tamponu (1.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6), 20 mM DTT, % 1 PVP, % 0.05 askorbik asit ve % 1 SDS) (1: 3 w/v) oranında ilave edilmiştir. Solüsyon 68 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra kloroform ve 5 M Ammonium asetat ilave edilmiştir. DNA peletleri % 50' lik Etanolle yıkanmış ve TE tamponunda (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA) çözülmüştür. DNA örneklerine proteinase K' nın (50µg/ml) uygulanmasından sonra örnekler 2-3 kez fenol: kloroform: isoamylalkol (25: 24:1) ve etanol uygulanmıştır. DNA peleti kurutulmuş üzerine TE tamponu eklenmiş ve çözdürülmüştür. DNA konsantrasyonu TKO-100 mini fluometresiyle saptanmıştır. DNA kalitesi % 0.6' lık Agaroze jel üzerinde kontrol edilmiş ve 4 ng/µl suda sulandırılmıştır.

Albayrak vd (1995), Nohut ve Arpa' da RAPD markerleriyle parmakizi oluşturmaya çalışmışlardır. Arpa ve Nohut bitkilerine ait tohumlar saksılarda çimlendirildikten sonra, kesilen taze yapraklardan Walbot yöntemine göre DNA' lar izole edilmiştir. Yabani maya tipinin DNA' sı da Wright vd (1986)' nın geliştirdikleri yönteme göre bir gecelik taze kültürden izole edilmiştir.

Deng vd (1995), *in vivo* ve *in vitro* koşullarında yetiştirilmiş limon mutantlarını RAPD markerleriyle tanılamışlardır. Bu çalışmanın ekstraksiyon aşamasında Doyle ve Doyle (1987) metodunu kullanılmıştır. 0.5- 1gr yaprak örnekleri sıvı azotla iyice ezilmiş ve toz haline getirilmiştir. Bunun üzerine daha önceden 60 °C' de ısıtılmış CTAB ekstraksiyon tamponu (% 3 CTAB, 1.4 M NaCl, % 0.2 β-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris- HCl pH: 8.0 ve % 1 PVP) ilave edilmiş ve karışım cam tüpe aktarılmıştır. Karışım 60 °C' de 30-45 dakika inkübe edilmiş ve 5 ml' lik kloroform-izoamylalkol (24: 1) ile muamele edilmiştir. 2 000 g' de 10 dakika santrifüjden sonra hacmin 2/3' ü kadar isopropanol ile karıştırılmış ve DNA çöktürülmüştür. 1 kez 20 ml'lik yıkama tamponu (% 76 etanol, 10 mM amonyum asetat) ile yıkanmış ve DNA 1 ml'lik TE tamponunda (10 mM Tris- HCl (pH: 7.4), 1mM EDTA (pH:8.0)) çözülmüştür. DNA 10 ml' lik soğuk etanolla ve 2.5 M' lik amonium asetat (pH: 7.7)' la muamele edilmiştir.

Gözükırmızı vd (1995), İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Osman Tosun Gen Bankası, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ve Ege Tarımsal Araştırma Ünitüsü Gen Bankasından sağlanan arpa türlerine (*H. vulgare*, *H. mirinum*, *H. bulbosum*, *H. vulgare spontaneum*) ait hatları kullanmışlardır. Her hattan gelişen taze yapraklar kesilerek DNA izolasyonu yapılmış ve DNA örnekleri -70°C' deki derin dondurucuda uzun süreli saklamaya alınmıştır.

Moreno vd (1995), 31 tane üzüm çeşidi içerisindeki polimorfizmi belirlemek için RAPD markerlerini kullanmışlardır. 5 gr taze genç yaprak sıvı azotta ezilmiş ve 65°C' de 20 ml % 2' lik CTAB izolasyon tamponu eklenmiştir. DNA ekstraksiyonunda Gogorcena vd (1993)' ın metoduyla modifiye edilen Doyle ve Doyle (1990) metodu

kullanılmıştır. DNA' nın verimi mini fluorometre ile ölçülmüştür. DNA ekstraksiyonu için farklı yaşlardaki dokulardan alınan örnekler farklı laboratuvarlarda aynı sonuçları vermiştir. Bu araştırma sonucunda, DNA ekstraksiyonu açısından farklı yaşlardaki, farklı bölgelerde ve farklı yetiştirme koşullarında yetişen bitkilerin aynı sonucu verdiği tespit edilmiştir.

Sugawara vd (1995), RAPD markerleriyle turunçgil kimeralarını tanılamışlardır. Bu konuda yaptıkları çalışmanın ekstraksiyon aşamasında Dellaporta (1983) yöntemini kullanmışlardır.

Hamada ve Hagimori (1996), Kala (*Zantedeschia spp*) çeşitlerinin DNA ekstraksiyonunu CTAB ekstraksiyon tekniğine göre yapmışlardır. RAPD aşamasında kullanılan primerleri Operon' dan seçmişlerdir.

Machado vd (1996), akdeniz mandarinlerinde yaptıkları çalışmada Murray ve Thompson (1980) tarafından tanımlanan ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Ekstraksiyon tamponu olarak % 1' lik CTAB, 100 mM Tris- HCl (pH: 7.5), 10 mM EDTA, 0.7 M NaCl, % 2 sarkosyl: 140 mM 2-mercaptoetanol kullanmışlardır. Bu yöntemde, sıvı azotla iyice ezilen yaprak örneklerinin üzerine 35 hacimlik ekstraksiyon tamponu ilave edilmiş ve örnekler 60°C' lik sıcak su banyosunda 30 dakika tutulmuştur. Örneklerin üzerine 35 hacimlik ekstraksiyon tamponu ilave edilmiş ve daha sonra örnekler 5 dakika inkübe edilmişlerdir. 12 000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilen örneklerin üst fazı başka tüplere alınmış ve üzerlerine 1 hacimlik kloroform - izoamylalkol ile 0.1 hacimlik % 10 'luk CTAB (% 10 CTAB; 0.7 M NaCl) ilave edilmiştir. Oluşan yeni üst faz ise bir başka tüpe alınmış ve üzerlerine 1 hacimlik CTAB tamponu(% 1 CTAB, 50 mM Tris-HCl pH: 8.0; 10 mM EDTA) ilave edilmiş, yavaşça karıştırılmış ve 12 000 rpm' de tüpler 5 dakika santrifüj edilmiş, oluşan süpernatant kısmı atılmıştır. DNA peleti 400 µl TE tamponunda (10 mM Tris HCl pH: 8.0; 1 mM EDTA; 1 M NaCl) çözündürülmüş ve üzerine 2 hacimlik soğuk % 100 Etanol' den ilave edilmiştir. 5 dakika 12 000 rpm' de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve DNA peleti % 70' lik ve % 100' lük etanolle yıkanmıştır. Daha sonra DNA' ya 250 µl 0.1x TE tamponu (1 mM Tris- HCl pH: 8.0; 0.1 mM EDTA) ve 1 hacimlik fenol:

kloroform: isoamylalkol (25: 24: 1) ilave edilmiştir. Tekrar etanolden geçirildikten sonra etanol uzaklaştırılmış ve DNA içerisinde 10 µg/µl RNase bulunan 0.1x TE tamponunda çözülmüştür. DNA' nın kalitesi ve miktarı Sambrook' un (1989) yöntemiyle saptanılmıştır.

Malik vd (1996), DNA ekstraksiyonunu yaklaşık 5 gr taze veya donmuş(-70°C) buğday yapraklarından yapmışlardır. DNA' nın saflaştırılması için fenol: kloroform: isoamylalkol (25: 24: 1) kullanılmıştır. 5 ml' lik DNA çözeltisine 10 µl RNase uygulanmış ve çözelti 37 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. DNA % 70 'lik etanol ile 3 kez yıkanmış 10 dakika kurutulduktan sonra 1ml TE tamponunda çözündürülmüştür ve 4°C' de depolanmıştır.

Millan vd (1996), 19 tane gül türünde RAPD markerleriyle filogenetik ilişkinin saptanmasına çalışmışlardır. Bitkilerden alınan genç yaprak dokuları sıvı azotta dondurulmuş ve -80 °C' de saklanmıştır. DNA ekstraksiyonu Torres ve ark (1983)'ın yöntemiyle yapılmıştır. Örnek başına 0.7 ünite RNase ilave edilmiş ve böylece RNA' lar DNA' lardan uzaklaştırılmıştır. DNA, TE tamponunda çözülmüştür.

Fofona vd (1997), Lima fasulyesinde (*Phaseolus lunatus L.*) RAPD markerleriyle genetik ilişkiyi saptamışlardır. Kültür formları ve yabani formlar arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Küçük modifikasyonlarla DNA ekstraksiyonunda Murray ve Thompson (1980) metodu kullanılmıştır.

Ling vd (1997), 9 adet Poinsettia çeşitlerinden alınan 1 gr taze veya -80 °C' de dondurulmuş yaprak materyali ile ekstraksiyon gerçekleşmiştir. Gawel ve Jaret (1991)' in ekstraksiyon metodundaki modifikasyonlarla CTAB metodunu kullanmışlardır. Fenol: kloroform uygulamasından sonra DNA etanolden geçirilmiş ve 300 µl TE tamponunda çözülmüştür. DNA konsantrasyonu DNA mini fluorometresiyle tespit edilmiştir.

Marquard vd (1997), 40 adet *Hamamelis virginiana*(Kuzey Amerika' da yetişen, sonbaharda sarı çiçekler açan bir ağaçlık) çeşitlerinin ekstraksiyonunu taze

yaprak materyali kullanarak yapmışlardır. Örnek başına 1.0-1.3 gr taze yaprak materyali alınmış, sıvı azotla dondurulmuş ve DNA ekstraksiyonuna kadar -80 °C' de muhafaza edilmiştir. DNA ekstraksiyonu Doyle ve Doyle (1990) metoduna göre yapılmıştır. Ezilmiş ve dondurulmuş yaprak örneklerinin üzerine 10 ml sıcak (60°C) % 2 lik CTAB tamponu (% 2 cetyltrimethylammonium bromid, 1.4 M NaCl, % 2 β - mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH 8.0) eklenmiş ve 65°C' de 60 dakika inkübe edilmiştir. Üzerine 10 ml Kloroform: izoamylalkol (24:1) eklenmiş ve 2 000 g_n' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Etanolle yıkandıktan sonra DNA peleti kurutulmuş ve 0.5-1 ml Tris- EDTA tamponunda çözülmüştür. DNA kalitesine bakmak için % 1' lik Agaroz jele 8-10 μ l yüklenmiş. 150 voltta 2.5 saat elektroforez yapılmış, UV altındaki bant yoğunlukları standart kontrolle karşılaştırılmıştır.

Ortiz vd (1997), 28 tane hexaploid ve 3 tane diploid erik çeşitlerinin genetik ilişkilerini RAPD markerleriyle saptamışlardır. DNA ekstraksiyonunda 2 gr yaprak örneği kullanılmış ve Carlson metoduna (1997) göre bazı modifikasyonlarla ekstraksiyon yapılmıştır. Yapraklar ezildikten sonra aliminyum oksit ve 10 ml CTAB ekstraksiyon tamponu eklenmiştir. CTAB izolasyon tamponu % 2 CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, % 1 PEG 6 000, 100 mM tris-HCl (pH 9.5) ve % 2 2-mercaptoetanolden oluşmuştur. Karışım 20 dakika 74°C'de inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında soğutulmuştur. Karışım kloroform-isoamylalkol' den geçirilmiş ve Albenson ve Simon' a göre (1987) DNA fenol ile saflaştırılmıştır.

Paz ve Veilleux (1997), Doyle ve Doyle (1987) küçük modifikasyonlarla patates hibritlerinde DNA ekstraksiyonu yapmışlardır. Taze yapraklar (0.3-0.5 gr) sıvı azotla iyice ezilmiş, toz haline getirilmiştir. Bunun üzerine 1ml CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromid) tamponu (0.1 M Tris HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA pH 8.0, % 2 CTAB ve % 1 taze 2- merkaptoetanol) ilave edilmiş ve 1-2 saat 60 °C' lik su banyosunda tutulmuştur. 1ml kloroform - isoamylalkol ilave edilmiş ve karışım 15 dakika santrifüj edilmiştir. DNA peleti oluştuktan sonra iki kez % 75' lik etanolle yıkanmış ve DNA kurutulmuştur. Daha sonra TE tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) ve RNase (10 μ g/ ml)'de çözülmüştür. DNA konsantrasyonu minifluorometreyle saptanılmıştır.

Vaghese vd (1997), 24 adet *Hevea brasiliensis* klonundan da Rogers ve Bendich (1988) yöntemine göre toplam genomik DNA ekstraksiyonu yapmışlardır. Bu amaçla sıvı azotla daha önceden dondurulmuş 50-100 mg yaprak iyice ezilmiş ve üzerine 5 hacimlik sıcak 2x CTAB ekstraksiyon tamponu (% 2 CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM Tris- HCl (pH 8.0), 1.4 M ve NaCl) ve 7 µl proteinase K (10 mg/ml) ilave edilmiştir. Solüsyon 65 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 1 hacimlik kloroform-isoamylalkol (24:1) ilave edilmiştir. 11 000rpm' de 10 dakika santrifüjden sonra üst faz atılmış ve DNA soğuk isopropylalkol ile muamele edilmiştir. DNA peleti 1 ml % 70' lik alkolle yıkandıktan sonra 50- 100 µl TE tamponunda (1 mM TrisHCl ve 0.1 mM EDTA pH 8.0) çözülmüştür. DNA konsantrasyonu DNA fluometresi kullanılarak saptanmış ve DNA 10 ng/ µl olacak şekilde sulandırılmıştır.

Bartolozzi vd (1998), 14 tane badem çeşidindeki genetik ilişkiyi RAPD markerleriyle saptamışlardır. DNA ekstraksiyonundan önce yapraklar nişasta ve polisakkarit düzeylerini düşürebilmek için 4°C' de 2-3 gün boyunca muhafaza edilmiştir. DNA ekstraksiyonu Gepts ve Clegg (1989) metodunda küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. 5 gr taze yaprak kullanılarak DNA elde edilmiştir. Saflaştırılmış genomik DNA TE tamponunda çözdürülmüş, spektrofotometrede okuma yapılmış ve 4°C' de depolanmıştır. 10 µg/ ml steril suda DNA sulandırılmış ve PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır.

Galdrisi vd (1998), İtalyan kestane çeşitlerinin RAPD markerleriyle sınıflandırılmasına çalışmışlardır. Bazı kestane çeşitlerinin birden fazla yerel isimleri vardır veya birbirinden farklı çeşitlerde aynı isim kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonunda başlangıçta uygun ekstraksiyon yöntemini tespit etmede problemlerle karşılaşmıştır. Ancak Doyle ve Doyle (1990) metoduna göre yapılmış ekstraksiyonlardan en iyi sonuçlar alınmıştır. 1 gr ağırlığındaki kestane yaprakları sıvı azot' la iyice ezilmiş ve üzerlerine ekstraksiyon tamponu (1.4 M NaCl, % 2 CTAB, 200 mM Tris- HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, % 2 2-mercaptoetanol) ilave edilmiştir. Örnekler 30 dakika 60 °C' de inkübe edilmiştir. Karışıma ekstraksiyon tamponuna eşit, hacimde kloroform: butanol (24: 1) ilave edilmiştir. Daha saf DNA eldesi için, DNA' ya en az iki kez bu uygulamalar yapılmıştır. Sonunda DNA distile suda çözülmüş ve 5 µg/ ml RNase A

uygulanıp 37°C' de 60 dakika inkübe edilmiştir. RNase uygulamasının PCR analizindeki verimliliği arttırdığı gözlenmiştir. Ekstraksiyon yaparken en az 2 kez ekstraksiyon tamponundan geçirmek PCR amplifikasyonu sırasında DNA' yla reaksiyona girerek amplifikasyonu önleyen tanenler, alkaloidler ve flavonlar gibi bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Ekstrakte edilen DNA' nın uzun süre tazeliğini koruduğu görülmüştür.

Kumar vd (1998), RNase ve fenol- kloroform uygulanan basamaklarda küçük modifikasyonlarla Heliconia tür ve çeşitlerinde Honda ve Hirai (1990) metoduna göre DNA ekstraksiyonunu yapmışlardır. 2.5 ml ekstraksiyon tamponu ilave edilmeden önce 0.5 gr taze yaprak sıvı azotla iyice ezilmiştir. Ekstraksiyon tamponu 100 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA pH: 8, 500 mM NaCl ve 10 mM β -mercaptoetanol' den oluşmuştur. DNA' nın konsantrasyonu spektrofotometreyle saptanılmış ve RAPD analizine kadar DNA çözeltisi -20 °C' de depolanmıştır.

Uzun vd (1998), Razaki üzüm çeşidine ait 12, Hafızali üzüm çeşidine ait 6 klon kullanmışlar ve RAPD markerleriyle polimorfizmi tespit etmişlerdir. DNA ekstraksiyonu Lodgi vd (1994) tarafından geliştirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. 0.5 gr taze yaprak örneği, sıvı azot içerisinde ezilerek toz haline getirilmiş ve üzerine 5 ml ekstraksiyon çözeltisi (20 mM NaEDTA, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, % 2 (w/v) CTAB, % 0.2 Merkaptetanol) ilave edilmiştir. Bunların üzerine 50 mg PVPP ilave edilerek, tüpler ters yüz edilmek suretiyle iyi bir karışım sağlanmıştır. 60 °C'deki su banyosunda 25 dakika bekletilen örneklerin üzerine 6 ml Kloroform- oktanol (24/1) çözeltisi ilave edilmiş ve karışım sağlanmıştır. Ekstraksiyonun en son aşamasında % 76' lık etanolle yıkanan örnekler, 20- 30 dakika süreyle kurutularak, örneklerden etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu şekilde elde edilen DNA örnekleri 200 μ l TE çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra, herbir örneğe 2 μ l RNase ilave edilmiş ve 15 dakika 37 °C' deki etüvde tutulmuşlardır. DNA miktarı spektrofotometrede 260/280 oranıyla belirlenmiştir.

2. 1. 2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)- RAPD ile ilgili çalışmalar

Geleneksel olarak turunçgil ıslahı uzun seleksiyon döngüsü, nüseller poliembriyoni ve poliploidi gibi zorluklar nedeniyle yavaş ve uzun zaman almaktadır. Ayrıca, nüseller ve zigotik bitkileri henüz gençken ayırt etmek oldukça güç olmaktadır (Luro vd 1992, Machado vd 1996).

Islah programlarına yardımcı olması açısından morfolojik özelliklere bakılmış, biyokimyasal markerlerle problemler aşılmaya çalışılmış fakat iyi sonuç alınamamıştır. Bazı araştırmacılar ıslaha yardımcı olması açısından genetik çalışmalara ve genetik markerlere ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır (Torres vd 1978).

DNA markerleri kantitatif biyoloji içerisinde sorulan pekçok kompleks sorunun cevaplanmasında önemli bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Bitki ıslahı ve bitki genetiğinin çeşitli alanlarında kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler markerler doğal olarak oluştukları, fenotip üzerine olumsuz bir etki olmadığı ve çevre koşullarından etkilenmedikleri için son derece faydalıdır (Onus 1996).

DNA' nın kalıtım materyali olduğunun bilinmesinden çok daha öncesinde genetik markerler biyolojide kullanılıyordu. Gözle görülen markerler gözle görülebilen bir sonuç ortaya çıkaran mutasyonlar yirminci yüzyılın başlarından itibaren genetik markerler olarak kullanılmıştır. İzoenzimlerle birlikte gözle görülebilen markerlerin kullanılması yoluyla 1970' li yılların sonlarına doğru bazı organizmalarda genetik haritalar ortaya çıkartılmıştır. 1970' li yıllarda kalıtsal olan DNA molekülünün kendisi üzerinde farklılıkların çalışılması ile oldukça fazla sayıda genetik markerlerin bulunabileceği fikri ortaya atılmıştır (Onus 1996).

Diğer markerlerden farklı olarak DNA markerleri belirli, özel çevre koşullarına gerek kalmadan büyüme odalarında, seralarda, fide ve fidan yetiştirme yerlerinde analiz edilebilirler ve bu durumda ıslah çalışmalarının daha hızlı sonuçlanmasını sağlar. DNA markerlerinin yer ve zaman tasarrufu için taşıdığı önem pek çok tür için geçerli olup, özellikle geniş yer kaplayan ve uzun bir jenerasyon süresine ihtiyaç olan ağaçlar için önemi çok daha belirgindir (Onus 1996).

Turunçgillerde moleküler markerler, bitki tür ve çeşitleri arasındaki gen haritalarının çıkarılmasında; ayrıca, türler çeşitler ve tipler arasındaki polimorfizmi belirlemede başarı ile kullanılabilir (Luro vd 1992, Deng vd 1995, Machado vd 1996).

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' dan belirli bölgelerin amplifikasyonunu sağlayan, basit ama başarılı bir yöntemdir. PCR' ın temel prensibi, tekrarlanabilen 3 aşamaya dayanmasıdır. 1 aşama denaturasyon, bu aşamada DNA çift sarmalda tek sarmal yapıya geçer (94 °C), 2 aşama annealing aşaması, bu aşama da primer tek sarmala yapışır burda sıcaklığın iyi ayarlanması gerekir. 3 aşama ise extension(uzama) (72 °C) aşamasıdır (Williams vd 1990).

Turunçgillerde moleküler tekniklerden Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Variable Number of Tandem Repeat (VNTR), Simple Sequence Repeat (SSR), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Sequence- Tagged Microsatellite Sites (STMSs), Minisatellite, CAPS ve Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) gibi yöntemler kullanılmış ve bu yöntemlerle tür ve çeşitlere bağlı olarak başarılar elde edilmiştir (Luro vd 1992, Rafalski vd 1993, Yamamoto vd 1993, Deng vd 1995, Sugawara vd 1995, Machado vd 1996, Russo vd 1996).

Tüm bu teknikler içerisinde RAPD tekniği uygulanması aşamasında daha az teknik bilgiye gereksinim duyması, az miktarda DNA' nın yeterli olması, hızlı ve ucuz bir teknik olması nedeniyle tercih edilmektedir (Rafalski ve Tingey 1993)

Luro vd (1992) çalışmalarında Citrus, Fortunella ve Poncirus cinslerine ait 18 farklı bitkiyi materyal olarak kullanmışlardır. 25 µl olan toplam reaksiyon hacmi içerisinde, 0.5 ünite Taq DNA polimeraz, 2 mM MgCl₂, herbiri 200 µM olan dATP, dCTP, dGTP ve dTTP, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM β - mercaptoetanol, % 0.001 anionic detergent, 0.4 mg/ml bovin serum albumin, 0.5 µM primer ve 1-50 ng DNA kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi üzeri bir damla parafin yağı ile kaplanmıştır. PCR döngüleri 91°C' de 1 dakika, annealing sıcaklığı primere

göre değişen sıcaklıklarda 1 dakika, 72 °C' de 1 dakika (35 döngü) ve son olarak 72°C' de 10 dakikada olmak üzere döngüler tamamlanmıştır. Araştırma sonunda, PCR tekniğinin nüseller ve zigotik bitkileri kolayca ayırt edebileceği tespit edilmiştir. Ayrıca, çok fazla örnekle çalışılan genetik analizleri bu tekniğin kolaylaştırdığı bulunmuştur.

Yang ve Quiros (1992), 10 mer' lik 28 primer kullanılarak küçük modifikasyonlarla Williams vd (1990)' nin yöntemine göre RAPD markerleriyle kereviz çeşitlerini tanılamış ve sınıflandırmışlardır. Bu çalışmada *Apium graveolens* L. var. *dulce* türü içerisine giren kerevizlerden 21 adet varyete *A. rapaceum* türüne giren kerevizlerden 1 adet kullanmışlardır. 28 primerden toplam 309 bant oluşturulmuştur. Primer başına bant sayısı 4 (A08) ile 19 (B08) arasında değişmiş ve ortalama primer başına 11 bant elde edilmiştir. Amplifike olmuş bantların uzunluğu 200 bp (A03)' den 3.800 bp (A12)' e değişmiştir. Elde edilen 309 banttan, 213 tanesi (% 68) tüm çeşitler için sabit bulunmuştur. Amplifikasyon örnekleri % 2.0' lik Agaroz jelde yürütülmüş, 0.5 µg/ ml' lik etidyum bromid ile yarım saatte boyanmıştır. Tüm reaksiyonlar 3 kez tekrarlanmıştır.

Pammi vd (1994), Sorghum (*Sorghum bicolor* spp *bicolor*) da RAPD markerleriyle çalışmışlardır. Çalışmalar sırasında DNA, primer, MgCl₂, sıcaklık ve döngü sayısı gibi amplifikasyon parametrelerinin optimum değerleri saptanmıştır. Parametrelerle ilgili sonuçlara göre, çok düşük ve yüksek düzeydeki primer konsantrasyonu, amplifikasyon randımanını azaltmış, optimum primer konsantrasyonu 3-6mM olarak saptanmıştır. Yüksek DNA konsantrasyonu dışında DNA konsantrasyonu PCR amplifikasyonunu etkilememiştir. Primer/ DNA ilişkisinde Taq polimerazın rolü de araştırılmış, 0.19 ünite ile 3.04 ünite arasındaki Taq' ın sonuçları, sınırlı düzeyde etkilediği bulunmuştur. Düşük ve yüksek düzeydeki MgCl₂ konsantrasyonunu DNA amplifikasyonu azaltmış, optimum MgCl₂ konsantrasyonu 2.5 mM olarak tespit edilmiştir. Bundan önceki çalışmalarda tüm primerlerde 36 °C annealing sıcaklığı olarak kullanılmış ancak bu çalışmada kullanılan 27 primerden 22 tanesi 48 °C' de, 5 tanesi 36 °C' de iyi sonuç vermiştir. Bu sonuçlardan da çıkarılacağı gibi primere göre annealing sıcaklığı ayarlanmalıdır. En son olarak PCR döngüleri değerlendirilmiş, 30-35 döngülü programlarda iyi amplifikasyon elde edilirken 35-45

döngülü programlarda hakiki olmayan amplifikasyon ürünleri elde edilmiştir. Araştırma sonucunda özellikle $MgCl_2$ ve primer annealing sıcaklık düzeylerinin amplifikasyon ürünlerinin verimini etkilediği gözlenmiştir. Standart koşullar altında, primerlerin %80' i amplifikasyon oluşturmuştur. Ayrıca, BTx623 ve IS3620C adlı iki genotip arasında farklılık tespit edilmiştir.

Albayrak vd (1995), ökaryotik hücre sistemlerinden üç farklı türe ait beş örneğin, rastgele seçilmiş 10 nükleotid uzunluğunda G-C oranı % 60 ve % 70 olan iki primer kullanılarak RAPD tekniği ile tanımlamasını yapmışlardır. Elektroforez analizi sonucunda OPB02 primerinin sadece Eser isimli nohut varyetesinde çalıştığı saptanmıştır. OPC09 primerinin ise Canitez isimli nohut varyetesi hariç tüm örneklerde yoğun bantlar verdiği gözlenmiştir. Agaroz jelde farklı organizma gruplarına ait ortak bantların varlığı tespit edilmiştir. Basit ve yüksek organizasyona sahip olan ökaryotik organizmalardan maya ve bitki türlerini dizi homolojisine sahip olabilecekleri görülmüştür. Sonuç olarak, bu tekniğin çok geniş organizma gruplarına uygulanabilirliği ortaya konmuştur.

Deng vd (1995) çalışmalarında 14 adet *in vivo* ve 1 adet *in vitro* koşullarında yetiştirilen zigotik orjinli limon mutantlarını kullanmışlardır. DNA amplifikasyonunda küçük modifikasyonlarla Williams' ın (1990) yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada 10 mer' lik 36 adet primer kullanılmıştır. Reaksiyon hacmi 25 μ l olup; 1x PCR tamponu (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, % 0.1 Triton x -100), 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.3 μ M primer, 1 ünite Taq polimeraz (Promega) ve 25ng genomik DNA' dan oluşmuştur. PCR döngüleri öncelikle DNA' nın ayrılabilmesi için 94 °C' de 5 dakika (1 döngü), 94 °C' de 15 saniye, 36 °C' de 15 saniye ve 72 °C' de 80 saniye (45 döngü) ve son olarak 72 °C' de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır. Herbir primer için DNA amplifikasyonu 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. RAPD ürünleri, %4.5' luk Agaroz jel ile ayrıştırılıp, etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV ışık kaynağı altında fotoğrafı çekilmiştir. Araştırma sonucunda 36 primerden 14 tanesinin monomorfik bant, 22 tanesinin polimorfik bant oluşturduğu görülmüştür. Primer başına elde edilen bant sayısı 5 (N14) ve 21 (N16) arasında değişim göstermiş, primer başına ortalama 13 bant tespit edilmiştir. Bantların uzunluğu 100 bp ile 3200 bp arasında saptanmıştır. 22

primerin oluşturduğu 294 banttın %15' inin yani 43 bantın polimorfik olduğu görülmüştür. 10 adet primer, primer başına tek bir polimorfik bant oluştururken A02, A13 ve N06 primerleri primer başına 4 polimorfik bant oluşturmuştur. Araştırmacılar ayrıca, RAPD markerlerinin birbirine çok benzer limon mutantları arasındaki varyasyonların saptanmasında dahi başarı ile kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Gözükırmızı vd (1995), Arpa (*Hordeum*)' da polimorfizm ve genetik haritalama için RAPD markerlerini kullanmışlardır. Hızlı ve ekonomik bir yöntem olan RAPD yurdumuzda ilk kez Nermin Gözükırmızı ve arkadaşları tarafından, arpa doku kültürlerinde oluşan somaklonal varyasyonun gösterilmesi, yurdumuz orijinli yabancı arpa hatlarında parmakizi çalışmaları ve polimorfizm değerlerinin hesaplanması gibi amaçlar için kullanılmıştır. Genomik bitki DNA' larının amplifikasyonu 25 µl toplam hacimde, mikrotüplerde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1 ve % 1.2' lik agaroz jellerde analiz edilmiştir. Bu çalışma, RAPD yönteminin, tohum karışıklıklarının önlenmesinde zaman tasarrufu ve kesinlik açısından önemini ortaya koymuştur.

Hamada ve Hagimori (1995), bazı kala (*Zantedeschia spp.*) çeşitlerinin tanılanması için RAPD yöntemini kullanmışlardır. 10 mer' lik 60 primer kullanılmıştır. PCR' da kullanılan 25 µl' lik reaksiyon hacmi, 10 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP 0.1 mM, 50 pmol primer, 50 ng genomik DNA ve 0.5 ünite Taq DNA polimeraz' dan oluşmuştur. PCR döngüleri 94 °C' de 1 dakika, 36 °C' de 1 dakika, 72 °C' de 1 dakika ve 50 döngüden oluşmuştur.

Millan vd (1995), 10 bp uzunluğunda 21 primer kullanarak 19 gül türünü RAPD markerleriyle analiz etmişlerdir. Daha önce yapılmış olan izoenzim analizleri RAPD tekniğinde olduğu gibi genetik ilişkiyi tespit etmede çok etkili olmamıştır. Ancak, RAPD tekniğiyle gülün yabancı ve kültür formları arasındaki varyasyon kolayca tespit edilmiştir. Amplifikasyon ürünleri %1' lik Agaroz ve %1' lik Nu-Sieve agarozdan hazırlanan jelle yüklendikten sonra 1x TBE tamponuyla yürütülmüştür. Jel etidyum bromid ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır.

Moreno vd (1995), 14 adet primer kullanarak 31 üzüm tipi içerisindeki polimorfizmi RAPD markerleriyle tespit etmişlerdir. Herbir primer 3 kez tekrarlanmış ve sabit sonuçlar elde edilmiştir. DNA amplifikasyonu 94 °C' de 30 saniye (1 döngü), 92 °C' de 30 saniye, 35 °C' de 1 dakika, 72 °C' de 2 dakika (50 döngü) ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri % 1.5' luk agarozda 4 saat süreyle 100 V' da ayrıştırılmıştır. 14 primerden 5 tanesi (A01, A08, A11, O10, O19) çok iyi bant desenleri oluşturmuştur.

Sugawara vd (1995) tarafından yapılan çalışmada, 12 mer' lik 124 adet primer değişik turuncgil çeşitleri içerisindeki kimeraları tanılamak için kullanılmıştır. RAPD reaksiyonlarında, toplam reaksiyon hacmi 12.5 µl tutulmuş ve reaksiyonlarda 10 ng turuncgil DNA' sı, 10.5 ng primer , 160 µM herbir dNTP (dATP, dGTP, dCTP, ve dTTP), 10mM Tris HCl (pH 8.9), 1.5 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 500 µg BSA/ml, %0.1 sodium cholate, %0.1 Triton x -100 ve 0.5 ünite Tth DNA polimeraz kullanılmıştır. PCR programı olarak 93 °C' de 1 dakika, 42 °C' de 1 dakika ve 72°C' de 2 dakika (40 döngü) kullanılmıştır. Bantların netliği ve stabilitesi için DNA konsantrasyonu ile oynanmış ve 2 ng, 5 ng, 10 ng 20 ng ve 50 ng olacak şekilde çeşitli konsantrasyonlar denenmiştir. En güçlü bantlar 10 ng DNA ile çalışıldığında elde edilmiştir. PCR ürünleri %1.5 ' lik Agaroz jelde ayrıştırılmış ve etidyum bromid ile boyandıktan sonra fotoğraflanmıştır. Annealing sıcaklığı olarak 38 °C ve 42 °C' ler denemiş, en güçlü bantlar 42 °C' de tespit edilmiştir. Denenmiş olan 121 primerden sadece 12 tanesinde (A 00, A 19, B 04, B 39, B 41, B 73, C 11, C 64, C 82, C 88, C 89) polimorfizm saptanmıştır. Sonuç olarak, RAPD markerleriyle genç bitki döneminde turuncgillerde periklinal kimeraların saptanabileceği bildirilmiştir.

Continella vd (1996), Comune, Tardive ve Hernandina klemantin seleksiyonlarını tanılamak için RAPD markerlerini kullanmışlardır. Bu çalışma da 80 tane primer kullanılmış ancak 3 tanesi polimorfizmi ortaya çıkarmıştır.

Machado vd (1996), farklı orijine sahip akdeniz mandarinleri içerisinde RAPD markerleriyle genetik ilişkiyi tespit etmişlerdir. Çalışmada, tesadüfî olarak seçilen 21 adet 10 ve 8 mer' lik primerler kullanılmıştır. RAPD reaksiyonlarında toplam reaksiyon

hacmi 13 µl tutulmuştur. RAPD çalışmalarında 13 µl 10x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl ; % 0.01 gelatin), herbir dNTP' den 200 µM, 15 ng primer, 10 ng genomik DNA ve 1.5 ünite taq polimeraz kullanılmıştır. Reaksiyon tüpünün içerisine toplam reaksiyon hacmi kadar mineral yağ konulmuştur. PCR döngüleri, 92 °C 'de 1 dakika, 72 °C' de 2 dakika (36 döngü) ve son olarak 72 °C' de 10 dakika (1 döngü) olacak şekilde ayarlanmıştır. Başlangıçta ayrıca bir denaturasyon uygulamasına gerek duyulmamıştır. Program bittikten sonra PCR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren %1.4 'lük Agaroz jel üzerinde ayrıştırılmıştır. Araştırma sonunda , 21 primerin kullanımı ile toplam 111 bant elde edilmiş herbir primer başına elde edilen bant sayısı 2 ve 8 arasında değişim göstermiş, primer başına ortalama 2.2 bant saptanmıştır. Bant uzunluğu 274 base pair (bp) ile 3006 bp arasında belirlenmiştir. Saptanan bantlardan %42' si polimorfik olarak belirlenmiştir. UPGMA cluster analizi sonucuna göre akdeniz mandarin tipleri arasında çok düşük düzeyde genetik varyasyon görülürken, akdeniz mandarinleri ile diğer turuncgil türleri arasında büyük genetik farklılıklar görülmüştür. 39 akdeniz mandarin tipinden 20 tanesi aynı bantları vermiştir. Bu da onların aynı klon olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar sonuçta, tipler arasında düşük genetik varyasyon olsa dahi RAPD markerleriyle genetik polimorfizmin saptanabileceğini göstermişlerdir.

Malik vd (1996), 10 mer' lik 160 adet primer kullanmış fakat 147 tanesinde amplifikasyon elde etmişlerdir. Primer başına ortalama 5.2 bant oluşmuştur. Primerlerden % 60- 70 G + C içeriğine sahip olanlar % 50 ve % 80 G + C içeriğine sahip olanlardan daha fazla bant oluşturmuştur. DNA bantlarının uzunluğu 268 ile 2188 bp arasında değişmiştir. Amplifikasyon ürünleri % 1.5' luk agaroz da TAE tamponuyla (% 0.242 Tris base, % 0.571 Glacial acetic asit ve 50 mM EDTA (pH 8.0)) ayrıştırılmış ve etidyum bromid ile boyanmıştır. Sonuç olarak buğday genotipleri arasında keşfedilen yüksek polimorfizm, RAPD tekniğinin çeşit tanılamada yüksek potansiyelinin olduğunu göstermiştir.

Russo ve Cerone (1996), *C. Clemantine* Hort.ex Tan' ın 20 klonunun belirlenmesi için RAPD markerleri kullanılmıştır. Çalışmada 10 mer' lik primerler kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar çalışılan çeşitlerin ayırımı için faydalı bilgiler sağlamıştır.

Varghese vd (1996), bitki materyali olarak *Hevea brasiliensis*' e ait 24 adet vejetatif çoğaltılmış klon kullanmışlardır. DNA amplifikasyonu için 126 primer kullanılmış bunlardan 97 tanesi ayırt edilebilir amplifikasyon ürünlerini oluşturmuştur. Büyüklükleri 0.35- 3.5 kb arasında değişen 220 bant oluşmuş, bu bantlardan 111 tanesi polimorfik karakter göstermiştir. Primer başına bant sayısı 1-5 arasında değişmiş ortalama bant sayısı ise 2.6 bulunmuştur. Bu araştırma sonucunda *Hevea* klonlarının ayırımında ve genetik büyüklüklerin tahmininde RAPD markerlerinin kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Açık vd (1997a), RAPD tekniğini cins içerisindeki polimorfizmin derecesini belirlemek için *Allium* türlerine uygulamışlardır. *Allium*' un beş türü, *A. isauricum*, *A. myrianthum*, *A. curtum*, *A. ilgazasense* ve *A. karamanoğlu* şansa bağlı primerler kullanılarak varyasyonu belirlemek için değerlendirilmiştir. Primerlerden biri *Allium* türleri arasında sayılabilir polimorfizmi ortaya koymuştur. Bant profilinde, türler arasındaki varyasyonlar gözlenmiştir. Bunlar cins içerisinde sistematik çalışmalara uygulanmıştır. Türler arasındaki genetik uzaklık hesaplanmış ve cluster analizi çalışılan türler arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren dendogram için kullanılmıştır.

Açık vd (1997b), 10 mer' lik primerler kullanarak RAPD amplifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 20 mM Tris- HCl (pH: 8.8), 500 mM KCl, % 0.8 Nonidet P 40, 25 mM MgCl₂, herbir dNTP' den 100 mM, 0.2 mM Primer, 25 ng *Allium* genomik DNA' sı ve 1 ünite Taq polimeraz' dan oluşan 100 µl' lik reaksiyonlar oluşturulmuştur. DNA' lar % 1' lik Agaroz jel üzerinde ayrıştırılmıştır. Bu çalışmada *A. neopolitanum*, *A. callidictyon*, *A. rupestre*, *A. scorodoprosu*, *A. affine* ve *A. juncetum* arasındaki genetik uzaklıklar saptanmıştır.

Conner vd (1997), bazı elma çeşitlerinde RAPD markerleriyle genetik ilişkiyi tespit etmişlerdir. 25 µl' lik çözelti içerisinde 13.2 µl su, 2.5 µl 10x tamponu (500mM KCl, 100 mM Tris HCl pH 9.0, %1 Triton X-100), 1.5 µl 25 mM' lik MgCl₂ herbir dNTP' den 2.5 mM olacak şekilde 1.25 µl dNTP, 1.5 µl 10µM' lik primer, 5 µl DNA(10 ng/ µl) ve 0.5 ünite Taq polimeraz olacak şekilde karışım hazırlanmıştır.

Reaksiyon karışımının üstüne 1-2 damla mineral yağ damlatılmış ve tüpler PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR programı 94 °C'de 1 dakika, 35 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika (40 döngü) ve bunları takiben 72 °C'de 8 dakika olacak şekilde programlanmıştır. Amplifikasyon ürünleri 1x Tris- borate elektroforez tamponunda 4 saat 100 V' de % 2' lik Agaroz jelde ayrıştırılmıştır. Jeller etidyum bromid ile boyanmış ve transliminatörde polaraid film kullanılarak fotoğraflanmıştır.

Fafana vd (1997) çalışmalarında 16 yabani ve 3 türe ait (Big lima, Sieva, Potato) 30 çeşitten oluşan 46 adet Lima fasulye çeşidinin genetik farklılığını RAPD markerleri kullanarak tespit etmişlerdir. 12 mer' lik 172 adet primer kullanarak mesoamerican ve andean adı verilen 2 temel grubu belirlemişlerdir. PCR programı başlangıç denaturasyonu 94 °C' de 15 dakika (1 döngü), denaturasyon aşaması 94 °C' de 1 dakika, annealing 34°C' de 1 dakika; extension 72 °C' de 2 dakika (45 döngü), son olarak ise 72 °C' de 10 dakika extension olacak şekilde ayarlanmıştır. 10 µl' lik PCR ürünleri içerisinde 1 mg/ml etidyum bromide bulunan %1.8' lik Agaroz jelde 50 mA' de 3 saat süreyle yürütülmüştür. Ayrıştırılmış amplifikasyon ürünleri UV ışık altında poloroid film ile fotoğraflanmıştır. İstatiksel analizler sonucunda, 2 temel grup olan mesoamerican ve andean grupları içerisindeki yabani ve kültür formları arasında % 37.7 varyasyon olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, kültür formları içerisinde yabani form içerisindekilere göre daha yüksek polimorfizm olduğu görülmüştür. Mesoamerican kültür formu içerisindeki Sieva ve Potato kültür grupları arasında düşük fakat önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Ling vd (1997), poinsettia çeşitlerinde yaptıkları RAPD analizlerinde 50 µl' lik reaksiyon hacmi içerisine, 1x PCR tamponu (10 µM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 200 mM dNTP_s (Promega), 0.2 µM primer ve 1.5 unite Taq polimeraz (Promega) koymuşlardır. Genomik DNA (5, 10, 15, 20, 25, 30 ng), MgCl₂ (0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mM) ve Taq polimeraz (0.75, 1.0, 1.2, 1.5, 1.75, 2.0 unite/reaksiyon) konsantrasyonlarının optimizasyonları üzerinde çalışmışlardır. RAPD ürünlerinden 20 µl alınmış, TAE tamponuyla % 2' lik Agaroz jelde yürütülmüş ve UV transliminatörüyle fotoğraflanmıştır. 9 adet poinsettia çeşidinin tanılanmasında kullanılan 60 primerin 57 tanesinde amplifikasyon oluşmuş, ancak 9 primerde

polimorfizm saptanmıştır. 9 primerden elde edilen 48 RAPD bandından 33 tanesi polimorfiktir. Poinsettia çeşitleri ' Jingle Bells', 'Supjibi', ' V17 Angelica', ve ' V14Glory', 'Red Sails', 'Jolly Red', 'Freedom', 'Lio Red', 'Pink Peppermint' olmak üzere iki gruptan oluşmuştur. Bu sonuçlarda, RAPD tekniğinin Poinsettia çeşitlerinin genetik ilişkilerinin saptanmasında etkili olduğunu göstermiştir.

Ortiz vd (1997) çalışmalarında 31 adet hexaploid ve diploid erik çeşidi kullanmışlardır. Kullanılan 21 primerden 3'üyle (AD16, AD14 ve B1) yüksek derecede polimorfizm belirlemişlerdir. Bu çalışmada aynı çeşidin farklı ağaçlarından alınan bitki materyali ile ekstraksiyon yapılmış ve oluşan bantların birbirinin aynı olduğu tespit edilmiştir. PCR aşamasında 25 µl' lik reaksiyon hacmi oluşturulmuş üzerlerine ise 50 µl mineral yağ konulmuştur. PCR programı olarak başlangıçta 1 döngü ile 94 °C' de 5 dakika, 45 döngü ile 94 °C' de 1 dakika, 37°C' de 1 dakika, 72 °C' de 2 dakika ve 1 döngü ile 72 °C' de 10 dakika süre ayarlanmıştır. Amplifikasyon ürünleri %1' lik agaroz jelde yürütülmüş ve etidyum bromid ile boyanmıştır. Sonuç olarak RAPD markerlerinin genetik ilişkileri ve spesifik genotipleri tanılamada iyi bir araç olduğu tespit edilmiştir.

Paz ve Veilleux (1997), diploid patates hibritlerinde RAPD markerleriyle genetik farklılığı tespit etmişlerdir. PCR reaksiyonlarında 0.6 µM' lık 10 mer' lik OPA, OPC ve OPG serilerini içeren primerler kullanılmıştır. DNA amplifikasyon ürünleri % 1.4' lük Agaroz jelde Tris- borate- EDTA tamponuyla ayrıştırılmıştır. Jel, 10 dakika süreyle etidyum bromid (1mg/ 100ml)' le boyanmış ve UV transliminatör ile fotoğraflanmıştır. RAPD analizleri farklı zamanlarda 2 kez yapılmış ve ilişkileri kontrol edilmiştir. RAPD ürünleri monomorfik veya polimorfik olarak 2 türe ayrılmıştır. 60 primerden 11 (% 18.3) tanesi polimorfizm göstermemiştir.

Bartolozzi vd (1998), bademde PCR amplifikasyonu aşamasını Williams vd (1990)' nin yönteminde küçük modifikasyonlar yaparak gerçekleştirmişlerdir. PCR döngüleri 94°C' de 2 dakika 1 döngü, 92 °C' de 45 saniye, 36 °C' de 1 dakika ve 72 °C' de 2 dakika 40 döngü ve en son döngü ise 72 °C' de 5 dakika olacak şekilde programlanmıştır. PCR ürünleri analiz edilene kadar 4°C' de saklanmıştır. PCR ürünleri

0.5x TBE tamponu kullanılarak % 2' lik Agaroz jel elektroforezde ayrıştırılmış ve etidyum bromid ile boyanmıştır. Herbir PCR reaksiyonu, iki farklı şekilde elde edilmiş DNA ile en az 3 kez tekrarlanmıştır. Bantlar 300 bp' den 2.5 kb' a kadar değişmiştir. 21 primer kullanılarak 18 çeşit içerisinde 37 bant elde edilmiştir. Primerlerin üçte biri grupları ayırt etmede iyi sonuç vermiştir.

Debener ve Mattiesch (1998), *Rosa multiflora* ve *Rosa canina*' nın farklı büyüklüklerdeki 24 (10, 15 ve 20 bp) primerini test etmişlerdir. Primerler % 60 ve % 73 GC içeriğinde olanlardan seçilmiştir. Oluşan bantların uzunluğu 100 bp ile 2000 bp arasında değişmiştir. 10, 15 ve 20 mer' lik primerlere göre daha fazla bant örnekleri oluşturmuşlardır. 15 ve 20 mer' lik primerlerde annealing sıcaklığı 55 °C iken 10 mer' lik primerlerde 35°C olarak ayarlanmıştır.

Galdfrisi vd (1998), RAPD tekniğini kullanılarak kestane (*Castanea sativa*) çeşitleri içerisindeki genetik ilişkiyi tespit etmişlerdir. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler 10 nükleotid uzunluğunda ve % 60 G+C içeriğine sahip olanlardan seçilmiştir. PCR amplifikasyonunda kullanılan toplam reaksiyon hacmi ise 50 µl olup, 20 pmol primer , 10mM Tris-HCl pH 8.3, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, herbir dNTP' den 200 µM, 20 pmol primer, 2.5 ünite Taq polimeraz ve 10 ng kestane DNA' sı kullanılmıştır. İlk PCR döngüsü 94 °C' de 3 dakika, 40 °C' de 1 dakika ve 72 °C' de 1 dakika olacak şekilde 45 döngüden oluşmuştur. Amplifikasyon ürünleri % 2' lik Agaroz jele yüklenmiş, TAE tamponunda en az 1 saat 100-120 voltta yürütülmüştür. Jeller 0.5 µg/ml etidyum bromid ile boyanmış ve UV ışıktaki fotoğraflanmıştır. Tüm primerlerin oluşturduğu bant sayısı 1-14 arasında değişmekle beraber, primer başına ortalama 5 bant tespit edilmiştir. Bantların uzunluğu 150 bp' den 140 bp' e değişim göstermiştir. Amplifikasyon ürünlerinin analiz edilen tüm çeşitleri ayırt etmede faydalı olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, bantların kalitesinin DNA' ya ve Taq polimeraza bağlı olduğunu saptamışlardır.

Kumar vd (1998), *Heliconia* türleri ve çeşitlerinin genetik analizlerini RAPD markerleriyle yapmışlardır. Çalışmada 10 mer' lik primerler kullanılmıştır. RAPD reaksiyonlarında kullanılan toplam hacim 50 µl olup, içerisine otoklavlanmış su, 10x

PCR tamponu (Promega), herbiri 0.4 mM olan dNTP, 1 mM primer, 5 unite Taq DNA polimeraz (Promega), 3 mM MgCl₂ ve 100 ng template DNA konulmuştur. RAPD ürünleri % 1.5' luk Agarozda 85-90 voltta 3 saat süreyle ayrıştırılmış ve etidyum bromidle boyandıktan sonra fotoğraflanmıştır. *Heliconia* için optimum DNA miktarı 100ng olarak tespit edilmiştir. MgCl₂ konsantrasyonu ise 1 mM' dan 3 mM' a arttırılmış, 3 mM' da iyi sonuç alınmış ancak 3 mM' dan daha yoğun MgCl₂ konsantrasyonlarında başarı azalmıştır. Araştırma sonucunda, 2 triploid çeşit H. psittacorum- 'Iris' ve 'Petra' 10 farklı primerle aynı RAPD profillerini oluşturmuşlardır, bu da onların aynı genotipe sahip olduğunu göstermiştir.

Uzun vd (1998), tarafından yapılan bir araştırma, PCR- RAPD tekniğini kullanarak Türkiye' de yaygın bir şekilde yetiştiriciliği yapılan Razaki ve Hafızali üzüm çeşitlerine ait toplam 18 adet tip ve klonlarının teşhis ve ayrımlarının gerçekleştirilmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 9 adet 10 mer' lik primer kullanılmıştır. Toplam 9 primerden 73 adet bant oluşmuştur. Kullanılan primerler, Razaki ve Hafızali tip ve klonları arasında oldukça yüksek polimorfizm göstermişlerdir. Böyle olmakla beraber, Razaki tipleri arasında Pembe Razaki ve Deliemin Razakısının, bu çalışmada kullanılan primerlerle teşhis ve ayrımları mümkün olamamıştır. Hafızali klonlarının da bu primerlerle teşhis ve ayrımları gerçekleştirilmiştir. Razaki ve Hafızali tipleri ve klonları arasındaki % benzerlik indeksi değerleri oluşturulmuştur. Araştırma sonunda, doğru primerlerin seçilmesiyle tüm Razaki tiplerinin ve bazı klonların birbirinden ayrılabilceği ortaya çıkmıştır. PCR tekniği, üzüm çeşitlerinin, tip ve klonlarının ayrımlarında gerçekten oldukça güvenilir bir teknik olarak kabul edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3. 1. Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan yaprak materyalleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü koleksiyon parsellerinde bulunan Nova-I, Nova-II, Nova-III, Lee-I, Lee-II, Satsuma, Klemantin (SRA 90), Kinnow, Robinson mandarin ve Minneola tanjelo ağaçlarından alınmıştır.

3.1.1. Çeşitler

Satsuma: Satsuma 16. Yüzyılda Japonya' da Tsao Chieh mandarininden bir şans çögürü olarak oluşmuş ve 1900' lü yılların başlarında Japonya' dan Batum yoluyla Rize' ye gelmiştir. Satsumalar kendi aralarında Owari, Wase ve Satsuma benzerleri olmak üzere 3'e ayrılmaktadır ve Türkiye' deki Satsumaların çok büyük bir kısmı Owari grubunda yer almaktadır (Tuzcu 1990, Burdette 1993).

Meyve kabuğu hasat döneminde sarı-portakal renginde ve hafif pürüzlüdür; kalınlığı 3.37 mm'dir. Özellikle erkenci satsuma çeşitlerinde meyve kabuğu yeşilken meyve olgun haldedir. Kabuğun meyve etine bağlılığı gevşektir. Olgunlaşma döneminden sonra kabuğun etten ayrılması kolaylaşmaktadır. Puflaşmaya eğilimi fazladır. Depolamaya ve taşımaya elverişlidir. Meyveleri basık şekillidir. Ancak bazen boyunculuk görülebilir. Meyve genişliği 51.22 mm, uzunluğu 51.22 mm, ağırlığı 99.59 gr' dır. Meyve eti koyu portakal rengindedir. Tat, koku ve kalitesi yüksek bir çeşittir. Olgunluk döneminde usare miktarı % 43.90'dır. Suda çözülebilir kuru madde miktarı %10.46, titre edilebilir asit miktarı ise %1.33, SÇKM/Asit oranı 8.28' dir. Meyve başına ortalama 1.18 adet çekirdek düşmekte olup çekirdeksiz bir çeşit sayılmaktadır.

Verimli bir çeşit olup elverişli iklim ve bakım koşullarında az peryodisite gösterir. Ancak, koşulların bozulmasına ve yaşlanmaya bağlı olarak peryodisiteye eğilimi artar. Genelde düzenli ürün veren bir çeşittir. Partenokarpiye eğilimi oldukça yüksektir. Ağaçları yayvan taçlı olup düşük sıcaklıklara çok dayanıklıdır. Erkenci bir çeşittir. Olgunlaştıktan sonra ağaçta fazla kalmamaktadır (Hodgson 1967, Tuzcu 1990, Yeşiloğlu 1996).

Meyve yassıdır. Yassılıkla nemli şartlar arasında sıkı bir ilişki vardır. Nem, meyve miktarı ve kalitesine olumlu etki yapmaktadır. Nemli şartlarda kabuk ekstrem bir şekilde incelmekte ve usare miktarı artmaktadır. Tozlanma ve dölleme olmadan partenokarp meyve oluşturmaktadır. Satsumanın Ege' deki anacı üç yapraklıdır. Bu anaç üzerinde en iyi meyve kalitesine ulaşmakta ve soğuğa dayanıklılığı biraz daha artmaktadır. Ege Bölgesinde, satsuma anacı olarak Troyer citrange ve kireçli yerlerde, pH'sı yüksek yerlerde Turunç da kullanılmaktadır. Özellikle Troyer satsuma için iyi bir anaçtır (Mendilcioğlu 1996).

Satsuma mandarini farklı genetik yapı gösterir ve genetik yapısı stabil değildir. Satsuma mandarinin gelişiminde mutasyon önemli bir yer kaplamaktadır. Göz mutasyonu ile yeni çeşitler meydana gelmiştir. Erkenci, orta ve geçi olabilmektedirler. Japonya'da son 60 yıl içerisinde çok farklı Satsuma mandarin tipleri meydana gelmiştir. Mutasyona eğilimi çok yüksek olduğu için Owari, Miho Wase, Kuno, Imamura gibi çok farklı zamanlarda olgunlaşan tipleri vardır (Burdette 1993).

Sıcaklık toplamı ihtiyaçları çok azdır. Mandarin çeşitleri içerisinde en erkencisidir. Ege de ekim başından itibaren Akdenizde ekim ortasından itibaren olgunlaşmaktadır. Soğuklara dayanıklıdır (-8,-9°C). Meyveler bakımından ülkemizde soğuk tehlikesi yoktur. Erken olgunlaşır ve soğuklar başlamadan hasadı bitmektedir. Fizyolojik olgunluğa eriştiğinde renk yeşil kalabilmekte ve iç kısmı fizyolojik olgunluğa erişince hasat edilmektedir. Dilim konserveçiliğine uygundur. Muhafazaya ve taşımaya çok elverişlidirler.



Şekil 3.1. Materyal olarak genç yaprakların alındığı Satsuma ağacının görünümü

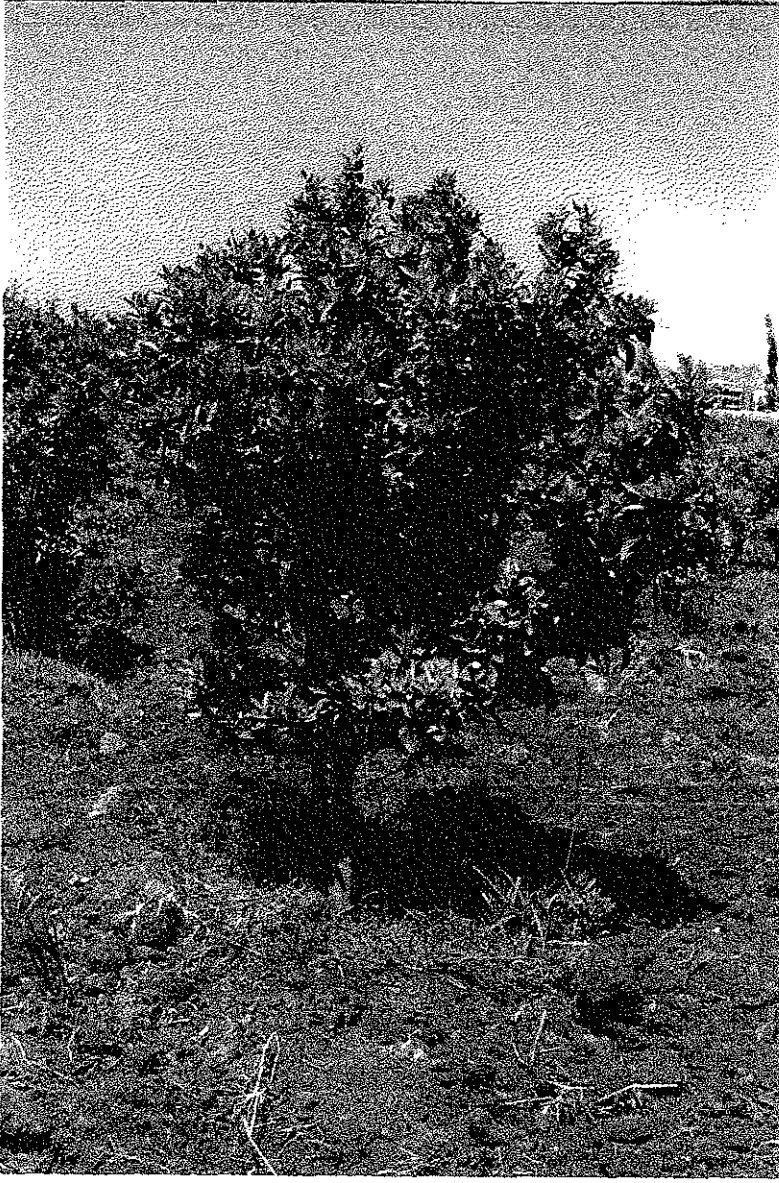
Klemantin: Cezayir’de doğal bir mutasyon veya bazı araştırmacılara göre, turunc x mandarin melezlemesi sonucu meydana geldiği sanılan Klemantin, Antalya Narenciye araştırma enstitüsüne İtalya’dan 1936 yılında getirilerek introduksiyonu yapılmıştır. Standart bir çeşit olup özellikle dış pazarın çok tuttuğu ve tanıdığı bir çeşittir. Daha çok Akdeniz bölgesinde yaygınlık kazanmıştır.

Meyve kabuğu koyu portakal renkli, düzgün ve parlak, fakat yağ keseleri nedeni ile hafif pürüzlü görünümündedir. Kabuk kalınlığı 2.62 mm’dir. Kabuğun meyve etine bağlılığı orta sıklıdır. Diğer mandarin çeşitleri kadar puflaşma göstermemektedir. Taşıma ve depolamaya elverişlidir. Meyveleri hafif basık ile yuvarlak arası bazen boyunludur. Meyve eti koyu portakal renginde gevrek, sulı, aromalı ve yüksek kalitelidir. Meyve genişliği 53.26 mm, uzunluğu 47.17 mm, ağırlığı 67.37 gr’dır. Olgunluk döneminde usare miktarı % 44.75’ tir. Suda çözülebilir kuru madde miktarı (SÇKM) % 12.23, titre edilebilir asit miktarı (A) ise %1.29, SÇKM/A oranı 9.67’dir. Meyve başına ortalama 4.89 adet çekirdek düşmektedir.

Çok verimli bir çeşittir. Peryodisiteye eğilimi çok azdır. Çok verimli olabilmesi için bakım koşullarına ve budamaya dikkat edilmesi gerekir. Meyveler daha çok ağacın dış kısmındadırlar. Kendine uyumsuzluk göstermektedir. Etraftan çiçek tozu gelmezse çekirdeksiz partenokarp meyveler meydana gelmektedir. İyi bir verim elde etmek için tozlayıcı çeşit karışımı yapmak yararlı olmaktadır. Ancak, meyve başına düşen çekirdek sayısında önemli bir artış meydana gelmektedir (Tuzcu 1990, Mendilcioğlu 1996).

Ağacı orta büyüklükte, dalları dikensize yakın ve yapraklanma sıktır. Ağaç soğuğa oldukça dayanıklıdır. Çiçeklenme ve meyve tutum dönemlerinde uygun olmayan iklim koşullarına ağaç çok duyarlıdır. Meyveleri erken olgunlaştığından sürekli kış yağışları ve donlarının başlamasından önce toplanmalıdır. Klemantin de, Satsuma gibi erkenci bir mandarin çeşidi olup meyveleri ekim ayı ortasından itibaren olgunlaşmaktadır (Hodgson 1967, Tuzcu 1990).

Klemantin monoembriyonik bir çeşittir ve ıslah amacıyla tohum ebeveyni olarak kullanılmaya elverişlidir. Ümit vadeden yeni mandarin ve tanjelo hibritleri Fairchild, Lee, Nova, Osceola, Page, Robinson, Fortune ve Fremont için tohum ebeveynidir. Satsuma gibi Klemantin de mutasyon eğilimi yüksektir. Dünyada en önde giden Klemantin üreticisi ülke İspanya'dır. İspanya' da başlangıçta Fina en üstün Klemantin mutantıyken Nules gibi daha kaliteli mutantlar keşfedilince üretimin yönü değişmiştir. Klemantin' in her yıl çok daha üstün niteliklerdeki mutantları keşfedilmektedir. Örneğin; SRA seleksiyonları, Nules, Oroval, Hernandina, Arrufatina, Orogrande, Marisol, Eshal, Oronules, Tamatera, Clemendart, Guillermina gibi. Bu mutantların herbirinin diğerlerine göre tat, aroma, meyve yapısı, meyve iç kalitesi, meyve iriliği, erkencilik veya geçcilik gibi farklı üstün yanları vardır. Bunlardan amaca, uygun yetiştiricilik yapılacak bölgenin ekolojik şartlarına ve pazar faktörüne en uygun seleksiyon seçilerek yetiştiricilik yapılmaktadır (Hodgson 1967, Burdette 1993).



Şekil 3 2. Materyal olarak genç yaprakların alındığı Klemantin ağacından bir görünüm

Robinson: Robinson, ABD’de Gardner ve Bellows(1942) tarafından Klemantin mandarini ile Orlando tanelonun melezlenmesi sonucu elde edilmiş ve 1959 yılında tanıtılmıştır. Daha iri meyveli bir çeşit olan Lee ve Osceola’ nın kardeşidir. ABD’den 1967 ve 1973 yıllarında yapılan introduksiyonlar ile Türkiye’ye girmiştir

Meyve kabuğu portakal renkli ve hafif pürüzlüdür; kalınlığı 3.75 mm'dir. Kabuğun meyve etine bağlılığı sıkıdır. Puflaşmaya eğilimi azdır. Taşımaya ve depolamaya elverişlidir. Meyveleri yuvarlağa yakın hafif basık şekilli, genişliği 67.71 mm, uzunluğu 9.28 mm, ağırlığı 145.22 gr' dır. Meyve eti sarı-portakal renkli, sulu, lezzetli ve tatlıdır. Olgunluk döneminde, usare miktarı % 46.32'dir. Suda çözünabilir kuru madde miktarı (SÇKM) %12.32, titre edilebilir asit miktarı (A) ise %0.95, SÇKM/A oranı 13.05'tir. Meyve başına 19.35 adet çekirdek düşmektedir. Verimli bir çeşit olup peryodisite eğilimi çok azdır. Düzenli meyve verir. Dalları dikensizdir. Yaprakları mızrak biçiminde ve geniştir. Ağaç kuvvetli büyür.

Erkenci bir çeşittir. Meyveleri Ekim-Aralık aylarında olgunlaşır. Olgunlaştıktan sonra ağaç üzerinde uzun süre kalabilir. Dökümlere dayanıklıdır. Gösterişli bir meyvedir. Çekirdekli olması dışında hiçbir problemi yoktur ve Türkiye' de hızla gelişmesi beklenen bir çeşittir (Hodgson 1967, Tuzcu 1990, Yeşiloğlu 1996).

Nova: Nova, 1942 yılında ABD' de Gardner tarafından Klemantin mandarini ile Orlando tanjelosunun melezlenmesi sonucu elde edilmiş ve gerekli incelemeler ve araştırmalardan sonra yetiştiricilere 1964 yılında tanıtılmıştır. Bu çok erken olgunlaşan çeşit Lee, Osceola ve Robinson mandarinlerinin kardeşidir. Türkiye' ye 1967 ve 1973 yıllarında yapılan introduksiyonlar ile girmiştir.

Meyve kabuğu parlak portakal renkli ve hafif pürüzlüdür; kalınlığı 3.96 mm'dir. Kabuk meyve etine' sıkı bağlıdır. Meyveleri hafif basık şekilli, genişliği 73.86 mm, uzunluğu 63.50 mm, ağırlığı 172.42 gr' dır. Meyve iriliği Klemantin' den daha fazladır. Meyve eti koyu portakal rengine, sulu ve lezzetlidir. Meyve kalitesi yüksektir. Meyvenin soyulabilirliği Klemantin' e göre daha zordur. Olgunluk döneminde, usare miktarı % 39.34'tür. Suda çözünabilir kuru madde miktarı (SÇKM) % 11.20, titre edilebilir asit miktarı (A) ise % 1.03, SÇKM/Asit oranı 10.59'dur. Meyve başına 20.92 adet çekirdek düşmektedir.

Verimli bir çeşit olup peryodisite eğilimi azdır. Olgunlaşma zamanı Kasım ayıdır. Puflaşmaya eğilimi yoktur. Poliembriyonik bir çeşittir. Ebeveyni Klemantin gibi

kendine uyuşmazdır. Ağaç üzerinde oldukça uzun süre kalabilmektedir. Doğu Akdeniz bölgesinde hızlı bir yayılım göstermiştir. Her yıl düzenli meyve verir. Meyve iriliği ve şekli bakımından Orlando' ya çok benzer ve irilik bakımından homojendir. Ayrıca Orlando' dan daha erken olgunlaşmakta ve gösterişli bir meyve olarak görülmektedir. Çekirdekli olması, tanelenmeye ve güneş yanıklığına duyarlı oluşu yetiştiriciliğini sınırlayan faktörlerdir. Carrizo citrange, Troyer citrange, Swingle citrumelo, Cleopatra mandarini ve X639 tavsiye edilen anaçlarıdır (Hodgson 1967, Tuzcu 1990, Burdette 1993).

Minneola Tanjelo: Minneola tanjelo, 1931 yılında Florida'da Duncan altıntopu ile Dancy mandarinin melezlenmesi ile elde edilmiştir. Orlando ve Seminole ile aynı ebeveynlere sahiptir. 1967 ve 1973 yıllarında ABD' den yapılan introduksiyonlar ile Türkiye' ye girmiştir.

Meyve kabuğu hasat döneminde koyu-portakal renkli, parlak ve düzgündür; kalınlığı 3.62 mm' dir. Kabuk meyve etine orta derecede bağlıdır. Taşımaya ve depolamaya elverişlidir. Meyveleri hafif uzun ve karakteristik bir şekilde biraz boyunlu, genişliği 49.73 mm, uzunluğu 62.94 mm, ağırlığı 105.6 g' dır. Meyve eti portakal rengine, yumuşak, sulu, lezzetli, aromalı ve hafif ekşidir. Olgunluk döneminde, usare miktarı % 45.77' dir. Suda çözülebilir kuru madde miktarı (SÇKM) % 11.35, titre edilebilir asit miktarı (A) % 1.06, SÇKM/Asit oranı 10.66' dir. Meyve başına 12.32 adet çekirdek düşmektedir.

Oldukça verimli bir çeşit olup periyodisite gösterir. Yeterli bir meyve verimi elde etmek için tozlayıcı çeşit karışımı yararlı olur. Ağaç kuvvetli ve geniş taçlıdır. Yaprakları geniş ve sivri uçludur. Soğuklara da oldukça dayanıklı bir çeşittir. Toprak yapısı ve iklime göre kullanılan anaçlar değişmektedir. Kaba limon, Volkameriana, Carrizo citrange, Troyer citrange ve Swingle citrumelo en popüler anaçlarıdır. Peryodisite ve alternarya' ya duyarlıdır.

Orta mevsim çeşidi olup, meyveleri Ocak-Şubat başında olgunlaşır. 1980' li yıllardan sonra, özellikle Doğu Akdeniz bölgesinde en fazla yayılan çeşittir (Hodgson 1967, Tuzcu 1990, Burdette 1993, Yeşiloğlu 1996).

Kinnow: Kinnow mandarin çeşidi, Kaliforniya Üniversitesi'nde Frost tarafından King ve Yerli mandarinlerinin melezlenmesi sonucu 1915 yılında elde edilmiştir ve 1935 yılında isimlendirilip yetiştiricilere tanıtılmıştır. 1967 ve 1973 yıllarında ABD'den yapılan introduksiyonlar ile Türkiye'ye girmiştir. Batı Pakistan ve Hindistan' da ticari olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır.

Meyve kabuğu hasat döneminde sarı portakal renkli, parlak ve düzgündür; kalınlığı 3.13 mm' dir. Kabuğun meyve etine bağlılığı sıkıdır. Puflaşmaya eğilimi azdır. Meyveleri basık yuvarlak şekillidir. Meyve genişliği 55.15 mm, uzunluğu 46.35 mm, ağırlığı 82.93 gr' dır. Meyve eti portakal renginde, çok sulu, tat ve aroma maddelerince zengin ve tatlı bir çeşittir. Olgunluk döneminde, usare miktarı %41.30' dur. Suda çözülebilir kuru madde miktarı (SÇKM) % 14.22, titre edilebilir asit miktarı ise %1.81, SÇKM/Asit oranı 7.96' dır. Meyve başına ortalama 22.20 adet çekirdek düşmektedir.

Verimli bir çeşit olup, "var" yıllarında aşırı miktarda meyve tutması nedeniyle meyve iriliğini arttırmak için seyreltme zorunluluğu vardır. Mutlak peryodisite gösterir. Ağaçları kuvvetli büyür, geniş taçlı, yüksek boyludur. Dalları dikensizdir. Geniş mızrak biçiminde bol yapraklı ve poliembriyonik bir çeşittir.

Geçci bir çeşit olup meyveleri Mart başında olgunlaşır. Olgunlaştıktan sonra çok az bir puflaşmayla ağaç üzerinde göreceli olarak uzun süre kalabilir. Geçci bir çeşit olması nedeniyle "var" yılında düşük sıcaklardan hem meyveler hem de ağaç önemli derecede zararlanır. Bu nedenle Türkiye' de soğuktan korunmuş bölgelere önerilmektedir (Hodgson 1967, Tuzcu 1990).

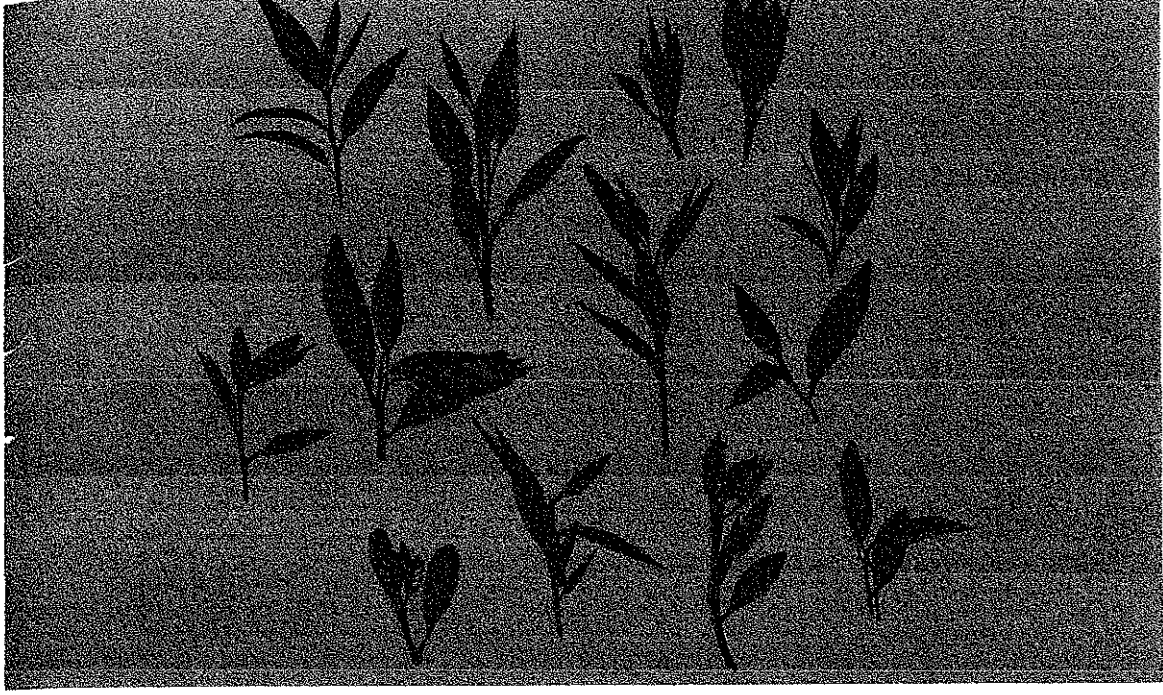
Lee: Lee, 1942 yılında ABD' de Gardner ve Bellows tarafından Klemantin mandarini ile Orlando tanjelosunun melezlenmesi sonucu elde edilmiş ve gerekli incelemeler ve araştırmalardan sonra yetiştiricilere 1958 yılında tanıtılmıştır.

Meyve orta iriliktendir. Meyve yüzeyi düzgün, pürüzsüz ve kabuğu kolay soyulabilir. Kasım sonu aralık başında olgunlaşır. Bazı iklim şartlarında hafif boynululuk görülebilir (Hodgson 1967).

3.2. Genomik DNA İzolasyonu

Bitki materyalinden genomik DNA' nın eldesi için Delloporta (Delloporta vd 1983) yöntemi kullanılmıştır. Bunun için her ağaçtan yaklaşık 1 gr genç yaprak dokuları alınarak bir miktar sıvı azot ile steril porselen havanda ince bulamaç olana dek ezilmiştir. 1.5 ml' lik otoklavlanmış eppendorf tüplerine aktarılan homejenatın üzerine 800 µl ekstraksiyon tamponu ve %20' lik 75 µl SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ilave edildikten sonra 10 dakika 65°C' lik su banyosunda tutulmuşlardır. SDS tüm proteinleri parçalar. Homojenat, SDS soğukta donacağı için 10 dakika 65°C' lik su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkan homejenatlara 5 M 200 µl Potasyum asetat ilave edilmiş ve vertekslenmiştir. Potasyum asetat istenilmeyen maddeleri çöktürmek için kullanılmıştır. Buz bulunan kabın içinde 20 dakika bekletildikten sonra 12.000 rpm' de (devir/dakika) 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı yeni tüplere aktarılmış ve %100' lük etanol ilave edildikten sonra tüpler yavaşça karıştırılmış ve 30 dakika derin dondurucuda (-20°C) bekletilmiştir. Derin dondurucudan çıkarılan tüpler 12.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı atılmış ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek birkaç dakika tutulmuştur.

Tüplere 100 µl TE konulmuş ve pipetlenerek çözelti iyice karıştırılmıştır. Solüsyon üzerine 100 µl Fenol- kloroform (Fenol- kloroform 1:1) karışımı eklenerek 12.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı alınıp başka tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 3 M 80 µl Sodyum asetat konulmuş, bunun üzerine de % 100' lük etanol konulmuştur. Bu aşamada tüpler yarım saat derin dondurucuda bekletilmiştir. Derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra DNA, 3-4 dakika 12.000 rpm' de santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı atılmış ve tüplerin dibinde sadece DNA bırakılmıştır.



Şekil 3 3. DNA ekstraksiyonunda kullanılan yaprakların alındığı genç sürgünler.

DNA' yı temizlemek için tekrar tüplere 100 µl TE konulmuş ve pipetlenerek çökelti iyice karıştırılmıştır. Solüsyon üzerine 100 µl Fenol- kloroform (Fenol- kloroform 1:1) karışımı eklenerek 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı alınıp başka tüplere aktarılmıştır. Her bir tüpe 3 M 80 µl Sodyum asetat konulmuş, bunun üzerine de % 100' lük etanol konulmuştur. Bu aşamada tüpler yarım saat derin dondurucuda bekletilmiş ve derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra DNA, 3-4 dakika 12.000 rpm' de santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki sıvı atılmış ve tüplerin dibinde sadece DNA bırakılmıştır. Bu DNA' lar % 70' lik Etanolle yıkanmış, 1 dakika santrifüjden sonra tüplerin üstü boşaltılmış ve sadece çökelti bırakılmıştır. Bu çökeltinin kuruması beklenmiş ve çökelti, herbir tüpe 100 µl TE Tamponu eklenerek çözündürülmüştür (Çizelge 3.1). RNA' yı ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, örneklerle 1 µl RNase (10mg/ml) enzimi konarak 37 °C' de 15 dakika inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar

Çözeltinin İsmi	İçeriği	Konsantrasyonu
Ekstraksiyon Tamponu	Tris HCl pH: 8.0	2.0 M
	EDTA pH: 8.0	0.5 M
	NaCl	5.0 M
	Mercaptoetanol	2.0 mM
TE Tamponu	Tris HCl pH: 8.0	2.0 M
	EDTA pH: 8.0	0.5 M

Çizelge 3.1.' de gösterilen ve ekstraksiyonda kullanıldığı belirtilen çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır;

Sodium Klorür 5M (50 ml): 14.61 gr NaCl 40 ml suda çözülmüş ve daha sonra çözeltinin hacmi 50 ml' ye tamamlanarak otoklav edilmiştir.

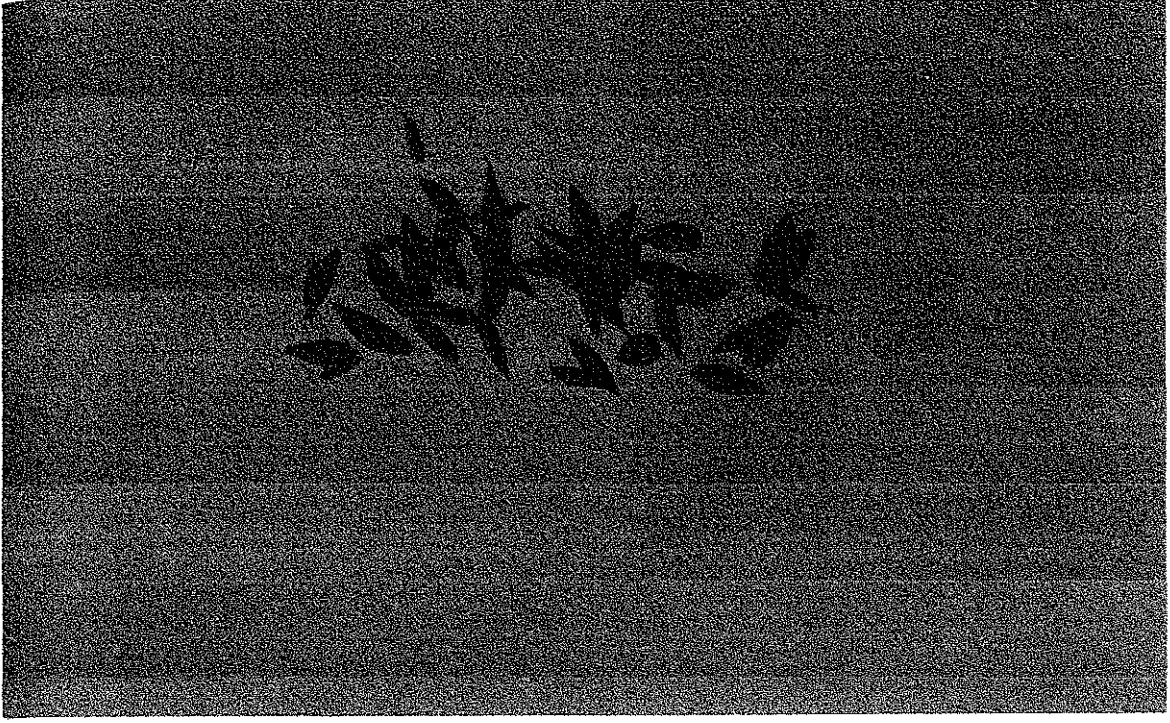
Ethylenediaminetetracetate (EDTA) 0.5 M (50 ml): 9.305 gr EDTA 30ml suda çözülmüş ve çözeltinin pH' sı 1 gr NaOH peleti ile 8.0' e ayarlanmış ve çözeltinin hacmi 50 ml' ye tamamlanarak otoklav edilmiştir.

Tris tamponu 2 M (50 ml) : 12.12 gr Tris base 30 ml suda çözülmüş ve çözeltinin pH' sı HCl ile 8'e ayarlanmış ve hacmi 50 ml' ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.

Sodyum Asetat 3 M (10 ml) : 2.46 gr Sodyum asetat 5 ml suda çözülmüş ve çözeltinin pH' sı glacial asetikasit ile 5.2' ye ayarlanmış ve çözeltinin hacmi 10 ml' ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.

Potasyum Asetat 5M (20ml) : 9.82 gr Potasyum asetat 10 ml suda çözülmüş ve daha sonra çözeltinin hacmi 20 ml' ye tamamlanarak otoklav edilmiştir.

SDS (Sodium Dodecyl Sülfat) % 20 : 20 gr SDS 100 ml suda çözülmüş ve filtre edilmiştir.



Şekil 3.4. DNA ekstraksiyonunda sıvı azot uygulamadan önceki genç yaprakların görünümü

3.2. 1. DNA miktarının spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesi

Spektrofotometrede okuma yapılmadan önce DNA' ların temiz olup olmadığı ve ayrıca DNA' larda kırılma olup olmadığı ekstrakte edilen DNA' lar jelde yürütülerek belirlenmiştir. Bu amaçla, % 0.8 Agaroz jel hazırlanmıştır. 10x Tris-acetate EDTA (TAE) tamponundan hazırlanan 1x TAE tamponu jelin yürütülmesinde kullanılmıştır. 10x TAE ve 1x TAE tamponları aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

10x TAE tamponu(1 L): 48.4 gr tris base, 11.42 ml Glacial acetic asit ve 20 ml EDTA' da (0.5 M) çözülmüş ve çözeltinin hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.

1x TAE tamponu(1 L): 10x TAE tamponundan 100 ml alınmış ve bunun üzerine 900 ml steril saf su ilave edilmiştir.

Ekstrakte edilen DNA'lar, Agaroze jel üzerinde yürütülmüştür. Bu amaçla, % 0.8 oranındaki Agaroze 1x TAE tamponunda mikrodalga fırında eritilmiş ve jel soğutulmuştur. Soğuyunca içerisine tarak yerleştirilmiş jel kabına dökülmüştür. Jel kabı içerisinde donduktan sonra tarak çekilmiş ve jel kabı elektroforez ünitesine yerleştirilmiştir. Elektroforez ünitesine jelin üzerini kapatacak kadar 1x TAE tamponundan ilave edilmiştir. Daha sonra DNA örneklerinden 4 µl, jel yükleme tamponundan (% 0.1 Bromfenol blue, 250 mM EDTA ve % 50 Glycerol) 1 µl alınmış ve bu karışım tarakların kuyucuklarına mikropipet yardımıyla yüklenmiştir. Jele marker olarak 1 µl 1 kb DNA ladder yüklenmiştir. Elektroforez 60 Volt' da gerçekleştirilmiş ve jelin yürütülmesine Bromofenol blue aşağı yukarı 3-4 cm ilerleyinceye kadar devam edilmiştir. Daha sonra jel etidyum bromid çözeltisinde yarım saatte boyanmış ve jel saf sudan geçirildikten sonra transilminatörde UV lamba altında görüntülenip termal kağıda fotoğrafı çekilmiştir. Jelin boyanmasında kullanılan etidyum bromid aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Ethidium Bromide çözeltisi: Önce ana stok, 1 ml' de 10 mg ethidium bromide olacak şekilde hazırlanmış. Daha sonra, bu stok çözeltiden her 100ml suya 5 µl ilave edilerek ara stok hazırlanmış ve jelin boyanmasında bu ara stok kullanılmıştır.

Elde edilen DNA örneklerinden 2 µl alınmış ve üzerlerine 1998 µl saf su ilave edilmiştir. Daha sonra, Spektro-fotometrede 260 (A_{260}) nm dalga boyunda absorpsiyon değerlerine bakılmış ve çift zincirli DNA konsantrasyonları hesaplanmıştır.

DNA konsantrasyonları hesaplanmasında;

“ Absorbans değeri (A_{260}) x 50 x Seyreltme Oranı” (Maniatis 1982) formülü kullanılmış ve Genomik DNA örnekleri buz dolabında saklanmıştır.

3. 3. RAPD Yöntemi ile Mandarin Çeşitlerinin Analizi

10 tane mandarin çeşidinden izole edilen genomik DNA' ların, RAPD yöntemiyle rastgele bölgeleri çoğaltılarak analiz yapılmıştır. Bu analiz de bazı RAPD parametreleri kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla; genomik DNA, Taq Polimeraz, MgCl₂, Primer, dNTP, 1x PCR tamponu ve bidestile sudur.

3. 3.1. Primer

Çalışmada 10 nükleotidlik 10 farklı primer kullanılmış ve bu kullanılan primerlerin nükleotid dizileri rastgele seçilmiş olup Guanin / Sitozin bazları oranı en az % 50 olanlar seçilmiştir. Bu primerlerin baz dizilişi Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Düşük G-C içerikli primerler genellikle verimli amplifikasyon oranı oluşturmamıştır. Çünkü G-C üç hidrojen bağı içerirken iki hidrojen bağı içeren A-T ve %50 den daha az G-C ile yapılan Primer-DNA hibridi 72°C sıcaklığa dayanamamıştır. Bu nedenle DNA- Primer hibridi polimeraz polimerasyonuna başlamadan önce yok olmuştur.

Çizelge 3.2. RAPD analizinde kullanılan 10 nükleotid uzunluğundaki primerler

İSİM	Dizi (5' - 3')	% G+C miktarı
A02	TGC/CGA/GCT/G	70
A04	AAT/CGG/GCT/G	60
A06	GAA/ACG/GGT/G	60
A07	AGA/TGC/AGC/C	60
A11	CAA/TCG/CCG/T	60
A13	CAG/CAC/CCA/C	70
E08	TCA/CCA/CGG/T	60
E09	CTT/CAC/CCG/A	60
E12	TTA/TCG/CCC/C	60
E14	TGC/GGC/TGA/G	70

3.3.2. Enzim

PCR teknolojisinde kullanılan ilk enzim olarak *E.coli*' den izole edilen DNA polimeraz enzimi termolabil olduğu için ısının 95°C' ye çıkması halinde inaktif olmaktadır. Bu dezavantajı gidermek amacıyla, her periyotta yeniden enzim katılması yerine ısıya dayanıklı enzim konulması üzerinde durulmuştur (Ercan 1998).

Bu amaçla Polimeraz Zincir reaksiyonlarında, termofilik bakteri olan *Thermus aquaticus*' dan izole edilen 100 °C sıcaklıkta bile aktivite gösterebilen bir enzim kullanılmıştır. Bu enzim yaklaşık 75°C sıcaklık ve pH 9'da en yüksek aktiviteyi gösteren Taq DNA polimeraz (Promega) enzimidir (Ercan 1998).

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çizelge 3. 2.' de gösterilen 10 primer kullanılarak yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonları aşağıda belirtilen RAPD parametrelerinin sırasıyla eppendorf tüplerine eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir

Çizelge 3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu' nda kullanılan RAPD parametreleri

RAPD Parametreleri	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon
Steril bidestile su	10.75	—
Taq polimeraz inkübasyon tamponu (Promega)	2.5	50mM KCL, 1mM Tris- HCl (pH: 9) ve % 1 triton X-100
MgCl ₂ (Promega)	2.5	25 mM
dNTP (Promega)' ler	1	5 mM
Primer (Promega)	5	10 pmol
Genomik DNA	1.5	50 ng
Taq DNA polimeraz Enzimi (Promega)	0.25	1.25 ünite

Bu parametreler eppendorf tüplerine sırasıyla konmuş ve sonra da iyice karıştırılan eppendorf tüplerine eşit hacimde mineral yağ eklenmiş ve PCR cihazında

mandarin türüne uygun daha önceden belirlenmiş programa tüpler yerleştirilmiştir. Herbir tüp üzerine eşit hacimde mineral yağ koymamızın nedeni buharlaşmayı önlemektir. Mandarin türü için belirlenen protokol tüm çalışmalar için kullanılamamıştır.

PCR cihazında kullanılan program aşağıdaki gibidir;

95 °C	5 dakika	1 döngü	Denaturasyon
94 °C	1 dakika		Denaturasyon
36 °C	1 5 dakika	45 döngü	Annealing
72 °C	2 dakika		Extension
72 °C	10 dakika	1 döngü	Extension

3. 5. Agaroz Jel Elektroforezi

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri % 1.5 ve %1.6 Agaroz jeller kullanılarak analiz edilmiştir. 0.75 gr veya 0.8 gr Agaroz (agorose basica) tartılıp, çizelge 3. 4.' de belirtilen 50ml 1x TAE tamponunun bulunduğu bir erlenmayer mikrodalga fırına konmuş, Agaroz iyice çözdürülmüştür. Bu işlemi yaparken kaynamaya engel olacak şekilde sık aralıklarla erlen mayer mikrodalgadan çıkarılıp karıştırılarak tampon içindeki Agarozun çözdürülmesi sağlanmıştır.

Daha önceden belirlenen elektroforez kabının içine amacımıza uygun yeterli miktarda dişi olan tarak yerleştirilmiştir. Tampon soğutulduktan sonra, kabarcık kalmayacak şekilde kab içine dökülmüştür. Tampon döküldükten sonra meydana gelen kabarcıklar pipet ucu ile dikkatlice yok edildikten sonra tampon donmaya bırakılmıştır. Jel yaklaşık 20-25 dakikada dondurulmuş ve 1x TAE tamponu jelin üzerini tamamen kaplayacak şekilde döküldükten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Tarak çıkarılırken mutlaka tampon konmuş olmalıdır. DNA'nın kuyucuğa yüklenip

yüklenmediğini ve ne kadar elektroforez olduğunu anlamak için boya (yükleme tamponu) kullanılmıştır. Küçük ependorf tüplerinde (0.5 µl) bulunan her bir örneğe 3 µl bromofenol mavisi ilave edilmiştir. Bunun üzerine de polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinden aldığımız 15 µl ürün konulmuş ve karıştırılmıştır. Her bir karışım ayrı ayrı jel kuyucuklarına yüklenmiştir.

Elektroforez, sabit 60V ve 130 A serbest akım altında (-)' den (+)' ya doğru ortalama 2.5 saat yapılmıştır. DNA yürütülüp elektroforez bittikten sonra Etidyum Bromid ile jel boyanmış ve boyama işlemi bittikten sonra U. V ışığı altında gözlenen bantlar fotoğraflanmıştır.

Çizelge 3.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar

Tamponun ismi	İçeriği	Konsantrasyonu
TAE Tamponu (10x)	Tris bazı Glacial asetik asit EDTA, pH 8	48.4 g 11.42 g 0.5 M (20 ml)
Elektroforez Tamponu	Yükleme Bromo fenol mavisi EDTA Glycerol	% 0.1 250 mM % 50

3. 6. RAPD Çalışmalarında Kullanılan İstatiksel Analizler

DNA ekstraksiyonu ve RAPD çalışmaları, 2 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Çeşitler arasındaki genetik ilişki cluster analizine göre saptanmıştır. Çalışmada, cluster analiz yöntemlerinden Unweighted pair group method of arithmetic analysis (UPGMA) yöntemi kullanılmıştır (Sigiura vd 1988). Bu yöntemde, DNA bantlarının varlığı (1) ve yokluğuna göre (0) çeşitler arasındaki benzerlik birbirleri ile kıyaslanarak DNA düzeyindeki farklılıkları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Benzerlik İndeksi\%} = \frac{\text{Homolog Bant sayısı}}{\text{Homolog Bant sayısı} + \text{Homolog Olmayan Bant sayısı}} \times 100$$

$$\text{Polimorfizm \%} = 100 - \text{benzerlik oranı \%}$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. RAPD Çalışmalarına İlişkin Sonuçlar

4. 1. 1. DNA ekstraksiyonu ve konsantrasyonuna ilişkin sonuçlar

DNA ekstraksiyonunda Doyle ve Doyle (1990), Draper (1987) ve Dellaporta (1983) yöntemleri denenmiş. Ancak, Doyle ve Doyle ve Draper yöntemlerinde elde edilen DNA' lardan PCR sonucunda amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Bunun nedeni mandarin bitki dokularında bulunan polisakkaritler, polifenoller ve karbonhidratlardır. Bu maddeler DNA izolasyonunu güçleştirirler. DNA yeterince saf değilse PCR sonucunda amplifikasyon gerçekleşmez (Luro vd 1992, Cai vd 1994). Dellaporta yönteminde fenol ve kloroform kullanılarak DNA karbonhidratlar, polisakkaritler ve polifenollerden temizlenmiştir. Bu yöntemde elde edilen DNA' larda PCR sonucunda amplifikasyon gerçekleşmiştir.

DNA konsantrasyonunun saptanmasında 3 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar, standart DNA serileri kullanılarak DNA örneklerinin jelde yürütülmesi, etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV ışık kaynağı altında görüntülenmesi, spektrofotometrik ve fluorometrik yöntemlerdir. Bu yöntemlerden en çok tercih edileni fluometrik yöntemdir. Çünkü DNA örnekleri RNA içerikli olsalar bile DNA konsantrasyonu güvenilir bir şekilde tespit edilebilmektedir. Diğer bir yöntem olan standart DNA kullanılarak DNA konsantrasyonunun tespit edilmesi ise kolay bir

yöntem olması nedeniyle tercih edilebilmektedir. 3. yöntem olan spektrofotometrede DNA konsantrasyonunun okunabilmesi için DNA örneklerinin çok temiz olması gereklidir. DNA örneklerinin içeriğinde protein, RNA ve fenol bulunmaması gerekir.

Değişik mandarin çeşitlerine ait DNA örnekleri DNA miktarı saptanmadan önce % 0.8 Agaroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş ve tüm klonlara ait DNA örneklerinin protein, fenol ve RNA içermedikleri tespit edilmiştir. Tüm çeşitlere ait DNA örneklerinin çok yoğun miktarda DNA içerdikleri ve DNA ' ların oldukça kaliteli olduğu görülmüştür. DNA konsantrasyonunun saptanmasında spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Spektrofotometrik yöntemde, 260 nm (A_{260})' de absorbans değeri okunmuş ve materyal metodda belirtilen formüle göre DNA miktarı hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Değişik mandarin çeşitlerine ait DNA örneklerinde A_{260} nm' de okunan absorbans değerleri ve çeşitlere göre saptanan DNA miktarları

Çeşitler	Dalga Boyu (nm)	
	A_{260}	DNA miktarı (ng/μl)
Klemantin	0.052	520
Nova I	0.046	460
Nova II	0.062	620
Nova III	0.043	430
Lee I	0.059	590
Lee II	0.107	107
Kinnow	0.058	580
Robinson	0.050	500
Satsuma	0.040	400
Minneola Tanjelo	0.069	690

DNA ekstraksiyonunda araştırmacılar farklı yöntemler kullanarak sonuca ulaşmışlardır. Deng vd (1995), limonda yaptıkları çalışmada Doyle ve Doyle (1987) metoduna göre ekstraksiyon yapmışlardır. Ekstraksiyon tamponunda % 3' lük CTAB

kullanmışlardır. DNA konsantrasyonunu TKO-100 DNA fluometresiyle tespit etmişlerdir Machado vd (1996), akdeniz mandarinlerindeki genetik ilişkiyi tespit etmek için yaptıkları çalışmada Murray ve Thompson metoduna göre ekstraksiyon yapmışlardır. Ekstraksiyon tamponunu % 1' lik ve % 10' luk CTAB olmak üzere 2 kez hazırlayıp, uygulamışlardır. Luro vd (1992), Doyle ve Doyle (1987) metoduna göre DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Cai vd (1994), DNA ekstraksiyonu Durham metoduna göre gerçekleştirilmiş ve oldukça kaliteli DNA elde etmişlerdir. Sugawara vd (1995), Dellaporta (1983) yöntemine göre DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Galdfrisi vd (1998), kestanede yaptıkları çalışmada başlangıçta DNA ekstraksiyonunda problemle karşılaşmışlar. Ancak daha sonra Doyle ve Doyle (1990) metodunu kullanmışlar ve iyi sonuçlar almışlardır. Ancak bu metodda CTAB içeren ekstraksiyon tamponunu 1 kez değil 2-3 kez uygulayarak, flavononları, alkaloidleri ve tanenleri hücreden uzaklaştırmışlardır. Çünkü bu maddeler PCR sonucunda amplifikasyona engel olurlar.

Bu çalışmamızda Doyle ve Doyle metodu uygulanırken CTAB içeren ekstraksiyon tamponunu ve kloroform-fenol uygulanmış, fakat elde edilen DNA uygulanan PCR sonucunda amplifike olmamıştır. Bunun üzerine Dellaporta yöntemi kullanılarak ekstrakte edilen DNA' larda kullanılan fenol ve kloroform sayesinde karbonhidratlar, polisakkaritler ve polifenoller temizlenmiş ve PCR yapılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

4. 1. 2. RAPD parametrelerinin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar

RAPD parametrelerinin optimizasyonunda Klemantin mandarin çeşidi ve A02 primeri kullanılmıştır. İlk olarak, RAPD parametrelerinden DNA miktarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Değişik mandarin çeşitlerine ait DNA örneklerinde spektrofotometrik yöntemle göre saptanan DNA miktarları dikkate alınarak, DNA' lar 1µl ' de 10, 20, 25, 50 ve 100 ng olacak şekilde sulandırılmıştır. Diğer RAPD parametreleri materyal ve metod kısmında belirtildiği gibi sabit tutulmuştur.

Bulgularımız sonucunda DNA miktarı 50 ng olarak kullanıldığı zaman en iyi sonuç alınmıştır. DNA miktarı 10 ng olarak kullanıldığı zaman, PCR amplifikasyonu

tam gerçekleşmemiş ve sadece 2-3 bant elde edilmiştir. DNA miktarı 20 ve 25 ng' a çıkarıldığı zaman bant büyüklükleri biraz daha artmış ve daha fazla sayıda bant elde edilmiştir, ancak 50 ng DNA kullanıldığı zaman bantların yoğunluğu, parlaklığı 20 ve 25 ng' a göre daha yüksek tespit edilmiştir. DNA miktarı 50 ng kullanıldığı zaman bant büyüklükleri 350 ile 1370 bp arasında değişmiştir. DNA miktarı 100 ng' a çıkarıldığı zaman ise bantların yoğunluğu ve netliği kaybolmuş ayrıca bant sayısında da azalma tespit edilmiştir. DNA miktarı, bazı araştırmacıların bulguları ile uyum içerisinde bulunurken, diğer bazı araştırmacıların bulgularından farklılık göstermiştir. Bu durum, RAPD reaksiyonlarında kullanılan diğer RAPD parametrelerinin bizim çalışmalarımızda kullanılan parametrelerin miktarlarından farklı olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca PCR cihazı ve döngülerin farklılığı da sonucu etkileyebilmektedir.

Turunçgiller konusunda yapılan çalışmalarda DNA miktarını, Deng vd (1995) 25 µl' lik RAPD reaksiyonu için 25 ng; Cai vd (1994) 25 µl' lik RAPD reaksiyonu için 15 ng; Sugawara vd (1995) 12.5 µl' lik RAPD reaksiyonu için 10 ng; Luro vd (1992) 25µl' lik reaksiyon hacmi için 50 ng; Machado vd (1996) 25µl' lik reaksiyon hacmi için 10 ng olarak kullanmışlardır. Turunçgillerde DNA' nın miktarı kadar temizliği üzerinde de durulmuştur (Cai vd 1994).

Deng vd (1995) ekstraksiyon sonucunda elde edilen DNA konsantrasyonunu TKO- 100 DNA fluometresiyle tespit etmişler. Paz vd (1997) patatesde DNA konsantrasyonunu minifluometre ile tespit etmiş 25 µl' lik reaksiyon hacminde 20 ng DNA ; Yang ve Quiros (1993) kerevizde DNA konsantrasyonunu 260 nm dalga boyunda spektrofotometre ile tespit etmiş 15 µl' lik reaksiyon hacminde 15 ng DNA; Varghese vd (1997) *Hevea brasiliens* de DNA konsantrasyonunu fluometre ile tespit etmiş, 25 µl' lik reaksiyon hacminde 50 ng DNA kullanmışlardır. Moreno vd (1995) üzümde DNA konsantrasyonunu TKO 100 mini fluometresiyle tespit etmiş ve 25 µl' lik reaksiyon hacminde 5 ng DNA kullanmışlardır. Conner vd (1997) elmada 25 µl' lik reaksiyon hacminde 50 ng DNA; Galdfrisi vd (1998) kestane 50 µl' lik RAPD reaksiyonunda 10 ng DNA; Bartolozzi vd (1998) bademde 25 µl' lik reaksiyonda 50 ng DNA kullanmışlardır.

RAPD parametrelerinden $MgCl_2$ ' ün optimizasyonunda 1.5, 2, 2.5, 3 ve 4 μM olmak üzere 5 farklı $MgCl_2$ konsantrasyonu denenmiştir. Diğer RAPD parametreleri $MgCl_2$ optimizasyonu sırasında materyal ve metod kısmında verildiği miktarlarda sabit tutulmuştur. En iyi amplifikasyon ürünleri 2.5 mM $MgCl_2$ kullanıldığında elde edilmiştir. 2.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunun altında ve üstünde optimum bant sayısında farklılıklar görülmüştür. 4 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda belli belirsiz çok fazla bant oluşmuştur. 1.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonundaki bant sayısı ise 2.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonuna göre daha az ve spesifik olmayan bantlar oluşturmuştur.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar turuncgillerde ve diğer meyve türlerinde elde edilen bazı araştırma bulguları ile uyum içerisindedir. $MgCl_2$ konsantrasyonunu Deng vd (1995) tarafından yapılan çalışmada 2.5 mM; Luro vd (1992) 2 mM; Cai vd (1994) 2mM konsantrasyonda önermişlerdir. $MgCl_2$ konsantrasyonu Galdrisi vd (1998) tarafından kestanede yapılan çalışmada 3 mM; Conner vd (1997) tarafından elmada yapılan çalışmada 2.5 mM olarak almışlardır.

RAPD reaksiyonlarında amplifikasyon üzerine etkili olan bir diğer faktör de enzimdir. RAPD reaksiyonlarında 100°C sıcaklıkta bile aktivite gösterebilen Taq polimeraz enzimi kullanılmıştır. Taq polimeraz enziminin optimizasyonu için 4 farklı konsantrasyon (0.50, 0.75, 1 ve 1.25 ünite) denenmiştir. Bulgularımız sonucunda, taq polimeraz enziminin konsantrasyonu 0.50 ünite olduğu zaman DNA' yı amplifike edebilecek enzim miktarı yeterli olmamış ve PCR amplifikasyonu gerçekleşmemiştir. Taq polimeraz konsantrasyonu 0.75 üniteye çıkarıldığı zaman PCR amplifikasyonu gerçekleşmiş, fakat oluşan bant sayısı ve netliği ise az görülmüştür. Taq polimeraz enzim konsantrasyonu 1 üniteye yükseltildiğinde yine 0.75 üniteye göre daha net ve fazla bant oluşmuş, ancak en iyi sonuç 1.25 üniteye çıkartıldığında alınmıştır. Sugawara vd (1995), Tth DNA polimerazı herbir 12.5 μl ' lik RAPD reaksiyonu için 0.5 ünite; Cai vd (1994), Promega ürünü taq polimerazı 25 μl ' lik reaksiyon hacmi için 0.5 ünite; Deng vd (1995), 25 μl ' lik RAPD reaksiyonu için Promega taq polimerazdan 1 ünite; Machado vd (1996) mandarinde yaptıkları çalışmada 13 μl ' lik reaksiyon hacmi için 1.5 ünite taq polimeraz (promega) önermişlerdir. Sugawara vd (1995) ve Luro vd (1992)' nin kullandığı Taq polimeraz miktarı bizim kullandığımız taq polimeraz miktarından

daha düşüktür. Bunun nedeni muhtemelen farklı firmaların ürünlerinin kullanılmasıdır. Denemelerimizde Cai vd (1994) ile aynı firmalarının ürünlerini kullanmamıza rağmen, önerdiğimiz taq polimeraz enzimi bu araştırmacılar tarafından önerilen miktardan daha düşük saptanmıştır. Bu ise denemelerde kullanılan diğer RAPD parametrelerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Nitekim bu araştırmacılar, RAPD reaksiyonlarında DNA miktarını 15 ng, $MgCl_2$ miktarını 2 mM olarak kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda ise DNA miktarı 50 ng, $MgCl_2$ konsantrasyonunu ise 2.5 mM kullanmışlardır. Aynı firmanın ürünlerini kullanmamıza rağmen Deng vd (1995)' nin önerdiği taq polimeraz miktarı bizim önerdiğimiz taq polimeraz miktarından daha düşük çıkmıştır. Yine bunun nedeni de kullanılan diğer RAPD parametrelerine bağlanmıştır.

RAPD reaksiyonlarında etkili olan diğer bir parametre de primerdir. Primer konsantrasyonu üzerinde durulmuş ve 10, 30, 40 ve 50 pmol olmak üzere 4 farklı konsantrasyon denenmiştir. Bantların netliği ve sayısı açısından 30 ve 40 pmol konsantrasyonlar iyi sonuç vermesine rağmen en iyi sonuç 50 pmol konsantrasyonda alınmıştır. Deng vd (1995) primer konsantrasyonu olarak 25 μ l' lik RAPD reaksiyonu için 0.3 μ M; Luro vd (1992) 25 μ l' lik reaksiyon için 0.5 μ M, Sugawara vd (1995) 12.5 μ l' lik RAPD reaksiyonu için 10.5 ng primer; Cai vd (1994) çalışmalarında 25 μ l' lik reaksiyon için 0.4 μ M önermişlerdir. Ayrıca Machado vd (1996) akdeniz mandarininde yaptıkları çalışmada 15 ng' lik 8 ve 10 mer' lik primerler kullanmışlardır.

Denememizde en son olarak dNTP konsantrasyonunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. dNTP optimizasyonunun saptanması sırasında kullanılan diğer RAPD parametrelerinin miktarları materyal ve metod kısmında bildirildiği şekilde alınmış ve optimizasyon gerçekleştirilmiştir. 3 farklı dNTP konsantrasyonu (2, 3 ve 5 mM) denenmiş, bantların yoğunluğu ve parlaklığı üzerine dNTP konsantrasyonunun etkili olduğu saptanmıştır. dNTP konsantrasyonu 2 ve 3mM olduğu zaman bantların çok yoğun ve parlak olmadığı ancak 5 mM olduğu zaman bantların yoğunluk ve parlaklığının arttığı tespit edilmiştir.

25µl' lik reaksiyon hazırladığımızda 0.2mM' lık dNTPs konsantrasyonu elde edebilmek için 1µl 5 mM dNTPs kullanılmaktadır. Bu şekilde oluşan bantların yoğunluk ve parlaklığı maksimuma ulaşmıştır. Turunçgillerle ilgili diğer araştırmacıların bulgularına göre ise dNTPs konsantrasyonu 0.1mM ile 0.8mM arasında değişmektedir. Bu sonuçlarda bizim sonuçlarımızla uyum içerisinde.

Deng vd (1995) *in vivo* ve *in vitro* koşullarındaki limonlarda yaptıkları çalışmada 25µl' lik reaksiyon için 0.1mM dNTPs kullanımını önermişlerdir. Luro vd (1992) turunçgil genetik ve taksonomisindeki çalışmalarında herbir nükleotidden 200 µM; Cai vd (1994) herbir nükleotidden 200 µM olacak şekilde 0.8 mM dNTP; Sugawara vd (1995) herbir nükleotidden 160 µM; Machado vd (1996) akdeniz mandarinlerinde genetik ilişkinin saptanması amacıyla RAPD reaksiyonlarında dNTP miktarını 0.8 mM olarak önermişlerdir.

RAPD reaksiyonlarında kullanılan tüm parametreler birbiri ile ilişkilidir. Tüm parametreler bir diğerinin oranı veya konsantrasyonundan etkilenir. Ayrıca kullanılan PCR cihazının markası, reaksiyonu kuran kişi, döngü sayıları ve sıcaklığı gibi faktörlerde sonuçla direkt ilgilidir.

4.1. 3. Değişik mandarin çeşitleri arasında varyasyonların saptanmasına ilişkin sonuçlar

RAPD çalışmalarında reaksiyon hacmi 25 µl tutulmuş. Herbir reaksiyon karışımı üzerine 20-25 µl mineral yağ ilave edilmiştir. PCR programı bitki türlerine ve çeşitlerine göre farklılık göstermektedir. Mandarinde değişik programlar denendikten sonra materyal ve metod kısmında belirtilen program ile en iyi sonuç alınmıştır. Program da en az diğer RAPD parametreleri kadar amplifikasyonda önemli bir faktör olarak bulunmuştur. Program farklılığının nedeni genelde kullanılan PCR cihazlarının farklılığına amaca ve bitki materyalinin farklılığına bağlanmıştır. Bu nedenle kullanılan her PCR cihazı için optimizasyon farklı olmuştur. Deng vd (1995), 94 °C' de 5 dakika (1 döngü), 94°C' de 15 saniye, 36 °C' de 15 saniye ve 72°C' de 80 saniye (45 döngü) son olarak 72°C' de 10 dakikalık programı; Sugawara vd (1995), 93°C' de 1dakika , 42°C' de 1 dakika, 72 °C' de 2 dakika ve 40 döngülük bir program; Cai vd (1994), 93

°C' de 1 dakika, 35 °C' de 1 dakika 72 °C' de 2 dakika 42 döngülük PCR programlarını önermişlerdir. Machado vd (1996) akdeniz mandarinin de yaptığı çalışmada 92 °C' de 1 dakika, 36°C' de 1 dakika ve 72°C' de 2 dakika (36döngü), son olarak ise 72°C' de 10 dakika (1 döngü) şeklinde bir program uygulamıştır. Aynı türde çalışılmasına rağmen, bizim çalışmamızdaki döngü ve sürelerle olan farklılığın nedeni kullanılan PCR cihazının farklılığından kaynaklanmaktadır. Çünkü Machado vd(1996) yaptıkları çalışmada MJ adlı bir PCR cihazı kullanmışlardır. Deng vd (1995) kullandığı program ile bizim çalışmamızdaki programın farklılığı, onların çalışmasında materyal olarak limon bizim çalışmamızda materyal olarak mandarin kullanılmış olmasından kaynaklanabilir. Sugawara vd (1995)' de yaptığı çalışmada kullanılan program ile bizim programımızın farklılığı amacın tamamen farklı olması olabilir. Çünkü Sugawara vd' in çalışmalarının amacı turuncgil kimeralarını tanımlamaktır. Cai vd (1994) çalışmaları ile program farklılığı ise tamamen kullanılan çeşit ve türlerin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

PCR amplifikasyonu elde edilen ürünlerin ayrıştırılması % 1 5-1 6 jelde 1x TAE tamponunda elektroforez cihazında 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Jel etidyum bromid ile boyandıktan sonra UV ışık kaynağı altında görüntülenmiş ve termal kağıda fotoğrafı çekilmiştir. Herbir primer ile 2 tekerrür yapılmış, uygun olmayan sonuçlarda 3. tekerrür de uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde Sigiura vd (1998)' ne göre % benzerlik indeksi aşağıdaki formüle göre hesaplanarak kullanılmıştır. PCR amplifikasyonunda oluşan bantların varlığına (1) ve yokluğuna (0) göre denenen her bir primer için çeşitler birbiri ile kıyaslanarak benzerlik oranları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmış ve daha sonra herbir primer için hesaplanan benzerlik oranlarının ortalaması alınarak benzerlik indeksi oluşturulmuştur.

$$\text{Benzerlik indeksi \%} = \frac{\text{Homolog Bant sayısı}}{\text{Homolog Bant sayısı} + \text{Homolog Olmayan Bant sayısı}} \times 100$$

Çeşitler arasındaki polimorfizmin saptanmasında 10 bp' lik 10 farklı primer kullanılmıştır. Turuncgillerde yapılan diğer çalışmalarda da 10 mer'lik primerler kullanılmıştır. G- C içeriği yüksek olan primerler tercih edilmiş ve bu primerlerle daha

iyi sonuçlar alınmıştır. Kullanılan primerler literatürlerden turuncgillerde yüksek polimorfizm oluşturanlardan seçilmiştir. Kullanılan primere ve çeşide göre oluşan bantların sayısı ve uzunluğunda farklılık tespit edilmiştir. Denemelerde kullanılan primerlere göre değişik mandarin çeşitlerinde saptanan toplam bant sayıları Çizelge 4.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 2 Değişik Mandarin çeşitlerinde, farklı primerlerle saptanan toplam bant sayıları

ÇEŞİTLER										
Primer Kod No	Klemantin	Nova I	Nova II	Nova III	Lee I	Lee II	Kinnow	Robinson	Satsuma	Minneola Tanjelo
A02	6	3	3	5	7	3	2	4	3	4
A04	7	5	5	7	5	6	6	5	10	6
A06	5	8	4	7	7	7	4	1	8	5
A07	7	6	9	7	8	7	6	7	4	11
A11	7	4	5	7	5	5	2	5	3	5
A13	4	7	6	6	5	4	5	2	5	5
E08	3	6	4	4	1	3	2	4	2	6
E09	5	5	4	5	4	5	4	4	5	5
E12	4	4	4	2	2	2	4	4	4	2
E14	3	5	6	4	4	3	4	5	2	6

Bu çizelgeden de anlaşıldığı gibi toplam bant sayısı primerlere ve çeşitlere göre değişmekle beraber 1 ile 11 arasında değişmektedir. Primer başına düşen ortalama bant sayısı A07, A04 ve A06 primerlerinde diğer primerlere göre daha yüksek tespit edilmiştir; E12 primerinde 3.2 adet, E08 primerinde 3.5 adet, A02 primerinde 4 adet, E14 primerinde 4.2 adet, E09 primeri 4.6 adet, A11 primerinde 4.8 adet, A13 primerinde 4.9 adet, A06 primerinde 5.6 adet, A07 primerinde 7.2 adet, A04 primerinde ise 6.2 adet olarak bulunmuştur. Tüm primerlerin ortalama bant sayısı ise 4.8 olarak tespit edilmiştir.

Araştırma bulgularımız sonucunda, primer ve çeşitlere göre saptanan bant sayıları genelde araştırmacıların bulguları ile uyum içerisindedir. Deng vd (1995) tarafından limonlarda yapılan çalışmada bant sayılarının 5 ile 21 arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. Ortalama bant sayısı ise 13 olarak saptanmıştır. Cai vd (1994)' in çalışmalarında 4-19 arasında bant olduğu tespit edilmiştir. Sugawara vd (1995), 124 primerle çalışmış 12 tanesi polimorfik bant oluşturmuştur. Machado vd (1996), akdeniz mandarinlerinde yapılan çalışmada 2 ile 8 bant arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. Deng vd (1995), Cai vd (1994)' ün çalışmalarında bizim bulgularımıza göre daha çok bant oluşma nedeni farklı türlerde ve farklı primerlerle çalışılmış olmalarından kaynaklanabilir. Öte yandan Machado vd (1996) çalışmasında bulunduğu bant sayıları bizim bulgularımızla uyum içerisindedir.

Araştırma bulgularımız sonucunda, kullanılan primere göre mandarin çeşitlerinde saptanan bant büyüklükleri 230-2400 bp arasında değişim göstermiştir. Bant büyüklükleri E12 ve A11 primerlerinde diğer primerlerden daha yüksek bulunmuştur. Araştırma bulgularımız sonucunda saptanan bantların büyüklükleri birçok araştırmacının bulguları ile uyum içersinde bulunmuştur. Machado vd (1996)' in akdeniz mandarinlerinde yaptıkları çalışmada, elde edilen bantların büyüklükleri 274 ile 3006 bp arasında değişim gösterdiğini bildirmişler. Luro vd (1992) turunçgil genetik ve taksonomisi üzerine yaptıkları çalışmada (GTG)₅, (GACA)₄ ve (TCC)₅ primerlerini kullanmışlardır. (GACA)₄ ve (TCC)₅ primerleri kullanıldığında oluşan bant büyüklükleri 200 ile 1800 bp arasında, (GTG)₅ primeri kullanıldığında oluşan bant büyüklükleri ise 370 ile 1000 bp arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Cai vd (1994), çalışmalarında 140 adet primer kullanmışlar, ancak sadece 69 primer amplifikasyon oluşturmuştur. Amplifikasyon sonucu oluşan bantların büyüklükleri ise 200bp' den 3 kb' e değişim göstermiştir. Deng vd (1995), *in vivo* ve *in vitro* koşullarındaki limon mutantlarında yaptıkları çalışmada 36 adet 10 mer' lik primer kullanmışlardır. Primerlerden 14 tanesi klonlar arasında monomorfik bant, geri kalan 22 tanesi ise 294 adet bant oluşturmuş, bu 294 bandın % 15' i ise polimorfik olarak tespit edilmiştir. Amplifikasyon sonucu oluşan bantların büyüklüklerinin 100 ile 3200 bp arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bant uzunluğu en kısa olan ise E14 primeri yalnızca

230 bp' den 700 bp' e kadar uzanmaktadır Daha sonra bunu E09 primeri 300 bp' den 1200 bp' e uzanarak takip etmektedir.

10 adet mandarin çeşidinde 10 bazlık primer kullanılarak RAPD-PCR tekniği uygulanarak elde edilmiş olan DNA polimorfizmi var/yok (1/0) şeklinde değerlendirilerek, araştırmaya alınan çeşitlerin birbirlerine olan yakınlık ve uzaklık dereceleri tespit edilmek amacıyla Benzerlik İndeksi (Similarity Index %) % olarak Siguira ve ark . (1988)' na göre metot kısmında belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

10 adet mandarin çeşidine ait % benzerlik indeksi değerleri çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. PCR amplifikasyonu sonucu değişik mandarin çeşitlerinde Siguira ve ark (1988)' na göre oluşturulan benzerlik indeksi değerleri (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100									
2	64	100								
3	63	76	100							
4	53	57	51	100						
5	54	61	58	45	100					
6	48	44	51	42	39	100				
7	56	66	64	63	54	46	100			
8	51	56	56	73	55	52	72	100		
9	60	68	57	60	52	53	64	72	100	
10	49	45	49	47	37	54	59	51	66	100

1: Klemantin, 2: Nova III, 3: Lee I, 4: Robinson, 5: Minneola Tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee II, 8: Nova II, 9: Nova I, 10: Satsuma

Çizelge 4.3.' de de görüldüğü gibi çeşitler arasındaki % benzerlik indeksi en yüksek olarak Nova - III ve Lee- I mandarin çeşitleri arasında saptanmıştır. Bunu Robinson ve Nova- II mandarin çeşitleri, daha sonrada Nova-II ve Nova-I mandarin

çeşitleri izlemiştir. Ayrıca Nova-II ve Lee-II mandarin çeşitleri arasındaki benzerlikte oldukça yüksek tespit edilmiştir. Analiz edilen tüm mandarin çeşitlerindeki benzerlik değerleri ise % 76 ile % 37 arasında değişmiştir. Nova-I ile Nova- III arasındaki yakınlık % 68 olarak tespit edilmiştir. Nova-III ve Lee- I mandarin çeşitlerinde en fazla benzerlik tespit edilmiştir. Nova, Klemantin mandarini ile Orlando tanjelo melezlenmesinden elde edilmiştir. Lee mandarini de Klemantin mandarini ile Orlando tanjelo melezlenmesinden elde edilmiştir (Hodgson, 1967). Bu bilgiler doğrultusunda benzerliğin yüksek olma nedeni her iki çeşidin ebeveynlerinin aynı olmasına bağlanabilir. Robinson ve Nova-II mandarin çeşitleri arasında da yüksek polimorfizm tespit edilmiş, bunun nedeni de her iki çeşidin ebeveyninin aynı olmasına bağlanabilir. Çünkü hem Robinson hem de Nova Klemantin mandarini ile Orlando tanjelo melezlenmesinden elde edilmiştir.

Primer ortalamaları dikkate alınarak oluşturulan benzerlik oranlarından, aşağıda belirtilen formülle çeşitler arasındaki polimorfizm oranı % olarak belirlenmiştir.

$$\text{Polimorfizm oranı \%} = 100 - \text{benzerlik oranı \%}$$

Çizelge 4.4. Değişik mandarin çeşitlerine ait benzerlik indeksi dikkate alınarak hesaplanan polimorfizm değerleri

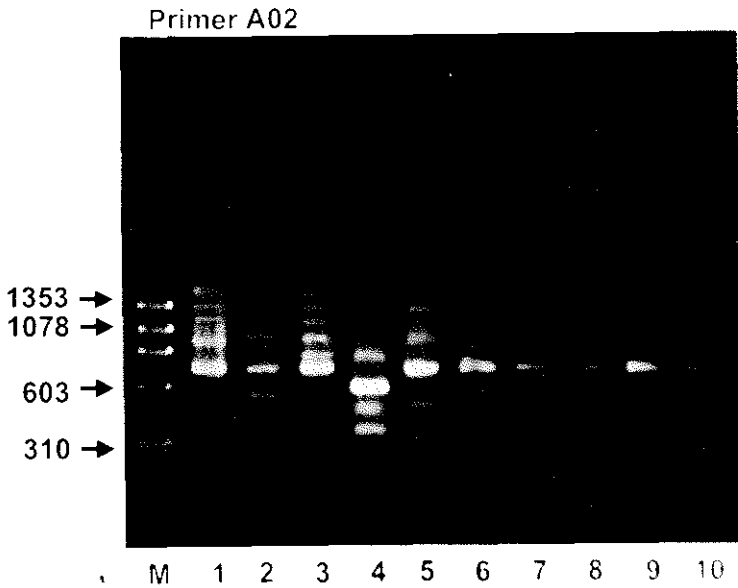
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	100									
2	36	100								
3	37	24	100							
4	47	43	49	100						
5	46	39	42	55	100					
6	52	56	49	58	61	100				
7	44	34	36	37	46	54	100			
8	49	44	44	27	45	48	28	100		
9	40	32	43	40	48	47	36	28	100	
10	51	55	51	53	63	46	41	49	34	100

1: Klemantin, 2: Nova III, 3: Lee I, 4: Robinson, 5: Minneola Tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee II, 8: Nova II, 9: Nova I, 10: Satsuma

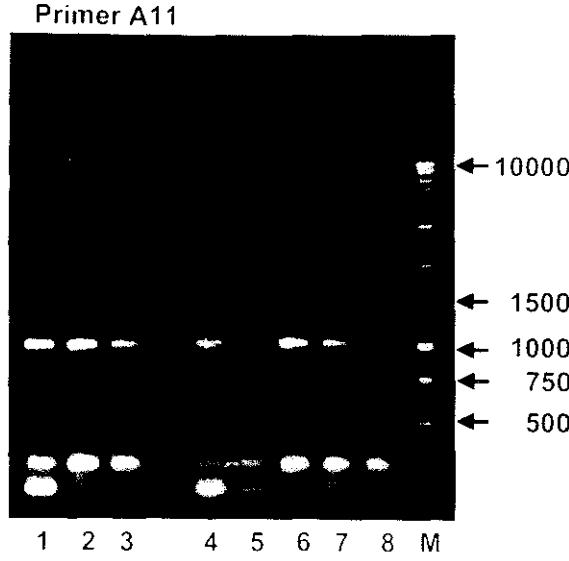
Çizelge 4.4’ de görüldüğü gibi 10 adet primer kullanılarak mandarin çeşitleri arasında saptanan en yüksek polimorfizm oranı, % 63 ile Satsuma ve Minneola Tanjelo çeşitleri arasında saptanmıştır. Bu çeşitleri, % 61 ile Kinnow ve Minneola tanjelo, % 58 ile Kinnow ve Robinson, % 55 ile Satsuma ve Nova III ve % 55 ile Minneola tanjelo ve Robinson çeşitleri izlemiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı gibi, bu çeşitler arasında yüksek polimorfizm tespit edilmiştir. Minneola tanjelo Dancy mandarini ile Duncan altıntopu melezlenmesi sonucu elde edilmiştir. Satsuma ise Tsao Chieh mandarininden şans çöğürü olarak oluşmuştur. Her iki çeşidin de kökenleri farklıdır. Ayrıca, morfolojik olarak da birbirlerinden oldukça farklıdırlar (Hodgson 1967, Tuzcu 1990). Minneola tanjelo ve Satsuma arasındaki % 63 ‘ lük polimorfizm ile bu bilgiler uyum içerisindedir. Kinnow mandarini, King ve yerli mandarinlerin melezlenmesi sonucu elde edilmiştir (Tuzcu 1990). Kinnow ile Minneola tanjelo arasındaki % 61 ‘ lik polimorfizmin nedeni de her iki çeşidin kökenlerinin çok farklı olmasıdır. Robinson mandarini klemantin mandarini ile orlando tanjelo melezlenmesinden elde edilmiştir (Hodgson 1967). Kinnow ile Robinson arasındaki % 58’ lik polimorfizmin nedeni de her iki çeşidin

ebeveynlerinin de farklı olmasıdır. Nova mandarini, Klemantin mandarini ile orlando tanjelo melezlenmesinden elde edilmiştir (Hodgson 1967). Bu bilgi de Satsuma mandarini ile Nova III mandarin çeşidinin % 55 olan polimorfizminin bir göstergesidir. Minneola tanjeola ve Robinson arasında da % 55' lik polimorfizm tespit edilmiştir. Robinson , Klemantin ile Orlando tanjelo melezlenmesinden elde edilmiştir. Bunu dikkate alırsak Minneola tanjelo ile Robinson mandarinlerinin kökenleri birbirinden farklıdır.

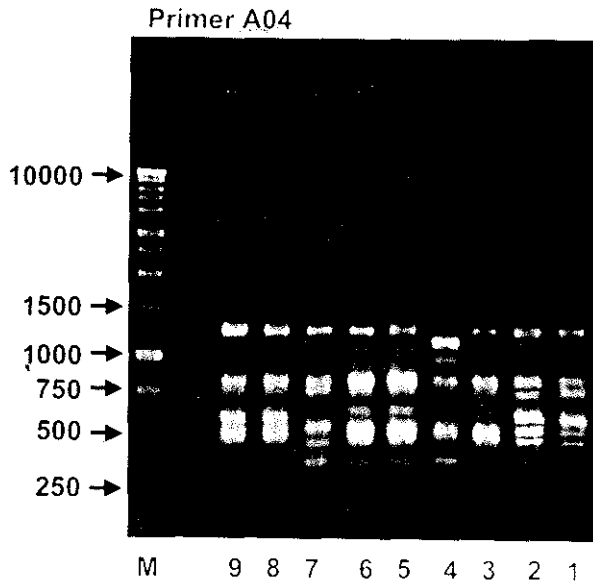
Denemelerimizde, RAPD çalışmalarında kullanılan ve PCR sonucunda amplifikasyon oluşturan bazı primerlerin değişik mandarin çeşitlerinde oluşturduğu bant desenleri Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da gösterilmiştir.



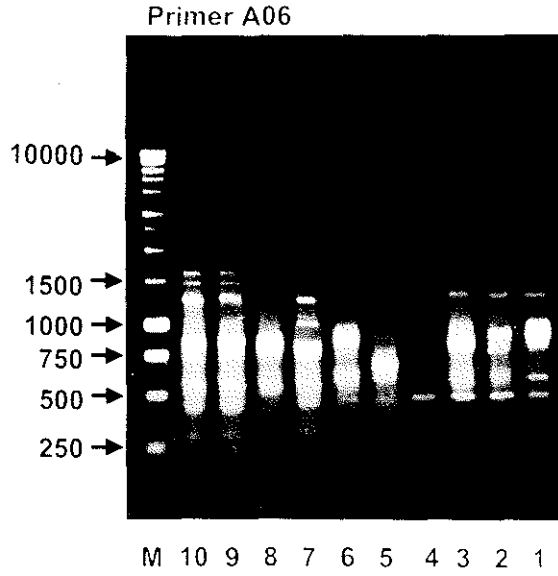
Şekil 4. 1. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A02 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (soldan- sağa; Marker (Hae III), 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, 10: Satsuma) PCR ürünleri % 1.5 Agaroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforez 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir.



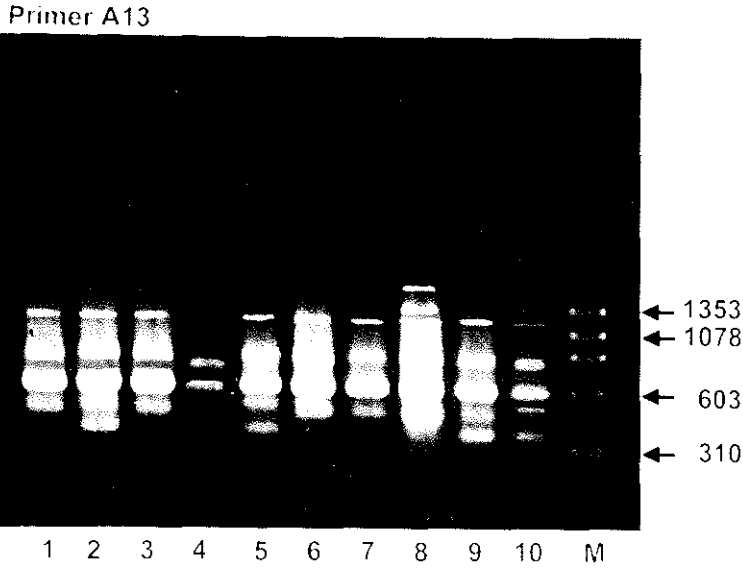
Şekil 4.2. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A11 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (soldan -sağa; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Minneola tanjelo, 5: Kinnow, 6: Lee-II, 7: Nova-II, 8: Nova-I, Marker (1 kb DNA ladder)) PCR ürünleri % 1.5 Agaroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforez 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir.



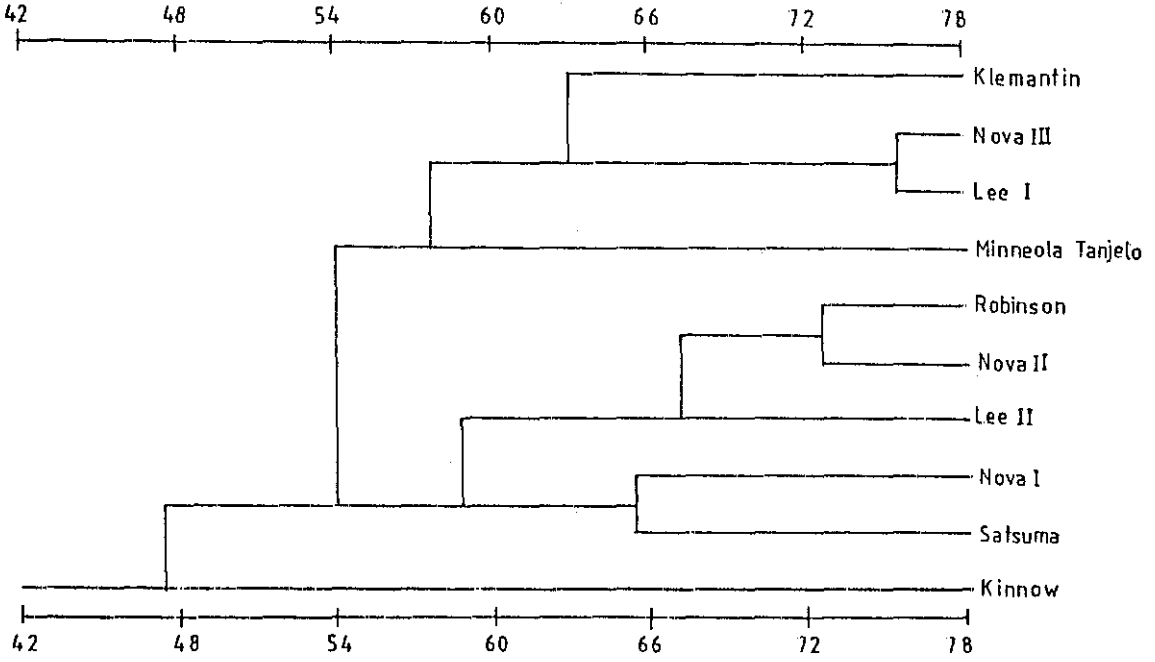
Şekil 4.3. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A04 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (sağdan- sola; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, Marker (1 kb DNA ladder)) PCR ürünleri % 1.5 Agaroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforez 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A06 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (sağdan -sola; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, 10: Satsuma, Marker (1 kb DNA ladder)) PCR ürünleri % 1.5 Agaroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforez 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. 5. Değişik mandarin çeşitlerinde RAPD analizi sonucu A13 primerinde oluşan amplifikasyon ürünleri (soldan- sağa; 1: Klemantin, 2: Nova-III, 3: Lee-I, 4: Robinson, 5: Minneola tanjelo, 6: Kinnow, 7: Lee-II, 8: Nova-II, 9: Nova-I, 10: Satsuma, Marker (Hae III)) PCR ürünleri % 1.5 Agaroz jelde 1x TAE tamponunda yürütülmüş, elektroforez 60 volt' da 2.5 saat sürede gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6.RAPD amplifikasyon ürünlerinden Cluster (UPGM) analizi kullanılarak oluşturulan değişik mandarin çeşitlerine ait dendogram.

Değişik mandarin çeşitlerinde sigiura katsayısı dikkate alınarak Cluster analizi (UPGMA) sonucu oluşturulan dendogram şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi denemeye alınan mandarin çeşitlerinden, Nova- III ile Lee- I, Robinson ile Nova-II, Nova-I ile Satsuma aynı grup içerisinde yer almıştır. Ancak Nova-III ile Lee-I çeşitlerinde benzerlik daha yüksek bulunmuştur. Robinson ve Nova-II çeşitlerindeki benzerlik ise Nova- III ile Lee-I çeşitlerindeki benzerlikten daha düşük, fakat Nova-I ve Satsuma çeşitlerindeki benzerliğe göre ise daha yüksek bulunmuştur. Klemantin mandarin çeşidi ise Nova-III ve Lee- I mandarin çeşidi ile aynı grup içerisinde yer almıştır. Lee-II

içersinde yer almıştır. Lee-II mandarin çeşidi de Robinson ve Nova-II mandarin çeşidi ile aynı grup içersinde yer almıştır. Kinnow mandarin çeşidi ise tüm bu mandarin çeşitlerinden daha uzak bir grup içersinde yer almıştır. Kinnow mandarinini King ve Yerli mandarin melezlenmesi sonucu elde edilmiş bir çeşittir, dolayısıyla diğer mandarin çeşitlerinden daha uzak bir grup içersinde yer alması doğaldır. Şekilden de yakınlığı tespit edilen Nova-III ve Lee-I çeşitlerinin her ikisi de Klemantin mandarinini ile Orlando tanjelo melezlenmesi sonucu elde edilmiştir. Robinson ve Nova-II mandarin çeşitlerinin birbirlerine yakınlıkları % 73 dolayında tespit edilmiş. Bu çeşitler de Klemantin mandarinini ve Orlando tanjelo melezlenmesi sonucu elde edilmiştir. Ayrıca, Robinson ve Nova-II mandarin çeşitleri grubuna benzerliği % 67 dolayında olan Lee-II mandarin çeşidinin de ebeveynleri Klemantin mandarinini ve Orlando tanjelodur. Öte yandan Nova- I ile Satsuma arasında % 66 düzeyinde benzerlik saptanmıştır. Satsuma çeşidi Tsao Chieh mandarininden şans çöğürü olarak oluşmuş bir çeşittir. Nova-I ise Klemantin ile Orlando tanjelo melezlenmesinden oluşmuştur. Muhtemelen çalışmamızda Nova-I ve Satsuma çeşitleri arasında görülen benzerlik kullandığımız primerlerin yeterli polimorfizm oluşturmamasından kaynaklanmaktadır.

5. SONUÇ

Bu araştırmada, son yıllarda genotipik farklılıkların belirlenmesinde yoğun olarak kullanılan RAPD tekniğine ait parametrelerin mandarin çeşitlerinde kullanımı optimize edilmiş ve çeşitler arasındaki varyasyonlar 10 farklı primer (10 bp uzunluğunda) kullanılarak belirlenmiştir.

DNA ekstraksiyonunda denenen Doyle ve Doyle, Draper ve Dellaporta yöntemlerinden en iyi sonucu Dellaporta yöntemi vermiştir. Dellaporta yöntemi kullanılarak ekstrakte edilen DNA' larda kullanılan fenol ve kloroform sayesinde karbonhidratlar, polisakkaritler ve polifenoller temizlenmiş ve PCR yapılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Karbonhidratlar, polisakkaritler ve polifenollerden yeteri kadar temizlenmemiş olan DNA' lar da PCR sonucunda amplifikasyon gerçekleşmemiştir.

PCR aşamasında RAPD parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve çeşitler arasındaki varyasyonların belirlenmesinde bu parametreler kullanılmıştır. RAPD reaksiyonları için optimum DNA konsantrasyonu 50 ng, dNTP 5mM, primer 10 pmol, MgCl₂ 2.5 mM, PCR tamponu 2.5 µl (1x 10 PCR tamponu) ve taq polimeraz konsantrasyonu ise 1.25 ünite olarak tespit edilmiştir.

Araştırmadaki çeşitlerin benzerlik indeksi değerleri % 76 ile % 42 arasında değişim gösterirken, polimorfizm değerlerinin ise % 63 ile % 24 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Primer başına düşen bant sayısı 1-11 adet arasında, bantların uzunluğu ise 230-2400 bp arasında saptanmıştır. Çeşitler arasında en yüksek polimorfizm sırasıyla Satsuma ile Minneola tanjelo, Kinnow ile Minneola tanjelo ve Kinnow ile Robinson çeşitleri arasında saptanmıştır.

Nova - III ile LeeI, Robinson ile Nova II ve Nova II ile Nova I mandarin çeşitleri birbirlerine en yakın çeşitler olarak saptanmıştır. Nova I ile Satsuma mandarinleri arasında da benzerlik yüksek tespit edilmiştir. Bu benzerliğin nedeni çalışmamızda sınırlı olanaklar nedeniyle sadece 10 primerle çalışmamız ve bu primerlerin Nova I ve Satsuma arasındaki polimorfizmi tespit etmeye yeterli olmamasına bağlanmıştır.

Günümüze dek yapılan çalışmalarla, bu araştırmada elde edilen bulguları karşılaştırdığımızda, RAPD-PCR tekniğinin doğru ve yeterli primerler seçildiğinde çeşitlerin ayırımında kullanılabileceği sonucuna varabiliriz. Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığı altında, yüksek düzeyde polimorfizm elde edebilmek için daha fazla miktarda primer kullanılmasını önerebiliriz.

Bu araştırmada kullanılan yöntemler mandarin ve mandarin dışında diğer turunçgillerde de rahatlıkla kullanılabilecektir. Böylelikle bu yöntemler ileride yapılacak olan ıslah çalışmalarında kullanılabilecek ve üretim çalışmalarında çeşit veya tür karışıklıklarının önüne geçilebilecektir.

6. ÖZET

Bu çalışmada RAPD markerleriyle bazı mandarin çeşitlerinin tanılanması amaçlanmıştır. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Koleksiyon Parsellerinde bulunan Klemantin, Nova-I, Nova-II, Nova-III, Lee-I, LeeII, Robinson, Kinnow, Satsuma ve Minneola tanjelo çeşitlerinde RAPD yöntemi kullanılarak çeşitlerin birbirlerine yakınlık dereceleri araştırılmıştır.

Tüm ıslah yöntemlerinde amaç genetik ilerlemedir. Bu ilerleme; çeşitlerin üzerinde çalışılan genlerinin moleküler markerler yoluyla saptanmasıyla daha kolay ve kısa sürede sağlanabilir. Ayrıca bu şekilde değişik, ıslah yöntemleri ve doğal olarak bugüne kadar elde edilmiş tür, çeşit ve tiplerin genotipleri ve ebeveynleri hakkında kesin bilgiler elde edilmektedir. Çalışmamızda bu amaçla moleküler tekniklerden RAPD tekniği kullanılmıştır.

DNA ekstraksiyonu için en genç sürgünlerden yaprak örneği alınmış ve ekstraksiyonda bu yapraklardan oluşturulan küçük parçacıklar kullanılmıştır. Turunçgil yapraklarının ekstraksiyonunda değişik yöntemler denenmiş ve en uygun Dellaporta yöntemi tespit edilmiştir. Dellaporta yöntemi kullanılarak ekstrakte edilen DNA' larda kullanılan fenol ve kloroform sayesinde yaprakta bulunan karbonhidratlar, polisakkaritler ve polifenoller temizlenmiş ve PCR yapılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

PCR aşamasında RAPD parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve çeşitler arasındaki varyasyonların belirlenmesinde bu parametreler kullanılmıştır. RAPD reaksiyonları için optimum DNA konsantrasyonu 50 ng, dNTP 5mM, primer 10 pmol, MgCl₂ 2.5 mM, PCR tamponu 2.5 µl (1x 10 PCR tamponu) ve taq polimeraz konsantrasyonu ise 1.25 ünite olarak belirlenmiştir. Araştırmada 10 adet 10 bazlık primer kullanılmış, çeşitlere ve primerlere göre değişmekle beraber bant sayıları 1 ile 11 arasında değişmektedir. Primer başına düşen ortalama bant sayısı A04, A07 ve A06 primerlerinde diğer primerlere göre daha yüksek tespit edilmiştir. Çeşitler arasında en yüksek polimorfizm Satsuma ile Minneola tanjelo ve Kinnow ile Minneola tanjelo

Çeşitleri arasında saptanmıştır. Nova-III ile Lee-I ve Nova-II ile Nova- I mandarin eşitleri birbirine en yakın çeşitler olarak tespit edilmiştir

Araştırma sonunda RAPD tekniğiyle çeşitler arasında dışuk olan genetik farklılıkların da saptanabileceği tespit edilmiştir.

7. SUMMARY

In this research, identification of some mandarin varieties were aimed by RAPD markers. The similarity matrix of Klemantin, Nova-I, Nova-II, Nova-III, Lee-I, LeeII, Robinson, Kinnow, Satsuma ve Minneola tangelo varieties grown in the University of Akdeniz, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture were researched by RAPD markers.

The aim of all breeding methods is to provide genetic progress. This progress is easier and takes shorter time by determining localization of genes in the varieties by molecular markers. Moreover, in this way, the certain knowledges about genotips and parents of species, varieties and types obtained by spontan and breeding methods are provided. In our research, the molecular technic of RAPD was used for these reasons.

Leaf samples were taken from young shoots for DNA extraction and a small part of this leaf sample was used in the extraction. Different methods were examined in the extraction of the citrus leaves and Dellaporta method was determined as the most suitable method for the extraction of citrus leaves. Citrus tissues are rich in polysaccharides, polyphenols and carbonhydrates, these compounds interfere DNA amplification. So, DNA was cleaned from these compounds by Dellaporta method which has phenol and chloroform in extraction buffer. Amplification products were taken after PCR.

In PCR part, firstly the optimization of RAPD parameters were done then it was determined variation among varieties by these RAPD parameters. Optimum DNA concentration for RAPD reaction was 50 ng, dNTP 5mM, primer 10 pmol, $MgCl_2$ 2.5 mM, PCR buffer 2.5 μ l (1x PCR buffer) and the concentration of taq polymerase was found 1.25unit. In the study 10 different primers were used, the number of bands change from 1 to 11 according to varieties and primers. A04, A07 and A06 primers have more bands than the other primers. The highest polymorphisms were obtained between Satsuma- Minneola tangelo and Kinnow- Minneola tangelo varieties. Nova-III - Lee-I and Nova II- Nova I mandarin varieties were determined as the closest relative varieties.

At the end of the reseach, it was established that low genetic differences can be also determined by RAPD markers.

B. KAYNAKLAR

- AÇIK, L. , SAMANCI, B. , YAPAR, M. ve KUBAR, A. 1997a. Bazı *Allium* türlerinin RAPD- PCR ile genetik analizleri. *Akd. Üniv. Zir. Fak. Derg.* 10: 136-142.
- AÇIK, L. , SAMANCI, B. , YAPAR, M. ve KUBAR, A. 1997b. RAPD izleri ile 5 *Allium* türünün belirlenmesi. *Akd. Üniv. Zir. Fak. Derg.* 10: 143-148.
- ALBAYRAK, G. , KARAER, S. , TOPOHAN, F. G. , GEMİCİ, B. , CAN, O. ve GÖZÜKIRMIZI, N. 1995. RAPD markırları ile DNA parmakizi çıkarılması. *Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" 17-19 Nisan 1995.* Gebze/ Kocaeli. Bornova/İzmir, 157-163.
- ANONİM, 1975. Citrus. Ciba Geigy Agrochemicals. Ciba- Geigy Kld. Basle, Switzerland. 88 p.
- ANONİM. 1996. Tarımsal Yapı (Üretim, Fiyat, Değer) 1994. DİE matbaası Yayın No: 1873, Ankara.
- BARTOLOZZI, F. , WARBURTON, M. L. , ARULSEKAR, S. and GRADZIEL T. M. 1998. Genetic characterization and relatedness among california almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) Analysis. *Journal American Sociel Horticultural Science*, 123(3): 381-387.
- BURDETTE, S. A. 1993. Features of the main Citrus Cultivars of Southern Africa. Mandarins(soft citrus) and related hybrids *Citrus Journal*. 4(3): 30-35.
- CAI, Q. , GUY, C. L. and MOORE, G. A. 1994. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold- acclimation- responsive loci. *Theor Appl Genet* 89: 606-614
- CAMERON, J. W. and FROST, H. B. 1968. Genetics, breeding and nuceller embryony. In: W. Reuther, L. D Batchelor and H J Webber(eds). The Citrus Industry, 2: 325-370. Univ. of Calif Div. Agr. Sci., Berkeley, California
- CARTENS, K. 1991-1992. Identification of citrus cultivars and selections by means of isoenzyme electrophoresis and restriction fragment length polymorphisms. *Annual Report, Institue for Tropical and Subtropical Crops, Nelspruit*.
- CLAM. 1997. Les Exportations d' Agrumes du Bassin Mediterranean Secret ariat General du C L A M. Antalya (Turque), 23-29 September 1997
- CONNER, P. J. , BROWN, S. K. and WEEDEN, N. F. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA- based genetic linkage maps of three apple cultivars *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122(3): 350-359.

- CONTINELLA, G. , LA ROSA G. and DENG Z. N. 1996.** Characterization of two late- ripening Clementines. Programme and Abstracts. VIII Congress of the International Society of Citriculture, 1996 Sun City Resort, South Africa, 12-17 May 1996
- DEBENER, T. and MATTIESCH, L. 1998.** Effective pairwise combination of long primers for RAPD analyses in roses *Plant Breeding*, 117: 147-151.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J. and HICKS, J. B. 1983.** A Plant DNA Minipreparation: version II *Plant Molecular Biology Reporter*. 1(4):19-21.
- DENG, Z. N. , GENTILE, A. , NICOLASI, E. , DOMINA, F. , VARDI, A. and TRIBULATO, E. 1995.** Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers. *Journal of Horticultural Science*, 70(1): 117-125.
- DENG, Z. , GMITTER, F. G. J. and HUANG, S. 1996.** Simple and quick procedures for preparing citrus genomic DNA for reliable PCR analysis. VIII Congress of the International Society of Citriculture, 1996 Sun City Resort, South Africa, 12-17 May 1996.
- DENG, Z. , GENTILE, A. , NICOLASI, E. , CONTINELLA, G. and TRIBULATO, E. 1996.** Parentage determination of some citrus hybrids by molecular markers. VIII Congress of the International Society of Citriculture, 1996. Sun City Resort, South Africa, 12-17 May 1996.
- DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L. 1990.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15
- DRAPER, J. , SCOTT. R. , ARMITAGE, P. and WALDEN. R. , 1987.** The isolation of DNA from fresh tissues using SDS. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression. A Laboratory Manual* 4: 212-214
- ERCAN, G. 1998.** RAPD ve RFLP markerlerinin bitki ıslahında kullanılması. Doktora Semineri (Yayınlanmamış). Ak Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- FOFANA, B. , VEKEMANS, X. , DU JARDIN , P. And BAUDOIN, J. P. 1997.** Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica*, 95: 157-165.
- GALDRISI, U. , CIPOLLARO, M. , BERNANDO, D. G. , DE MASI, L. , GALANO, G. and CASCINO, A. 1998.** Molecular typing of italian sweet chestnut cultivars by amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73(2): 259-263.
- GAWEL, N. J. and JARRET, R. L. 1991.** A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 262-266.

- GREEN, R. M. , VARDI, A. and GALUN , E. 1986.** The plastome of Citrus. Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related Genera *Theo Appl Genet*, 72: 170-177.
- GÖZÜKIRMIZI, N. , ARI, Ş. , GÜREL, F. , ÇOBANOĞLU, G. , RÜSTEMOVA, P. , BİLGİN, G. , CAN, O. ve EKİZ, H. 1995.** Hordeum (Arpa)' da genetik stabilite, germplasm örneklerinde polimorfizm ve genetik haritalama için RAPD yöntemi ile parmakizi çalışmaları ve Arpa ıslahında etkileri *Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" 17-19 Nisan 1995*. Gebze/ Kocaeli Bornova /İzmir, 149-157.
- HAMADA, K. and HAGIMORI, M. 1996.** RAPD based method for cultivar identification of calia lily (*Zantedeschia spp*) *Scientia Horticulturae* 65: 215-218.
- HODGSON, R. W. 1967.** Horticultural Varieties of Citrus In: V Reuther, H. J. Webber and L. D. Batchelor (eds) *The Citrus Industry* 1: 431-591. Univ of calif.
- KUMAR, P. P. , YAU, C. K. J. and GOH, C. J. 1998.** Genetic analyses of Heliconia Species and Cultivars with Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Markers. *Journal American Sociel Horticultural Science*, 123(1): 91-97.
- LING, J. , SAUVE, R. And GAWEL, N. 1997.** Identification of Poinsettia Cultivars using RAPD markers *Hortscience*, 32(1): 122-124.
- LURO, F. , LAIGRET, F. , BOVE, J. M. And OLLITRAULT, P. 1992.** Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to Citrus genetics and taxonomy. *Proc Int Soc Citriculture*, 1: 225-228.
- MACHADO, M. A., FİLHO, H. D. C. , TARGON, M. L. P. N. and POMPEU, J. 1996.** Genetic relationship of Mediteranean mandarins(*Citrus delicosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, 92: 321-326.
- MALIK, T. A. , PRICE, A. and WRIGHT, D. 1996.** Identification of wheat genotypes by random amplified polymorphic DNA technique
- MANIATIS, T. , FRITSH, E. F. and SAMBROOK, J. 1982.** Molecular Cloning: A laborotary Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- MARQUARD, R. D. , DAVIS, E. P. and STOWE, E. L. 1997.** Genetic diversity among *Hamamelis virginiana*(Kuzey Amerika' da yetißen, sonbaharda sarı çiçekler açan bir ağaçcık) cultivars based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *J Amer Soc Hort Sci*, 122(4): 529-535.
- MENDİLCİOĞLU, K. 1996.** Subtropik iklim meyveleri (Turunçgiller). Ege

Üniversitesi Ziraat Fakültesi ders notları: 9/4. Ofset Basımevi 1996. Bornova/İzmir.

- MILLAN, T. , OSUNA, F. , COBOS, S. and TORRES, A. M. 1996.** Using RAPDs to study phylogenetic relationships in Rosa. *Theor Appl Genet*, 92: 273-277.
- MORENO, S. , GOGERCENA, Y. and ORTIZ, J. M. 1995.** The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (Vitis Vinifera L.) *Scientia Horticulturae*, 62: 237-243.
- NEI, N. and LI, W. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases *Proc Natl Acad Sci*, 76: 5269-5273. U. S. A
- ONUS, N. 1996.** Bitki ıslahında DNA markerlarının kullanımı. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi dergisi*, 9: 322-333
- ORTIZ, A. , RENAUD, R. , CALZADA, I. and RITTER, E. 1997.** Analysis of plum cultivars with RAPD markers. *Journal of Horticultural Science*, 72(1): 1-9.
- PAMMI, S. , SCHERTZ, K. , XU, G. HART, G. and MULLET, J. E. 1994.** Random amplified polymorphic DNA markers in sorghum. *Theor. Appl. Genetic.*, 89:80-88
- PAZ, M. M. and VEILLEUX, R. E. 1997.** Genetic diversity based on randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) and its relationship with the performance of diploid potato hybrids. *J Amer Soc Hort Sci*, 122(6): 740-747.
- RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. 1993.** Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *TIG*, 9(8): 275-279.
- RUSO, G. and CERONE, G. 1996.** Identification of citrus clemantina Hort. Ex Tan. Cultivars by RAPD markers. VIII Congress of the International Society of Citriculture, 1996. Sun City Resort, South Africa, 12-17 May 1996.
- SUGAWARA, K. , OOWADA, A. , MORIGUCHI, T. and OMURA, M. 1995.** Identification of citrus chimeras by RAPD markers. *Hortscience*, 30(6): 1276-1278.
- SWINGLE, W. T. 1943.** The botany of Citrus and Its Relatives of the Orange Subfamily. In: H. J. Webber and L. D. Batchelor (eds). *The Citrus Industry* Vol. 1. Univ. Calif. Berkeley, Calif.
- SUGIURA, A. , TAO, R. and TOMANA, T. , 1988.** Distinguishing between Japanese Persimmon Cultivars (*Diospyros kaki* L.) by means of pollen isozymes. *Scientia Hortic* , 36: 67-77.

- TORRES, A. M. , SOOST, R. K. and DIEDENHOFEN, U. 1978.** Leaf isozymes as genetic markers in citrus. *Amer. J. Bot.*, 65(8): 869-881
- TUZCU, Ö. , 1990.** Türkiye’ de yetiştirilen başlıca turunçgil çeşitleri. Akdeniz İhracatçı Birlikleri Yayınları, Mersin
- UZUN, İ. , SÖYLEMEZOĞLU, G. , ONUS, N. Ve GÖÇMEN, N. 1998.** Asma klonlarının RAPD markörlerinden teşhisi üzerine araştırmalar. *Tübitak Projesi.* No: 1596, 29s
- VARGHESE, Y. A. , KNAAK, C. , SETHURAJ, M. R. and ECKE, W. 1997.** Evaluation of random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers in *Hevea brasiliensis*. *Plant breeding*, 116: 47-52.
- WILLIAMS, J. G. K. , KUBELİK, A. R. , A. R. , LIVAK, K. J. , RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531-6535.
- YAMAMOTO, M. , KOBAYASHI, S. , NAKAMURA, Y. 1993.** Phylogenetic relationships of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. *Japanese Journal of Breeding*, 43(3): 355-365.
- YANG, X. and QUIROS, C. 1993.** Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86: 205-212
- YEŞİLOĞLU, T. 1996.** Turunçgiller ders notları. Antalya (yayınlanmamış).

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem GÖKSEL 1974 yılında Antalya' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya' da tamamladı. 1992 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden 1996 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Yüksek Lisans Öğrenimine başladı ve araştırma görevlisi olarak atandı. Halen bu görevi sürdürmektedir.